SZENT ISTVÁN EGYETEM

A MEZENHIMÁLIS SEJT-DIFFERENCIÁCIÓ TANULMÁNYOZÁSA GÍMSZARVAS (*Cervus elaphus*) AGANCSÁN

Doktori (PhD) értekezés

GYURJÁN ISTVÁN

Gödöllő
2007

A doktori iskola

megnevezése: Biológia Tudományi Doktori Iskola

tudományága: Biológia tudományok

vezetője: Dr. Tuba Zoltán
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar
Növénytani és Növényélettani Tanszék

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

…….. ……..

Dr. Tuba Zoltán
iskolavezető

Dr. Orosz László
témavezető

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék i
Rövidítések iii

1. Bevezetés 1
2. Irodalmi áttekintés 5
2.1. A vázfejlődés áttekintése 5
2.1.1. A tengelyváz kialakulása 6
2.1.2. Kraniofaciális csontfejlődés 9
2.1.3. A függelékváz kialakulása 11
2.1.4. Mezenhimális kondenzáció 13
2.1.5. Az endokondrális csontosodás és a növekedési porclemez 16
2.2. Az agancsfejlődés 22
2.2.1. Szisztémikus hatások 23
2.2.2. Lokális hatások 25
2.2.3. Az agancsnövekedés idegrendszeri szabályozása 27
2.3. A gímszarvas genetikai jellemzői 28
3. Anyag és módszer 31
3.1. Mintavétel 31
3.2. RNS izolálás 31
3.3. cDNS szintézis és könyvtárak létrehozása 32
3.4. Microarray konstrukció 33
3.5. Próbakészítés és microarray hibridizáció 33
3.6. Az adatok beolvasása és kiértékelése 34
3.7. Klónozási eljárások 34
3.8. Valós-idejű mennyiségi RT-PCR 35
3.9. In situ hibridizáció agancs metszeteken 35
3.10. Hibridizáció teljes egér embriókon és egér embrió metszeteken 36
3.11. A rekombináns mC21orf70 fehérje szub-celluláris lokalizációja 36
3.12. Túltermeltetési teszt RCS sejtekben és szemikvantitatív RT-PCR 37
3.13. Northern hibridizáció 38
3.15. Standard pufferek 38
4. Eredmények 41
4.1. A vizsgált agancsminták és a növekedési poclemez szövettani leírása 41
4.2. Az egér cDNS microarray-en detektált agancs génexpressziós profil 42
4.3. A szarvas ortológ gének azonosítása 44
4.4. A microarray adatok validálása 46
4.5. A szarvas C21orf70 mRNS in situ lokalizálása agancsban 48
4.6. Az egér C21orf70 mRNS in situ lokalizálása teljes embriókon és metszeteken 50
4.7. Rekombináns mC21orf70 fehérje sejten belüli lokalizálása 53
4.8. Az egér C21orf70 fehérje túltermeltetése 55
4.9. Az agancs csontosodás kezdetének vizsgálata 57
4.10. Új tudományos eredmények 60
5. Következtetések és javaslatok 63
5.1. Az agancsregeneráció és heterológ microarray hibridizáció 63
5.2. Az agancsnövekedés és szignál útvonalak 64
5.3. Negatív szabályozás az agancsfejlődésben 65
5.4. Polycomb fehérjék 66

5.5. Következtetések a C21orf70 fehérjét illetően 66
5.6. Az Osterix megnyílvánulása, a porc- és csonfejlődés kapcsolódása agancsban 68
5.7. Javaslatok 69
6. Összefoglalás 73
6. Summary 75
7. Mellékletek 77
7.M1. Irodalomjegyzék 77
7.M2.2. 2. táblázat 93
7.M2.3. 3. táblázat 94
7.M2.4. 4. táblázat 95
7.M2.5. 5. táblázat 96
7.M2.6. 6. táblázat 98
7.M.3. 99
8. Köszönetnyílvánítás 100

Rövidítések jegyzéke

ACTRII	Activin receptor IIA
AER:	Apical ectodermal ridge
AFLP:	Amplified fragment length polymorfism
AGC:	Antler growth center
AGC-1:	Aggrecan-1
ALP:	Alkálikus foszfatáz
AP:	Antlerogenic periosteum
BMP:	Bone morphogenetic protein
BSA:	Bovine Serum Albumin
Cart1:	Cartilage homeoprotein 1
Cbfa:	Core binding factor
CHAPS:	3-[(3-Kolamidopropil)dimetilammonio]-1-propánszulfonát
Cre:	Cre-rekombináz
CMV:	Cytomegalovirus
Dlx:	Distall-less homeobox
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO:	Dimetil-szulfoxid
DTT:	Ditiotreitol
ECM:	Extracelluláris mátrix
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGFP:	Enhanced green fluorescence protein
En	Engrailed
ER:	Ösztrogén receptor
EST:	Expressed sequence tag
FACS:	Fluorescence activated cell sorter
FCS:	Fetal Calf Serum
FGF:	Fibroblast growth factor
FGFR:	Fibroblast growth factor receptor
GAG:	Glükóz-amino-glikán
GDNF:	Glia-cell derived nerve factor
GH:	Növekedési hormon
HES:	A *Drosophila* Hairy/Enhancer of split ortológjai
IGF:	Insulin-like growth factor
IHH:	Indian hedgehog
Lfnf	Lunatic fringe
LMX:	Lim homeobox transcription factor
MAE:	Mops-edta
MAP:	Mitogene activated protein kinase
MOPS:	4-Morfolino-propán-szulfonsav
MSC:	Mesenchymal stem cell
MSX:	A *Drosophila* Msh (Muscle segment homeobox) gerinces ortológja
MTT:	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]
NCAM:	Neural cell adhesion molecule
NT-3:	Neurotrophin-3
OSX:	Osterix
PFU:	Plaque forming unit
PSM:	Presomitic mesoderm

PTH:	Parathyroid hormon
PTHrP:	Parathyroid hormon related peptide
QTL:	Quantitative trait loci
R26R:	Rosa 26 reporter
RA:	Retinoic acid
RALDH:	Retinaldehid-dehidrogenáz
R-Fng	Radical fringe
RUNX:	Runt-related transcription factor
SHH:	Sonic hedgehog
SDS:	Nátrium-dodecil-szulfát
SSC:	Konyhasós nátrium-citrát
TBE:	Trisz-bórsav-edta
TGF:	Transforming growth factor
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
WNT:	A Drosophila Wingless ortológjai
ZPA:	Zone of polarizing activity

