

**EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
GENETIKAI TANSZÉK**

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

doktori értekezés tézisei

**Borsy Adrienn Éva**



**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

Doktori iskola vezetője: Dr. Erdei Anna, akadémikus

**KLASSZIKUS ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKA DOKTORI PROGRAM**

Programvezető és Témavezető: Dr. Orosz László, akadémikus

**BUDAPEST**

2009



# Bevezetés

## A csontritkulás népegészségügyi probléma

A csontritkulás a csúcscsonttömeghez képest megfogyatkozott csonttömeget, csökkent mértékben mineralizált és mikroszerkezetiileg degenerálódott csontszövetet jelent, amelyben megváltozik a fehérjék mennyisége és összetétele. Az oszteoporozist primer és szekunder formákra szokás felosztani. Az utóbbiak más betegségek szövődményeiként jelennek meg. A primer formák az öregedési folyamatokhoz kapcsolódnak, ezért involúciós oszteoporozisként emlegetik. Az involúciós oszteoporozisnak két típusát különítjük el: az I. típusú vagy posztmenopauzás – férfiaknál presenilis –, valamint II. típusú vagy senilis formát, amik részben összemosódnak egymással.

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) kimutatása szerint a csontritkulás a szív- és érrendszeri illetve daganatos betegségek mellett a legjelentősebb egészségügyi probléma, a felnőtt népesség kb. 10%-át érinti. Becslések szerint az egész világon 200-250 millió ember él csontritkulással. Európán belül a magyarok és a norvégok rendelkeznek a legalacsonyabb csontsűrűséggel. Magyarországon 900 ezer-1 millió beteg tartanak nyilván, ebből 600 ezer nő.

E felismeréseknek komoly klinikai jelentősége van: a magyar lakosságot fokozottan veszélyezteti az alacsonyabb csonttömeg és a fokozott csontvesztés. Az alacsonyabb csonttömegű, azaz csontritkulásos betegeknek lényegesen magasabb a kardiovaszkuláris és daganatos betegségek kockázata; illetve *vica versa*, a szív- és érrendszeri betegeknek jóval nagyobb a csontritkulás valószínűsége. A mozgássérült emberek mintegy 30%-a csontritkulás miatt vált tartósan mozgássérültté, ezzel a betegség a súlyos fogyatékoság előidézésének okai között a második helyet foglalja el hazánkban. Az Európai Unióban a csontritkulás miatt bekövetkezett csípőtáji törések után az egy éven belüli halálozási arány 15-30%.

1 millió embernek a gyógyítása komoly anyagi terhet ró a beteg családjára, az egészségügyre és így az egész társadalomra. A betegek száma évről évre emelkedik, mely tendencia mögött nemcsak a diagnosztika fejlődése és a betegség precízebb felismerése áll, hanem a várható élettartam emelkedése, a civilizált életmóddal együtt járó életvitel.

Az orvostudomány mai eszköztára elsősorban a kialakult oszteoporotikus állapot stabilizálását teszi lehetővé, valódi gyógymód az elsősorban tüneti kezeléssel jelenleg nem létezik.

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

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

## **A ciklikus fiziológiás oszteoporózis, mint modell**

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

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

Magyarországon a gímszarvas bikák februártól korosztályonkénti késéssel májusig lehullatják csontos agancsukat, amelyet szinte azonnal az új fejdísz 100-120 napos építése követ. A szarvasfélék, így a gímszarvas agancsának fejlődése az élővilágban ismert legintenzívebb csontfejlődés, amely nagyon hasonlít a hosszú csöves csontok endochondrális csontosodásához. Ezen agancsfejlődési periódus utolsó 2-3 hete a mineralizáció legintenzívebb időszak, a gyarapodási ráta meghaladhatja a napi 100 g-ot május és július között. Mivel igen rövid idő alatt egy átlagosan 7-8 kg, alkalmanként 14-17 kg-os csontszervbe szükséges hatalmas mennyiségű ásványi anyagot mobilizálni, az ásványi anyag prekursorok iránti igény meghaladja a táplálkozással felvehető mennyiséget, így törvényszerűen a hiány a kalcium és foszfát vázcsontból – szegycsontból, bordákból, egyes csigolyákból – történő mobilizálásával pótlódik. Mindez végeredményben egy ideiglenes csontritkuláshoz, terminus technikussal élve ciklikus fiziológiás oszteoporozishoz vezet. Az

ásványi anyag reszorpció a legmagasabb – eléri a 23%-ot – a bordakosárban, majd az agancsnövekedés befejeztével visszaesik kevesebb, mint 3%-ra. Később az ásványi sók a dőhőség kondíciójavító ideje alatt a dús vegetációból táplálkozás útján visszapótlódnak, azaz a csontsűrűség csökkenés regenerálódik a csontvázban. A téli hónapok mind agancsépítés, mind a váz ásványi anyag forgalma szempontjából nyugvópontot jelentenek.

