

---

**EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM**  
**TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR**  
**BIOLÓGIAI INTÉZET**  
**GENETIKAI TANSZÉK**

**A gímszarvas csontsűrűség változásáért felelős gének azonosítása az  
agancsiklus alatt**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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**

---

## Bevezetés

### A gímszarvas ciklikus fiziológiás oszteoporózisa

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 kincsnek, „hungarikumnak” tekinthető.

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 csontfelépítési 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 (mintegy fiziológiás csonttrikulást 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.

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, így itt jó lehetőség nyílik a csontépítés és csontbontás genetikai hátterének tanulmányozására.

A fejlett országokban, közöttük hazánkban is civilizációs népbetegség az oszteoporózis. Korábbi munkánk során azonosítottunk olyan géneket, amelyek eltérően expresszáltak a gyorsan osztódó agancsszövetekben. A gyors osztódás és az eltérő génexpressziók „agancs” jellemzője, hogy szabályozott keretek között történnek, 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. Eredményeink azt mutatják, 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) transzkripciósi 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.

## 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 visszakeresztelhető 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 - génklónozás, 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 kolléganóm megtalálta a genetikai összefüggést a gímszarvas fiziológiás és az ember patológiás oszteoporózia 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 génextpressziós változásainak leírása
- (iv) az agancs és a váz porcban és csontban a génaktivitások mértékének kvantitatív meghatározása
- (v) a kutatócsoport rendelkezésre álló infrastruktúra fejlesztése

## **Módszerek**

### **Mintavételek**

A munkámhoz szükséges gímszarvas agancs, vázcsont és magzati mintákat Pannon Lovasakadémia bőszenfai szarvasfarmja biztosította. A mintavétel a (243/1998, XII. 31) magyar állatvédelmi törvény szerint történt. A gímszarvas bikák bársonyos-barkás agancsaiból (felső 10-15 cm-es darabja) május-júniusban vettünk mintákat: porc, csont, fejlődő középpág és jég ág közötti terület. A szarvas magzat mintákat (növekedési

porclemmez) december közepétől január közepéig gyűjtöttük a szarvasfarm állományának selejtezési ideje alatt.

A gímszarvas váz csont mintákat az agancsciklushoz kötöttén három időpontban vettük: (i) a vázcsontozat fiziológiás oszteoporózisakor június elején (Stag1), (ii) barka hántásakor azaz a csontos agancs elkészültekor, az oszteoporózis regenerációkor, július közepén (Stag2), (iii) a csont „nyugalmi” állapotában, november végén (Stag3).

#### **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 LiCl<sub>2</sub> oldattal csaptuk ki és 75%-os etanollal mostuk, a szárítást követően 20 µl RNáz-mentes vízben oldottuk fel. Ezt követően DNase I emésztést végzünk. mRNS: az izolálás a Dynabeads Oligo(dT)25 paramágneses gyöngyök segítségével (Dynal Biotech) a gyártó által ajánlott protokoll felhasználásával történt.

#### **Szarvas agancs cDNS microarray platform létrehozása, az „Agancs Chip”:**

A gímszarvas agancs cDNS microarrayt, az „Agancs Chipet” saját magunk készítettük, mivel a kereskedelmi forgalomban gímszarvas microarray nem kapható.

#### **Szarvasmarha Affymetrix oligonukleotid microarray:**

A gyártó előírásai szerint a Bovine 24K Affymetrix microarray platformot alkalmaztuk.

#### **Northern hibridizáció:**

Az analízishez 5 µg total RNS mintát használtunk, amelyet 1,2 %-os formaldehid-agaróz gélen választottuk el. Blottolás: kapilláris technika, HybondN+ (Amersham) membrán. A cDNS próbák: jelölés [ $\alpha$ 32P]dATP –vel, random hexamer primerekkel és E. coli DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega) felhasználásával. Hibridizáció: 65 C°-on, PerfectHyb TM Plus (Sigma) pufferben a gyártó által megadott paraméterekkel. A radioaktív jel detektálása a Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics) segítségével.

#### **In situ hibridizáció agancs szöveteken:**

A különböző protokollok kombinálásával létrehozott eljárásunkat optimalizáltuk az agancs szövetek vizsgálatához. Részletes leírást található a jelen disszertációban (Stéger V, PhD disszertáció, 2011), illetve a Stéger *et al.*, 2010 publikációban.