1. BEVEZETÉS

A gímszarvas bika pompás agancsával mindig is lenyűgözte az embereket, amely a csodaszarvas legendáján keresztül a magyar mitológiának is részévé vált. Mesés fejdíszét nem csak harcolásra használja tulajdonosa; leginkább az erőfölény organikus reklámtáblája, amely elrettenti a hárem birtoklására törekvő vetélytársakat, az agancsban található nagyszámú faggyúmirigy termelte illatanyagok pedig vonzzák a gyengébbik nemet. Az agancs változatos elágazásával jól beleillik a szarvas fás-bokros erdei élőhelyébe, mintha gazdája is ágakat viselne a fején. Az agancs növekedése is szép párhuzamot mutat a mérsékeltövi erdők növényzetének évszakonkénti változásával: tavasszal rügyet hajt, a kétszikű növényekhez hasonlóan csúcsi növekedéssel fejlődik, majd miután betöltötte funkcióját, a fák leveleihez hasonlóan lehullik. Ezt nevezzük az agancsciklus folyamatának, amely folyamatban nyilvánvaló szerepe van a fotoperiódusnak is. Jó példa erre a szambar szarvas esete. Míg Indiában (szubtrópusi éghajlat alatt) a szambar szarvas (Rusa unicolor) csak 2-3 évente váltja az agancsát, addig az egyenlítő mentén élő alfaja csak egy pár agancsot visel egész életében (Hall BK, 2005). Az Indiában élő szambar Európába szállítván, megváltoztatja szokásait és évente váltja agancsát (Széchenyi Zs., 1978).

Az agancsnak már ősidők óta gazdasági jelentősége van, a minél nagyobb trófea birtoklása társadalmi presztízst jelent. Az ősi kínai gyógyászat a barkás-bársonyos agancsot sikeresen alkalmazta, mint afrodiziákumot, hiszen számos biológiailag aktív komponenst tartalmaz. Az agancsból jelenleg is számos országban különböző készítményeket gyártanak, amelyeket étrend-kiegészítőkként forgalmaznak. Az egyik legnagyobb agancs exportőr Új-Zéland, ahol nemcsak az agancs-, de a szarvashús termelés is nagyüzemi méreteket ölt. Ennek kapcsán, Új-Zélandon elkezdték a szarvas genom térképezését, amely elsősorban a mennyiségi jellegekhez kapcsolt genetikai markerek (QTL) keresését jelentette. Ez a munka vezetett a szarvas egy genetikai különlegességének felismeréséhez. Amikor a gímszarvast keresztezték a Dávid-atya szarvassal (milu - *Elaphurus davidianus*), azt tapasztalták, hogy az F_1 populáció egyedei eltérést mutattak Haldane faj-hibridekre vonatkozó szabályától; a bikák fertilisek voltak, a tehenek pedig sterilek. Ez azért nagyon előnyös, mivel csak néhány F_1 hibrid bika egyed felhasználásával, több száz gímszarvas tehenet lehet megtermékenyíteni és ezáltal nagyszámú egyedből álló F_2 „back-cross” populációt létrehozni, amely a géntérképezéshez szükséges.

Természetesen gímszarvas terén Magyarország a világnagyhatalom, amelyen nem az egyedszámot értem, hanem a genetikai állományt, hiszen a világon hazánkban esnek el a

legjobb minőségű agancsot viselő bikák. Ennél fogva a magyarországi gímszarvas állomány nemzeti kincsnek, „hungarikumnak” tekinthető.

Az agancs és az agancs képződés mindig is foglalkoztatta a természetbúvárokat és az utóbbi néhány évtizedben rájöttek, hogy orvos-biológiai szempontból is nagy jelentőséggel bír az agancsnövekedés folyamatának jobb megismerése. Az agancsképződés folyamata ugyanis modellként szolgálhat két fontos biológiai jelenség, a szervregeneráció és a sejt-differenciáció jobb megismerésében. Az állatvilágban az emlősök között a szarvasfélék (*Cervidae*) agancsregenerációja az egyetlen példa egy szerv teljes regenerálására, amely ráadásul nagyon rövid idő alatt játszódik le. A gímszarvas 100-120 nap alatt „rakja” fel új agancsát, a növekedés üteme 1-2 cm egy nap alatt ágvégenként, amelynek eredménye az akár 14-17 kg-os kapitális trófea. Ez azt jelenti, hogy ha összegezzük az összes ág szövetgyarapodását, az naponta 100 grammot is kitehet. A szarvasagancs szövettani vizsgálata azt is kiderítette, hogy az erőteljes csúcsi növekedésért egy differenciálatlan mezenhima sejtpopuláció intenzív osztódása tehető felelőssé. A folyamat úgy is felfogható, mint egy embrionális csontfejlődés egy adult élőlényben. Az agancs mezenhima differenciációs képessége nagyon hasonló a mezenhimális őssejtek (MSC) jellemzőihez. A mezenhimális őssejtekről jól ismert, hogy különféle sejttípusokká képesek fejlődni, mint pl. csont-, porc-, izom-, fibroblaszt- vagy zsírsejtekké. A velőléc eredetű „ektomezenhima” sejtek (amennyiben az MSC-hez sorolhatóak) emellett még pigmentsejtekké, kromaffin sejtekké és az idegrendszer néhány sejttípusává is képesek differenciálódni.

Véleményem szerint a szarvas embrionális fejlődése során elkülönülő agancsképző sejtek velőléc eredetűek, amelyek a fejlődés során a homlokcsontra kizáródva megtartják a fejlődési potenciáljukat, csak pubertás korban kezdenek el tovább differenciálódni. Az agancs mezenhima fejlődési potenciálja azonban jelenleg még kevéssé ismert, de a differenciációs mechanizmusának feltárása sok új ismeretet szolgáltathat a regeneráció, valamint az őssejtek fejlődési folyamatának megismerésében.

Munkánk során célunk volt, hogy az agancs és a magzati növekedési porclemez expressziós mintázatának összehasonlításával,

(i) génexpressziós szinten megismerjük az agancs mezenhima porc- (ill. csont-) irányú fejlődésének folyamatát,

(ii) összehasonlítsuk az agancsfejlődést (amely módosult endokondrális csontfejlődésnek tekinthető) a vázcsontozat kialakulásával, ezáltal olyan géneket találva, amelyek felelősek lehetnek az agancsporc robosztus fejlődéséért, valamint

(iii) a mezenhimális differenciáció kapcsán talált, ismeretlen funkciójú géneket az embrionális csontfejlődés folyamatához kapcsoljuk különböző modell rendszerek felhasználásával.

A kitűzött célok eléréséhez, az expressziós mintázatok összehasonlítására alkalmas AFLP-alapú Differential Display-, valamint microarray hibridizációs módszereket alkalmaztunk (heterológ és homológ rendszerben). Jelen dolgozat egy heterológ microarray hibridizáció eredményeit, az eredmények kiértékelését, és egy ez idáig ismeretlen funkciójú gén jellemzését tartalmazza. A többi módszer során kapott eredmények kollégáim doktori értekezéseit képezik.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A vázfejlődés áttekintése

A vázrendszer többféle funkcióval rendelkezik, egyrészt tartást ad a testnek és meghatározza az alakját, másrészt megvédi a sérülékeny belső szerveket a külső behatásoktól, képessé teszi a testet a mozgásra, elsődleges tárlóhelye az ásványi anyagoknak valamint a vérképzés folyamatának is otthont ad. A vázrendszert két fő részre oszthatjuk: a tengelyvázra és a függelékvázra. A tengelyvázhoz sorolhatjuk a koponyát, a csigolyákat, a szegycsontot és bordákat, míg a függelékvázhoz a végtagok csontjai tartoznak. A koponya két fő egységből tevődik össze: egyrészt a kondrokrániumból, amelynek elemei először porc formájában jelennek meg, ide tartozik a koponyaalap, a belső fület körülvevő kapszula, az orr szervei; másrészt a koponyaboltozatból és az arccsontozat felső részéből, amelyek differenciálatlan mezenhima sejtek közvetlen csontsejtekké fejlődésével jönnek létre.