A vázelemek tökéletes szöveti regenerációja az élővilágban oszteoporotikus csontvesztés esetén sohasem történik meg természetes úton ekkora volumenben. Ez a jelenség kuriozitása.

## Célkitűzés

Ezen doktori értekezés egy genomikai megközelítésből indítható genetikai analízis útvonal lehetőségének feltárását tűzte ki célul egy komplex biológiai jelenség, a csontritkulásos állapot vizsgálatán keresztül. A koncepció kibontását a genom programok iniciálta technológiai fejlődés tette lehetővé, amely rámutatott arra, hogy az emlősök genomja ugyanazon génekből áll. Az ortológok szekvenciája nagyon hasonló, a gének konzerváltak. Mindez lehetővé teszi, hogy olyan élettani folyamatok génexpressziós hátterét hasonlítsuk össze, amely egészséges állapotok fiziológiás állapotának velejárója, míg emberben a civilizáció patológiás következménye.

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

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

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

Doktori értekezés fő céljainak bemutatása pontokban:

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

# Módszerek

## Mintavétel

**Szarvas bordacsont** 3 darab, egyenként 6, 7 és 8 éves gímszarvas, *Cervus elaphus*, bikákból megközelítőleg 2-3 g lengőborda mintát távolítottunk el sebészeti úton három alkalommal egy agancsciklushoz kötötten: Június elején, amikor a vázcsontozatban oszteoporozis alakul ki; július végén, amikor a kialakult oszteoporozis regenerálódik, illetve november végén, amikor az ásványi anyagok lerakása és mobilizálás dinamikus egyensúlyban van egymással mind a váz- mind az agancscsontban.

**Humán csontszövet** A génexpressziós mintázatot 7 posztmenopauzás oszteoporotikus és 10 posztmenopauzás nem oszteoporotikus, egymással rokonságban nem álló, magyar, kaukázusi nő csontmintájában vettük fel.

## mRNS izolálás és amplifikálás

Mind a humán, mind a szarvas csont mintákból direkt mRNS-t izoláltunk Dynabeads Oligo(dT)25 paramágneses partikulák segítségével.

Microarray hibridizálás előtt a kevert mRNS mintákat lineárisan amplifikáltuk *in vitro* transzkripciósi eljárással, mely technikának következtében az egyedi mRNS-ek aránya nem változott.

## Mikroarray próbakészítés, hibridizálás és adatfeldolgozás

A próbakészítés során mintánként amplifikált gímszarvas mRNS-t írtunk át az oszteoporotikus, a regenerálódó és az ősi kontroll mintákból, majd hibridizáltuk az egész humán genomot reprezentáló cDNA mikroarray lemezekre szigorú, standard humán-humán hibridizációs kondíciókat alkalmazva.

## Relatív Quantitatív Real-Time PCR

A microarray eredményei közül szelektált 25 gén expressziós szintjét Quantitative Real-Time PCR módszerrel TaqMan Gene Expression Assay segítségével határoztuk meg 7 posztmenopauzális oszteoporotikus és 10 posztmenopauzális nem oszteoporotikus, magyar, kaukázusi nő csoportjában.

## Egy- és többváltozós statisztikai analízis

**Non-parametrikus Mann–Whitney U teszt** A non-parametrikus Mann–Whitney U teszt használatával az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus mintákban szignifikánsan eltérő mértékben expresszálódó géneket kerestük  $p \leq 0.1$  szignifikancia szint mellett.

**Főkomponens Analízis – Principal Components Analysis (PCA)** Standardizált Főkomponens Analízis (PCA) lehetővé teszi annak tanulmányozását, hogy a human minták milyen csoportmintázatot vesznek fel. Értékelhetjük emellett, hogy gének közötti korrelációk, illetve az egyes gének relatíve hogyan járulnak hozzá a konfiguráció létrejöttéhez.