#### **GC-MS extrakció és metabolit analízis:**

Minta: 60 mg fagyasztott; extrakció, poláris; előkészítés, Nikiforova és mts. (2005) szerint; belső referencia, rabbitol; injektálás, „splitless” mód; Készülék, „quadrupole”

(Finnigan Trace/DSQ, Thermo Electron Corp.); szoftver, XCALIBUR (Thermo Electron Corp.), NIST 2.0 könyvtár.

#### **Bioinformatikai vizsgálatok:**

UNIX szoftver környezetben, BASH és PERL szkriptek alkalmazásával. Promóter szekvenciák elemzése: ENSEMBL és DOOP adatbázisok alkalmazásával (Barta *et al.*, 2005). A motívum keresés: EMBOSS program csomaggal.

#### **Többváltozós transzkriptomikai adatelemzések:**

SYNTAX 2000 program csomag alkalmazásával történet (Podani, 2001).

### **Eredmények és megvitatásuk (tézisek)**

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 csontritkulásban 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 csontritkulása az agancs porc és csont szerves mátrix rendkívül robosztus mineralizációjának (kalcifikálódás, a csont szerves anyagainak kikötése) következménye.

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

#### **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 jelenesség neve ciklikus fiziológiás oszteoporózis. Feltételeztük, hogy azon gének azonosítása, amelyek kapcsolatban vannak az agancsporc jellegzetes szövettani karakterisztikájával, nevezetesen intenzív kalcifikációjával („előcsontosodásával”), 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 porcban upregulált gímszarvas gének hatékony azonosítását és klónozását.

A géneket különböző funkcionális csoportokba soroltuk: ismert csontosodási/referencia gének (8), egyéb (nem csontosodási) gének (6), feltételezett gének (4), „anabolikus/metabolikus” gének (10). Különös figyelmet szenteltünk a csont biológia „referencia” és mátrix génjeinek. A gének 2-10 -szer hevesebben expresszáltak már az agancs chondocitákban és chondroblastokban, mint a magzati növekedési porclemez sejtjeiben. A „referencia” és mátrix gének még nagyobb (10-30 szoros) „upregulációját” mértünk az agancs csontban, amikor azt a vázcsontozathoz hasonlítottuk. Megállapítottuk hogy a „referencia” és mátrix gének a Runx2 és Osx mester regulátorok szabályozása alatt állnak, amelyek maguk is fokozottan expresszálódnak az agancs szövetekben (mezenchima: *runx2*, 6x; *osx*, 26x.; porc: *runx2*, 2,2x; *osx*, 10x ; csont: *runx2*, 7x; *osx*, 63x).

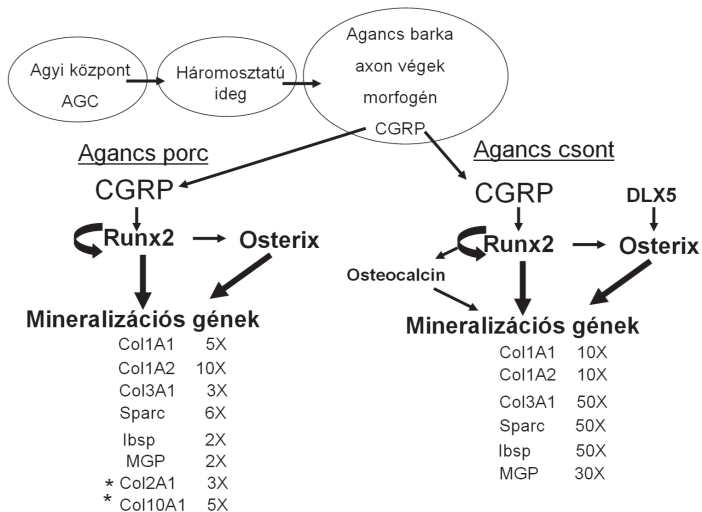
#### **A mineralizáló agancs csúcs: Runx2 útvonal**

Kimutattuk a *runx2* és a szabályozása alatt álló, downstream *osx* gén expresszióját az agancs csúcsi mezenchima sejtjeiben. Ezen két gén heves expressziója egybe esik az agancs csúcs porc és csont mátrix génjei heves expressziójával. Megegyezően ezzel a képpel, nagy mineralizációs göcöket mutattunk ki az agancs porcban, amelyek az agancs csontos részében már csontosodási magvakként funkcionálnak.