A vázrendszer sejtjei három különböző embriológiai eredetű sejtvonalhoz sorolhatók: a velőléc sejtjei hozzák létre a kraniofaciális vázat; a szomitákból (vagyis a paraxiális mezodermából) alakuló szklerotómok hozzák létre a tengelyváz elemeit; valamint az oldalsó lemez mezoderma sejtjei hozzák létre a függelékváz elemeit.

A vázrendszer kialakulása a mezoderma és velőléc eredetű sejtekből négy fő fázisra bontható:

(1) sejtsors elkötelezettség és determináció, mintázatképzés és a sejtek migrációja a leendő vázelem kialakulásának helyére,

(2) a mezenhima (vagy ektomezenhima, amely a velőléc eredetű sejteket jelöli) sejtek interakciója egy epitél sejtréteggel, amely

(3) sejtkondenzációk kialakulásához vezet, végül

(4) a differenciáció kondroblaszt vagy oszteoblaszt sejttípusok irányába (Hall BK és Miyake T, 1995).

A csontfejlődésnek két fő formáját különböztetjük meg. Az endokondrális 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 porc-oszlopok pedig alapot biztosítanak az oda települő oszteoblasztok részére. Az intramembrán (régebbi nevén dezmális) csontosodás során a kondenzálódott mezenhima sejtek közvetlenül oszteoblasztokká alakulnak a csontosodási centrumokban átmeneti porctemplát kialakulása nélkül. Intramembrán csontosodás által jönnek létre a kraniofaciális csontok, valamint a kulcscsont oldalsó része; endokondrális csontosodás pedig a végtagok csövescsontjaira, a koponyaalap csontjaira, csigolyatestekre, bordákra és a kulcscsont középső részére jellemző.

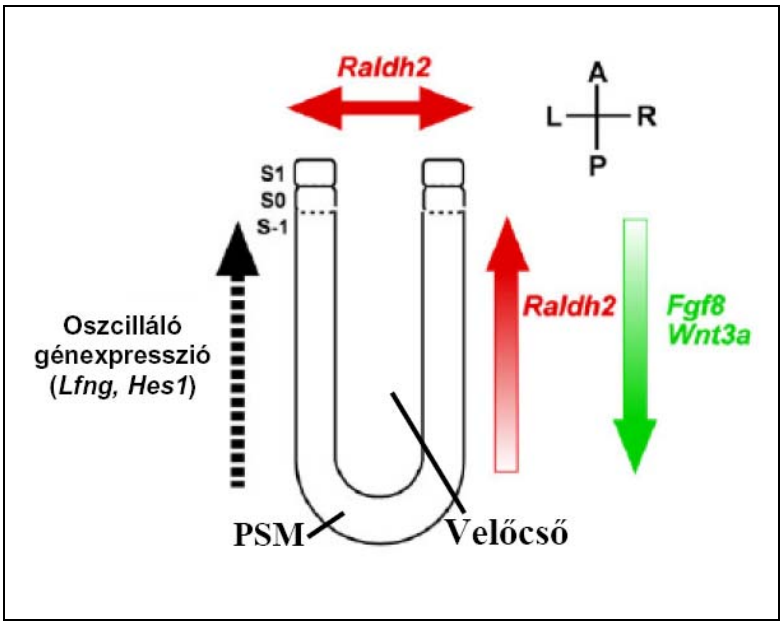
Itt említeném meg a Krompecher István által leírt primér angiogén csontosodást, amely az erek körüli kötőszövet csontosodását jelenti, pl. a koponyacsontok varratképződése folyamán. Sajnos erről a csontosodási formáról a nemzetközi irodalomban nem található információ, feltehetően az intramembrán csontosodáshoz sorolják.

2.1.1. A tengelyváz kialakulása

A tengelyváz kialakulása szoros összefüggésben van a paraxiális mezoderma szelvényezettségének létrejöttével. A gasztruláció során a paraxiális mezoderma elkülönül az axiális és oldalsó mezodermától és létrehoz két megegyező szegmentálatlan mezodermacsíkot a velőcső két oldalán, amelyet preszomitikus mezodermának (PSM) neveznek. Gerincesekben ez a preszomitikus mezoderma hozza létre a tengelyvázat, a törzs- és végtagok izmait, valamint a törzs dermiszének és erezetének egy részét. Ez a még nem szegmentált szövet különböző molekuláris és morfogenetikai változások során szegmentálódik és létrejönnek a velőcső két oldalán a gyöngyfüzérszerűen megjelenő szomiták. Ezt a folyamatot szomitogenezisnek hívjuk és az új szomiták létrejötte szigorúan kranio-kaudális irányban történik. A preszomitkius mezoderma állandó méretét új sejtek toborzása a primitív csík felől, valamint a sejtek szöveten belüli osztódása tartja fent. A szomiták kialakulását megelőzi a preszomitikus mezodermasejt blokkok epitelizációja, amelynek során oszlopos epitél sejtekből álló gömbök jönnek létre, amelyek üregében (somitocöl) mezenhimasejtek találhatók. A környező szövetekből érkező szignálok hatására, a szomiták ventrális sejtjei epitelio-mezenhimális átalakuláson mennek keresztül és a gerinchúr irányába vándorolnak, ahol körülveszik azt és a velőcsövet. Így jönnek létre a szklerotómok, amelyekből a csigolyatestek és bordák fejlődnek.

A szomiták létrejöttének folyamatában két különböző molekuláris útvonalat feltételeznek. Az egyiket „szegmentációs óra” mechanizmusnak (Palmeirim I *et al.*, 1997) nevezik. Ennek során, szabályos időközönként ún. molekuláris oscillátor gének (pl. c-hairyI és lunatic fringe) expresszálódnak és hullámszerűen söpörnek végig a PSM-ben, farki-feji irányban (1. ábra). A másik fontos útvonal az ún. Notch/Delta szignál útvonal jelenléte. Ennek során a Notch transzmembrán receptor megköti a szomszédos sejt felszínén található Delta ligandot, amely szignált indít el a sejt belsejébe és „downstream” target gének (pl. *Hes1/Hes5*) expresszióját indítja el. Egérben izolált mutánsok igazolták, hogy a célgének által kódolt fehérjék részt vesznek a rosztro-kaudális szomita-határok kialakításában (Dubrulle J és Pourquié O, 2004).