**Diszkriminancia Analízis – Canonical Variates Analysis (CVA)** A Diszkriminancia Analízis (CVA) előre definiált objektum csoportok elválását maximalizálja, megválaszolva a kérdést, hogy vajon az oszteoporotikus és nem oszteoporotikus csoport átfedő vagy elválnak az egyetlen kanonikus tengelyen.

Számos CVA-t futtattunk különféle logikai alapon csoportba szedett gének felhasználásával, s meghatároztuk a két betegcsoport között legerőteljesebben diszkrimináló génszeteket.



## A doktori értekezés tézisei

Munkánk során egy eddig példa nélküli megközelítést alkalmaztunk: Az összehasonlító genetikai eszköztár segítségével egy patológiás – a humán korfüggő oszteoporózis – és egy fiziológiás – a gímszarvas ciklikus fiziológiás csontitkulása – folyamat között vontunk párhuzamot a csontitkulás genetikai hátterének mélyebb megismerése céljából.

A kapott molekuláris biológiai, génexpressziós adathalmazt olyan többváltozós statisztikai módszerekkel – diszkriminancia analízis (CVA) és főkomponens analízis (PCA) – dolgoztuk fel és kaptunk értékes információkat, amelyeket eddig elsősorban ökológiai kérdések megválaszolására alkalmaztak.

Kiemeltünk olyan géneket, melyeket eddig nem publikáltak csontanyagcserében és csontitkulásban szerepet játszó faktorokként: *LRP4*, *FKBP2*, *TMSB4X*, *FABP3*, *FABP4*, *TRIB2*.

Kijelöltük a legerősebb diszkriminatív erővel bíró génszettek, amelyek a korrall járó oszteoporozist diagnosztizáló módszer alapjául szolgálhatnak. Álljon itt példaként az a géncsoport, mely a humán referencia géneket kiegészítve a legerősebben választja el egymástól a csontitkulásban szenvedő és kontroll pacienseket: *CKB*, *EIF3S4*, *FKBP2*, *OSTF1*, *SFRS7*. Az általunk futtatott kombinatorikus assay két gén – Immunophilin FK506-binding protein 2 (*FKBP2*) és X chromosomal thymosin beta-4 (*TMSB4X*) – karizmatikus diszkrimináló erejére mutatott rá. A két gén egyikét sem írták le eddig, mint oszteoporozisban vagy csontanyagcserében szerepet játszó faktort.

Ráműtattunk a Wingless szignáltranszdukciós útvonal jelentőségére a csontitkulás kialakulásában. A *CTNNT1*, *LRP4*, *NLK*, *TCF7L2*, *WIF1* expressziók diagnosztikus erejét szemléltettük.

Megerősítettük a feltevést, miszerint a low density lipoprotein receptor-related protein 4 (*LRP4*) gén a Wingless tagja. A PCA eredményei alátámasztották ezt a hipotézist, mivel a Wnt gének – elsősorban a *CTNNT1* – és az *LRP4* expressziója erős korrelációt mutatnak egymással.

Megmutattuk a lehetőségét annak, hogy a korrall járó oszteoporozist akár két, egymástól független – BMP-Hedgehog és Wnt – útvonalban fellépő defektus is okozhatja.

## Összefoglalás

Az ortológ gének szintjén az ember és a gímszarvas nagyon hasonló. Az interakciók eltérései azóta formálódtak, amióta elhagyták a közös őst mintegy 70-80 millió évvel ezelőtt a Kréta és Paleocén idején. A csontritkulás, mint fenotípus mind az ember, mind a gímszarvas evolúciós fejlődésében megjelenik. Miközben tudatában vagyunk a lehetséges eltéréseknek, úgy gondoljuk, hogy a kéttípusú, fiziológias és patológias oszteoporozis mögött húzódo génexpressziós hálózat számos génben átfed.

A gímszarvas ciklikus oszteoporozisa során kialakuló erőteljesebb génexpressziós változásokat követve kiemelhetünk néhány gént, melyek csontmetabolizmus tekintetében újak és eddig nem kerültek az orvosi biológiai kutatások látóterébe. A kiemelt gének humán ortológjainak expressziós aktivitását figyelembe véve világosan és megbízhatóan elkülöníthetjük az egészséges és csontritkult egyedeket egymástól; élesebben, mint azt az eddigi klinikai gyakorlatból és kutatásokból ismert gének lehetővé tették.

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

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

A dolgozatban kiemelt gének csontritkulásban, csontanyagcserében betöltött funkciói még tisztázásra várnak.

## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

2009 augusztus 28.

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

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

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

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

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