#### **Agancs csont: robosztus csontfejlődés**

Az agancs csontszövetében kimutattuk a *runx2* és *osx* rendkívül heves expresszióját, ami egybe esett a mineralizációs gének heves expressziójával, valamint az intenzív fehérjeszintézis energia igényét biztosító *osteocalcin* (*oc*)gén heves expressziójával.

Leírtuk az agancs robosztus mineralizációja epigenetikai útvonalát, amelyet kísérleteink számos ponton igazolnak.



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 csontok értékek: az agancs csontban mért génexpressziók a vázcsontok (csigolya, borda) génexpresszióihoz viszonyítva.

### A gímszarvas oszteoporózisa és az ember csontritkulása

A gímszarvas javasolta gének humán ortológjainak expressziós mintázata alapján (több dimenziós statisztikai elemzésekkel, PCA, CVA) az oszteoporótikus és nem oszteoporótikus pácienseket egyértelműen el tudtuk különíteni.

## Összefoglalás

Célunk volt a gímszarvas agancs robusztus 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 csontritkulását okozza, amelyet később az állat 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 porclemmezhez viszonyítva. Felvettük 15 gén expressziós profilját az agancs csúcsban. 7 gén expresszióját sejt szinten is lokalizáltuk.

A csont mátrix gének (*coll1A1*, *coll1A2*, *col3A1*, *ibsp*, *mgp*, *sparc*, és az *osteocalcin*), valamint mester regulátoraik (*runx2*, *osx*) expresszióit összehasonlítottuk a barkás agancs csontosodó részében a vázcsontozat expresszióival (bordák és csigolyák). Ezen gének expressziója a barkás agancs csontos részében 10-30-szor nagyobb, mint a vázcsontozatban. A génextpressziós 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 mineralizációs gének magas aktivitása miatt a foszfát és az etanolamin-foszfát a vázcsontozatból az agancscsontba áramlik. Összhangban ezzel a vázcsontozatban sokkal erőteljesebb a kollagén bomlása, amelyet a hidroxil porlin koncentrációja jelzett. Az agancs csontban zajló heves protein szintézis nagy energia igényét a glükóz nagy koncentrációja jelezte.

Az agancs robosztus csontfejlődése leírásakor integráltuk a génextpressziós mintázatokat és a kvantitatív metabolit adatokat.

Feltártuk az agancs robosztus mineralizációja (epigenetikai) útvonalát: (i) útvonal az agancs csúcsban (agancs növekedési agyi centrum (AGC) → háromosztatú ideg → agancs barka → CGRP morfogén neuropeptid → Runx2 → Osx → mátrix gének) (ii) útvonal az 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 átvezetni szándékozunk az orvosi kutatásokba: oszteoporózis diagnosztikára és gyógyszerfejlesztési célpontok kijelölésére. Bizonyítottuk, hogy a „gímszarvas javasolta” gének expresszióival egyértelműen diagnosztizálhatók a csonttritkulásban szenvedő betegek.

## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- 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 IF: 2.579
- 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 (2009) Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. *Molecular Genetics and Genomics* 281, 301-313 IF: 2.579
- Villányi Z, Gyurján I, **Stéger V**, Orosz L (2008): Plaque Based competitive Hybridization *Journal of Biomolecular Screening* 13, 80-84 IF: 2.365
- 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: 2.978
- 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, 221-235 IF: 2.978
- Gyurján I, Borsy A, Molnár A, **Stéger V**, Szabolcsi Z, Orosz L (2006): Initiation of bone formation during antler development. *International Conference on Progress in Bone and Mineral Research*, Wien, Austria
- Borsy A, Balla B, Gyurján I, **Stéger V**, Molnár A, Szabolcsi Z, Kósa J, Zomborszky Z, Papp P, Vellai T, Lakatos P, Orosz L (2006): Red deer biology for biomedical research on human osteoporosis. *Calcified Tissues International* 78 (Supp.1): S74

## Tézishez tartozó publikációk:

- Rucklidge G, Milne G, Bos K, 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
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Min D, Behringer R, Crombrughe B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29
- Komori T, (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 9(1):189-195
- 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
- Barta E, Sebestyén E, Pálffy T, Tóth G, Ortutay C, 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):p. 86-90
- Podani J (2001) SYN-TAX 2000. User's Manual. *Scientia Publishing*, Budapest.