Az új szomiták kialakulásának folyamatában az FGF8/Wnt3a és RALDH gradienseknek is fontos szerep jut, ezek a morfogének ellentétesen hatnak egymással.



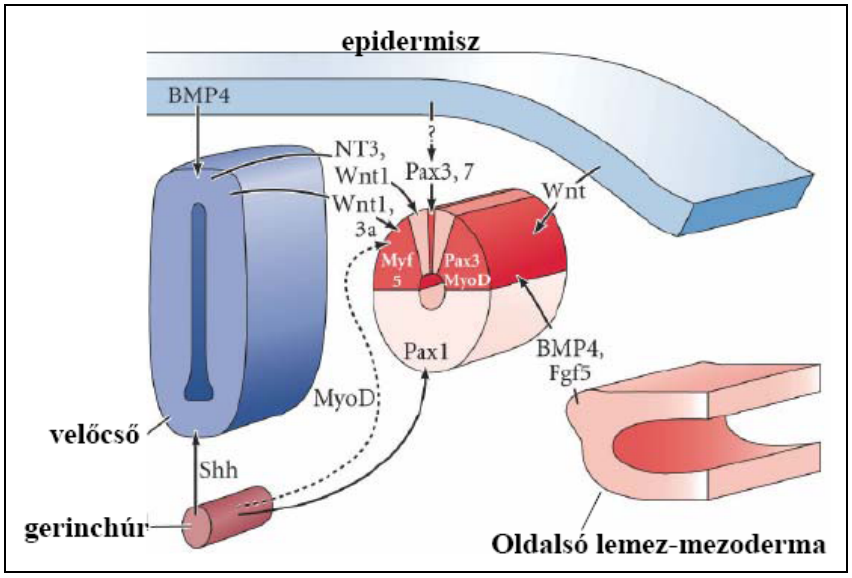
1. ábra

A szomitogenezist szabályozó fő szignál molekulák.

A szomitaképzés mechanizmusát az ún. szegmentációs óra mechanizmus biztosítja, az ún. molekuláris oszcillátor gének, PSM-ben történő, periodikus expresszióján keresztül. A szaggatott nyíl a PSM felől az új szomiták létrejöttének irányát jelöli. Ezzel egy irányban egy retinsav-szignál grádiens, ellentétes irányban pedig FGF8/Wnt3a grádiens hat. A kétirányú nyíl a jobb-bal szimmetriát befolyásoló RA szignált jelöli. S-1: még szegmentálatlan PSM szomita egysége; S0: éppen kialakuló szomitomér, S1: már kialakult szomitomér (adaptálva: Gridley T, 2006).

Azt, hogy az anterior-poszterior tengely mentén milyen típusú csigolyák jelennek meg, alapvetően a Hox gének expressziója szabja meg (McGinnis W és Krumlauf R, 1992). A paralóg csoportok 3'-vég felé eső génjei az embrióban leginkább az elülső testfélben jelennek meg, míg az 5'-vég génjei egyre inkább az embrió hátulsó testfelében expresszálódnak. A dorzo-ventrális tengely kialakulásában alapvető jelentősége van a Pax géneknek. A szomiták kialakulását követően a *Pax3* gén expressziója lecsökken a ventrális epitéliumban és a somitocöl mezenhima sejtjeiben, míg a szomita dorzális falában megmarad az expressziója. A ventrális epitél sejtek mezenhimális visszaalakulását és a sejtek kiszakadását a szomitákból a Pax1 gén expressziója előzi meg. Tehát a *Pax1/Pax3* gének ellentétes expressziója hozza létre

a szomiták dorzo-ventrális kompartmentjeinek elkülönülését (2. ábra). A ventrális szomitasejtek vándorlását és elhelyezkedését a gerinchúr körül elsősorban az Shh szabályozza (Johnson RL *et al*., 1994), amelyet a gerinchúr, valamint a velőcső ventrális sejtjei szekretálnak (epitéliális-mezenhimális interakció). Az *Shh* expresszióját egy BMP antagonista, a *Noggin* gén expressziója tartja fent (McMahon JA *et al*. 1998).



2. ábra

A szklerotóm és a dermamiotóm kialakításában részvevő legfontosabb szignál mechanizmusok (adaptálva és módosítva: Gilbert SF (ed), 2002)

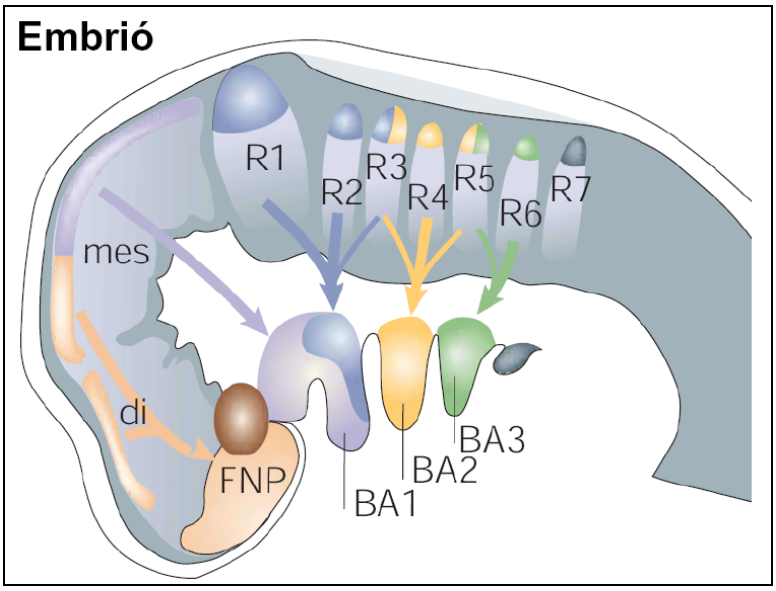
Érdemes megemlíteni a szklerotómok kialakulása során bekövetkező újra szegmentálódási folyamatot. Az egyes szklerotómok ugyanis nem közvetlen derivátumai az egyes szomitáknak, hanem egy feji vég felé eső szomita caudális felének valamint a következő szomita craniális felének fúziójából tevődnek össze (a *Drosophila* testszelvényeinek kialakulásához-, vagyis a lárvális paraszegmentumok és imágók szegmentumainak viszonyához hasonlóan).

A szklerotóm sejtek vándorlása során a ventromediális, Pax1-et expresszáló sejtek a gerinchúr körüli (perinotokordális) teret telepítik be. Ezek a sejtek a *Twist* és *Scleraxis* marker géneket is expresszálják, amelyek Shh szignál alatt állnak. A szklerotóm sejtek által körülvett gerinchúr sejtek elhalnak, itt alakulnak ki a későbbi csigolyatestek, a szklerotómok közötti térben a gerinchúr megmarad és a porckorongok *nucleus pulposus*-ának ad életet. Nem az összes szklerotóm sejt vándorol azonban a gerinchúr köré. A ventromediális és dorzolaterális sejtek dorzomediális irányba vándorolnak és a csigolyaívet, valamint a tüskenyúlványt hozzák

létre. Ezek a sejtek különböző mikrokörnyezetben vannak, mint a ventrális sejtek, ezért eltérő hatások érik őket. Az itt jelenlévő sejtek az *Msx1/Msx2* homeobox géneket expresszálják (és Pax1 negatívak). A környezetet a velőcső tetőlemeze és a dorzális ektoderma jelenti, ahol a BMP4 tranziensen expresszálódik, és úgy tűnik ez utóbbi pozitív hatással van ezekre, az ún. dorzalizáló gének megnyilvánulására (Monsoro-Burq1994, 1996).

2.1.2. Kraniofaciális csontfejlődés

A kraniofaciális csontfejlődés kapcsán számos ún. mintázatképző (patterning) gént izoláltak, amelyek a velőléc sejtek migrációjáért és fejlődéséért felelősek. Ez nem meglepő, hiszen a kraniofaciális csontok nagy többsége velőléc eredetű (Bronner-Fraser M, 1994; Noden DM 1991). A velőlécsejtek a velőcső dorzális falától indúlva vándorolnak és betelepítik a kopoltyúíveket és a frontonazális régiót, ahol számos szövetféleségnek adnak életet, ezen belül a csont- és porcszövetnek is (3. ábra). A középagy hátulsó-, az első és második rombomér (és részben a 3. rombomér) szintjéről induló velőlécsejtek az első kopoltyúívet telepítik be és létrehozzák a felső és alsó állkapcsot, az üllő- és kalapácscsontot, valamint a halántékcsont egy részét. A negyedik rombomér (és részben a 3. és 5. rombomér) szintjéről érkező sejtek a második kopoltyúívet telepítik be és létrehozzák a kengyelcsontokat, a halántékcsont sztiloid nyúlványát és a nyelvcsont egy részét (Noden, 1983). A velőlécsejtek némely koponyacsont, pl. a homlok- és falcsont kialakításáért is felelősek (Couly GF *et al*., 1993), bár ez fajonként eltérhet. Jelenleg a régebbi sejtkövetéses és transzplantációs kísérletek helyett a legelfogadottabb eljárás a velőlécsejtek nyomon követésére egy transzgénikus egér modell felhasználása, ahol a *Wnt1* promóterhez kötött Cre aktivitással lehet vizsgálni a velőlécsejtek sorsát *LacZ* expresszión (*Wnt1-Cre/R26R*) keresztül (Jiang X, *et al*., 2002). A velőlécsejtek elkötelezettsége a vázfejlődés irányába nagyban az epiteliális interakcióktól függ (Langille RM, 1994). Mint látható, a velőlécsejtek mind az endokondrális-, mind az intramembrán csontosodásban részt vesznek.



3. ábra: A feji velőléc-sejtek migrációja az embrióban.

FNP: frontonazális nyúlvány; BA: kopoltyúív; R: rombomér; di: diencephalon; mes: mesencephalon (adaptálva: Santagati F és Rijli FM, 2003)

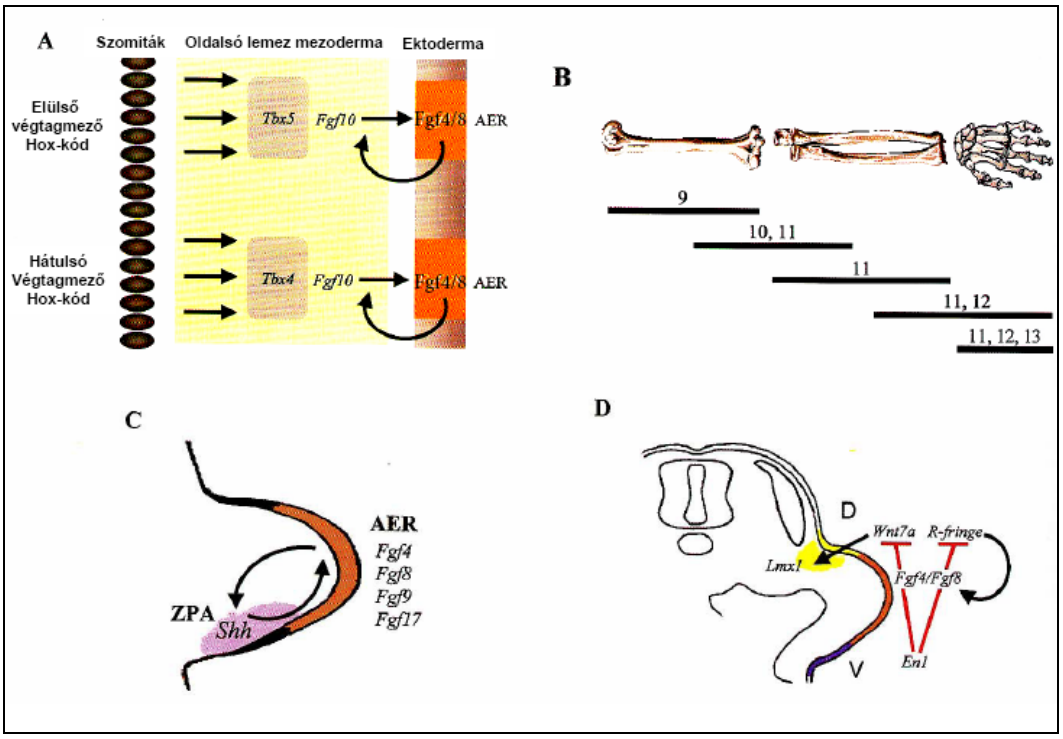
A fej csontos vázának kialakításában nagyon sok gén szerepét írták le. Ezek közé tartoznak a homeobox-motívumot tartalmazó transzkripciós faktorok, mint pl. a goosecoid (Gsc) (Rivera-Perez JA *et al*., 1999), a *Dlx* géncsalád tagjai (Qiu M *et al*., 1997; Ferguson CA *et al*., 2000), az *Msx1* (Satokata I és Maas R, 1994), a Cart1 (Zhao Q *et al*., 1996), valamint *Hox* gének (Hunt P *et al*., 1998; Rossel M és Capecchi MR, 1999). A Dlx5 homeodomén transzkripciós faktor a fej csontos vázának kialakítása mellett még számos folyamatban részt vesz, pl. a végtagmezők specifikációjában, az AER aktivitásában, valamint az oszteoblaszt differenciáció mellett a porcsejtek érésében is (Ferrari D és Kosher RA, 2002). Megemlíteném még a „polycomb" csoport génjeit, mint pl. a *rae28* (Takihara Y *et al*., 1997), a Twist bázikus „helix-loop-helix" transzkripciós faktor szerepét (El Ghouzzi V *et al*., 1997), valamint az *AP-2, Mf1* és *Pax* géneket (Schorle H *et al*., 1996; Kume T *et al*., 1998). Számos citokin és növekedési faktor szerepét is leírták a kraniofaciális csontfejlődés kapcsán, mint pl. a BMP4 (St Amand TR *et al*., 2000), Fgf8 (Trumpp A *et al*., 1999), Tgf-α (Miettinen PJ *et al*., 1999). A velőléc eredetű ektomezenhima sejtek pontos térbeli elhelyezkedésében a sejt-sejt, sejt-mátrix interakciók alapvető fontosságúak. A G-protein kapcsolt endothelin-A receptor (ET_A) az ektomezenhima sejtek felszínén található, míg a ligandja, az endothelin-1 a kopoltyúívek epitéliumában és a paraxiális mezoderma eredetű kopoltyúívmagban expresszálódik (Clouthier DE *et al*., 1998; Burke D *et al*., 1998). Az endotelin-1 vagy receptorának hiánya számos kraniofaciális defektushoz vezet (Kurihara *et al*., 1994). Habár a

velőlécsejtek migrációja normálisnak tűnik az ET_A-null embriókban, számos epitéliális-mezenhimális interakcióban szerepet játszó gén (*Gsc, Dlx2, Dlx3, dHAND, eHand, Barx1*) expresszója megszűnik, vagy lecsökken (Clouthier DE *et al*., 2000).

2.1.3. A függelékváz kialakulása

A végtagok az oldalsó mezodermalemezből alakulnak ki, ahol a megfelő Hox kód szabja meg a létrejövő elülső- és hátulsó végtagok pozícióját (Ruvinsky I és Gibson-Brown JJ, 2000). A megfelelő Hox pozícionális kód hatására (4/A ábra) a vállövben és a medenceövben két féle T-boksz gén expresszálódik, amelyek felelősek a végtagmezők kialakulásáért: a *Tbx5* az elülső (Chapman DL *et al*., 1996), a *Tbx4* a hátúlsó végtagmezők (Isaac A *et al*., 1998) kialakításában vesz részt, amely utóbbi a Pitx1-en keresztül fejti ki a hatását (Logan M és Tabin CJ, 1999). A gerincesek végtagjai nagyon összetett szervek, amelyek mintázatképzése három különböző tengely menti specifikációt igényel.

A proximo-disztális tengelyt az ún. apikális ektoderma-redő határozza meg (AER). Első lépésben a leendő végtag kialakulásának a helyén FGF10 molekulák szintetizálódnak az oldalsó mezodermalemezben és kötődnek a felettük elhelyezkedő AER FGFR2 receptoraihoz. Ez nélkülözhetetlen szignálnak tekinthető, hiszen egér null-mutánsokban (Fgfr2, Fgf10) egyáltalán nem alakul végtag (Min H *et al*., 1998; Xu X *et al*., 1998). A fenti folyamat hatására Fgf4 és Fgf8 expresszálódik az AER-ben, amely az alatta elhelyezkedő mezodermában fenntartja az Fgf10 expressziót, így elősegíti a végtagkezdemény hosszanti növekedését (epitéliális-mezenhimális interakció)(4/C ábra). Közvetlenül az AER alatt található az ún. fejlődési zóna, amely differenciálatlan és folyamatosan osztódó mezenhima sejtekből áll. A törzshöz közelebb eső területen a mezenhimasejtek elkezdenek tömörülni és a végtag porcszövetévé differenciálódni. A differenciáció megindulásának az időzítését a végtag hossztengelye mentén szintén a Hox gének expressziója szabja meg (4/B ábra). Célzott mutációk segítségével kiderítették, hogy a 9-es és 10-es paralóg-csoport felelős a felkar-; a 10-es, 11-es és 12-es csoport az alkar-; míg a 11-es, 12-es és 13-as csoport az ujjak identitásának a kialakításáért (Zákány J és Duboule D, 1999).



4. ábra: A végtagok mintázatképzésének molekuláris szabályozása.

A: A végtagmezők helyzetének kialakulása (adaptálva: Ruvinsky és Gibson-Brown, 2000). **B:** A *HoxA* és *HoxD* gének szerepe a végtagok specifikációjában (adaptálva: Zákány és Duboule, 1999). **C:** Az anterior-poszterior tengely kialakulása a végtagokban. **D:** A dorzális-ventrális tengely kialakulása a végtagokban (adaptálva: Niswander, 1997).

Az anterior-poszterior tengelyt az ún. polarizációs aktivitással rendelkező zóna (ZPA) határozza meg, amely a végtagok hátulsó részének a testfal találkozásánál lévő, mezoderma része. Az itt megnyilvánuló Shh szignál a legfőbb molekuláris determinánsa az anterior-poszterior tengely kialakulásának (Riddle RD *et al*., 1993). Az *Shh* gén „loss-of-function" mutációja a disztális végtagstruktúrák teljes hiányához vezet (Chiang C *et al*., 1996). Az apikális ektoderma-redő és a ZPA között egy poztitív „feedback" hurok müködik: a ZPA-ban expresszálódó Shh a Formin és Gremlin molekulákon keresztül aktiválja az AER-ben az Fgf4 szintézisét (Zeller R *et al*., 1999; Zuniga A *et al*, 1999). Az Fgf4 viszont fenntartja a ZPA-ban a Shh expresszióját (Niswander L *et al*., 1994), ezáltal a két szignalizációs központ működése is koordinálódik. Az Shh a BMP génexpressziót is szabályozza (Bmp-2, -4 és -7), amely grádiens megnyílvánulása következtében indukálja a Hox génexpressziót az AER-ben és a fejlődési zónában (Ovchinnikov DA *et al.,* 2006).

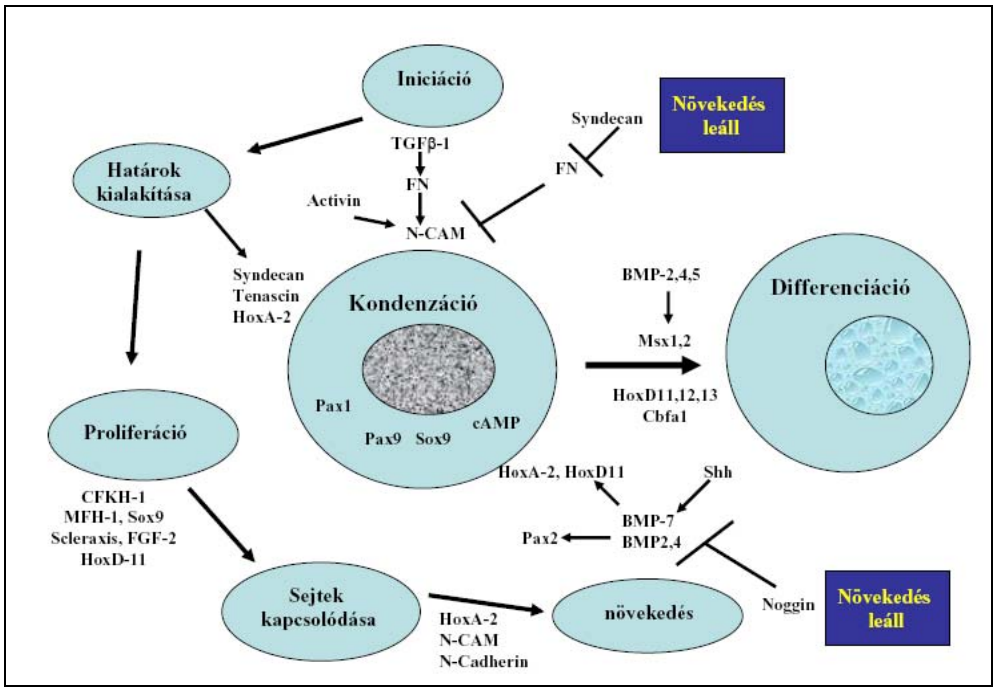
A dorzo-ventrális tengely kialakulása a legkevésbé ismert a végtagok mintázatképzésének folyamatában (4/D ábra). Úgy tűnik a Wnt7a, Radical fringe (R-fng) és az Engrailed-1 (En-1)

molekuláknak esszenciális a szerepük (Niswander L, 1997). A dorzális ektodermában expresszálódó Wnt7a szabályozza a dorzális mezenhimában az Lmx1 megnyilvánulását, amely gén fontos a dorzális hovatartozásért. Az R-fringe szintén a dorzális ektodermában expresszálódik és meghatározza az AER pozícióját (Laufer E. *et al*., 1997). Az En-1 pedig a dorzális végtagfélre korlátozza az R-fng, Wnt7a és az Lmx1 megnyilvánulását.

2.1.4. Mezenhimális kondenzáció

A mezenhima sejtek kondenzációja mind az endokondrális, mind pedig az intramembrán csontosodást megelőzi, a sejtek elkötelezettsége azonban már részben determinált, részben a szöveti környezet dönti el, hogy csont vagy porc irányban folytatódjon a fejlődés. A kondenzációk létrejötte nem csak a vázelem pozícióját, de annak alakját is meghatározza. Mivel ez a folyamat esszenciálisan kapcsolódik munkámhoz, ezért bővebben kitérek a folyamat transzkripciós szintű szabályozására.

A mezenhima kondenzáció többlépcsős folyamatként ábrázolható, amelynek részei az iniciáció, a kondenzációs határok meghatározása, proliferáció, sejtadhéziók kialakítása, növekedés és végül a differenciáció. Az iniciáció az epitéliális-mezenhimális interakció következményének tekinthető, amely számos kondenzációs gént aktivál. A folyamat legfontosabb determinánsait az 5. ábra foglalja össze (Hall BK és Miyake T, 2000). Jelentősebb részvevői a sejt-sejt, sejt-mátrix interakciókban részvevő sejtadhéziós molekulák, mint pl. az N-cadherin, NCAM (Ncam1), Tenascin-C (Tnc), Versican és Thrombospondin-4. A kondenzáció előrehaladtával megjelennek a sejt-aggregátumok közepén az elő-porcsejtek ill. a pre-oszteoblasztok, és fokozatosan kikapcsolódik a mezenhimális és kondenzációs marker gének expressziója.



5. ábra: A mezenhimális kondenzáció modellje és szabályozó molekulái.

(adaptálva: Hall BK és Miyake T, 2000)

A sejtek elkötelezettségében alapvető jelentőségű a Sox9 transzkripciós faktor szerepe. A Sox9 fehérje egy SRY-szerű (Sex Reversal of Y) HMG (High Mobility Group) boksz domént tartalmaz, amely segítségével nemcsak kötődik a DNS-hez, hanem meg is hajlítja azt. A Sox9 már a kondenzáció előtt megjelenik, erősen expresszálódik az előporcban és a kodroblasztokban, de kikapcsolódik a pre-hipertróf porcsejtekben (Wright E *et al*, 1995). Amikor *Sox9*$^{-/-}$ ES sejteket juttattak *Sox9*$^{+/+}$ blasztocisztákba, olyan kiméra egeret kaptak, ahol a Sox9$^{-/-}$ sejtek megjelentek a vázelemek leendő helyén a *Sox9*$^{+/+}$ sejtekkel keveredve. Később a porc elő-alakokban („anlagen") azonban csak a *Sox9*$^{+/+}$ sejtekre jellemző tulajdonságok jelentek meg (Bi W *et al*., 1999) és csak néhány Sox9-deficiens sejt maradt meg a kondenzációk környezetében, amelyek nem expresszálták a Col2a1 és Agc1 géneket. Ennél látványosabb volt az a kísérlet, amelyben *Prx1-Cre* transzgén segítségével inaktiválták a Sox9-et (a Prx1 a mezenhima kondenzáció előtt expresszálódik a végtagbimbókban). Ezekben az egerekben gyakorlatilag hiányzott a porc a végtagokban (Akiyama H *et al*, 2002). A transzgénikus egér további vizsgálatakor kiderült, hogy a mezenhima sejtek apoptotikus útvonalra léptek, míg a sejtadhéziós molekulák (NCAM, N-Cadherin) expressziója változatlan maradt. Ez azt jelentheti, hogy a Sox9-nek elsősorban a sejtek túlélésében van szerepe, valamint kontrollálhat egyéb kondenzációs géneket. Egy másik kísérletben a Sox9-et egy *Wnt1-Cre* transzgén segítségével inaktiválták a lefűződő feji-velőléc sejtekben. Ezekben

az embriókban, míg az endokondrális úton képződő csont nem fejlődött normálisan, az intramembrán csontosodás végbement (Mori-Akiyama Y *et al*., 2003). A legújabb eredmények azt mutatják, hogy a Sox9-nek nemcsak a porcfejlődésben, de a csontfejlődés sejtdeterminációjában is esszenciális a szerepe (Akiyama H *et al*., 2005), mivel az *Osx*$^{flox/lacZ}$*;Sox9-Cre* (*Sox9* expresszáló sejtekben az *Osx*-allélok inaktiválva ill. *β-galaktozidáz* génre cserélve) transzgénikus egérben hiányoznak az intramembrán csontosodással képződő elemek.

Ezidáig egyedül a Sox9-ről tudják, hogy „mester-regulátor" szerepe van a porcfejlődésben, azonban számos egyéb fehérjéről is kiderült, hogy szerepük van a mezenhima sejtek migrációjában, proliferációjában, túlélésében és kondenzációjában. Ide sorolhatók számos Pax, Hox, Forkhead-helix, és egyéb fehérjecsaládok tagjai. Számos, az említett fehérjéket kódoló gének közül hordoz mutációt, különböző csontfejlődési zavarok esetében (Mundlos S és Olsen BR, 1997). Ezek a fehérjék teljes vagy részleges átfedésben fejtik ki hatásukat és gyakran egymással redundánsak. Ezeknek az ún. „patterning" faktoroknak szintén szerepük lehet a sejtsors kialakításában. Ezek közül itt csak néhányat emelnék ki, mint a Pax1 és Pax9, a Nkx3.1 és Nkx3.2, valamint a Barx1-et.

A Pax1 és Pax9 fehérjék transzkripciós aktivátorok és ún. „paired-box" típusú DNS kötő domént tartalmaznak. Működésük leginkább a paraxiális mezoderma eredetű szklerotómok létrejöttéhez kapcsolódik. A *Pax1* és *Pax9* expresszióját az Shh indukálja (Rodrigo I *et al*., 2003). Amíg a *Pax9*$^{-/-}$ egér vázrendszerében nincs feltűnő fenotípusos változás, addig a Pax1$^{-/-}$ egérnek súlyosan deformálódott csigolyatestei vannak. A *Pax9*$^{-/-}$*/Pax1*$^{-/-}$ kettős mutáns egérnek gyakorlatilag hiányzik a gerincoszlopa. Habár a prekurzor sejtek migrációja normálisan végbemegy a gerinchúr irányába, valamint a Sox9 és Col2a1 expressziója megmarad, a sejtek proliferációja és kondenzációja elmarad.

Az Nkx3.1 és Nkx3.2 fehérjék transzkripciós represszorok és a *Drosophila* bagpipe fehérjéjével mutatnak rokonságot. Expressziójukat a Pax fehérjék szabályozzák, hatásukat a kondroblaszt differenciáció során végig megtartják (Triboli C *et al*., 1997). Hasonlóan a Pax fehérjéknél tapasztalt redundanciához az *Nkx3.1*$^{-/-}$ mutáns egér normális fenotípusú, az *Nkx3.2*$^{-/-}$ egérben súlyos váz-deformitások láthatók, a kettős mutánsban pedig még súlyosabb vázfejődési defektusok tapasztalhatók (Herbrand H *et al*., 2002).

A homeobox Barx2 erősen expresszálódik a végtagbimbók mezenhima kondenzációiban valamint az izületi porcban (Meech R *et al*., 2005). A *Col2a1* gén porc specifikus enhanszerét használja, valószínűleg a Sox9-el együttműködve. *In vitro* kísérletek azt mutatták, hogy

szabályozza az *N-Cam* és a *Col2a1* expresszióját. A Barx2 megnyilvánulása pedig feltehetően BMP szignál alatt áll.

Hozzátenném, hogy ebben a fejlődési stádiumban még számos fontos transzkripciós regulátor részt vesz, amelyek közül csak néhányat sorolok most itt fel.

A csirke-forkhead-(winged)-Helix (Cfkh-1) transzkripciós faktor mind a mezodermális (csigolyák, bordák, végtagok), mind a velőléc eredetű ektomezenhima sejtkondenzációkban expresszálódik, de szintje lecsökken a kondro- és oszteoblasztokban. Úgy gondolják, hogy TGF-β szignált továbbít a cél géneken (pl. fibronectin) a Smad proteinekkel együttműködve (Buchberger A *et al*., 1998; Labbé E *et al*., 1998).

A mezenhima-forkhead 1 (Mfh-1) transzkripciós faktor a szklerotómokban, a kraniofaciális mezenhimában, valamint a differenciálódó porcban expresszálódik. Az Mfh-1 deficiens egérben vázfejlődési rendellenességek mutatkoznak és az Mfh-1-nek fontos szerepe van a kondenzációban részvevő sejtek proliferációjában (Miura N *et al*., 1993, Iida K *et al.,* 1997).

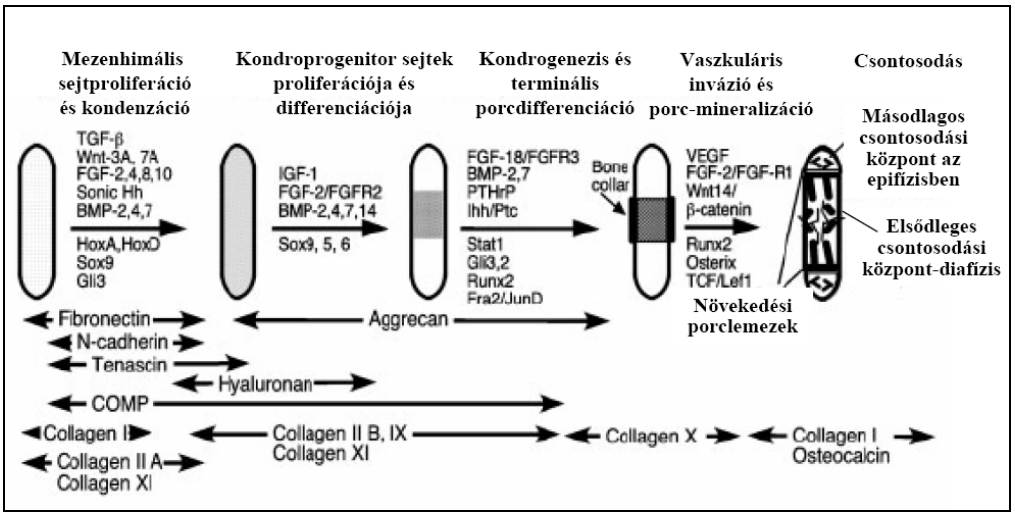
A Scleraxis egy bázikus helix-loop-helix fehérje, amelynek szintén fontos szerepe lehet a kondenzáció folyamatában. A gasztruláció alatt végig expresszálódik, majd fejlettebb embrióban kizárólag az előporc kondenzáció helyszínein nyilvánul meg. Szintje drasztikusan lecsökken a differenciáció megindultával. A *Scleraxis*$^{-/-}$ mutáns egér embrió már nem is gasztrulálódik. Kiméra egérben a Scleraxis negatív sejtek nem vesznek részt a szklerotómok kialakításában. Összességében elmondhatjuk, hogy a Scleraxis proteinnek fontos szerepet tulajdonítanak a mezoderma kialakulásában, a szklerotómok mezenhimájának kondenzációjában és a kondrogenezis elindításában (Cserjesi P *et al*. 1995).

Meg kell még említenem a különböző Hox fehérjéket (pl Hoxa-2, Hoxa-13, Hoxd-11, Hoxd-13), amelyeknek szintén fontos szerep jut a mintázatképzés („patterning”), valamint a sejtadhézió, proliferáció és növekedés szabályozásában (Hall BK és Miyake T, 2000).

2.1.5. Az endokondrális csontosodás és a növekedési porclemez

Az endokondrális csontosodás során a mezenhimális kondenzációval létrejött sejt-aggregátumok a porcfejlődés útvonalára lépnek és kialakítják a leendő vázelemnek megfelelő formájú hialin porc-blasztémát. Ez a porc előalak intersticiális és appozícionális úton is képes a növekedésre. Érdekes módon a csontosodás intramembrán úton indul meg először a diafízis területén a csontgallér kialakulásával, a szigorú értelembe vett endokondrális csontosodás a növekedési porclemezhez köthető. A növekedési porclemez egy olyan különleges képlet, amely biztosítja a fejlődő csontok hosszanti növekedését, valamint összekapcsolja a

porcképződést a csontfejlődéssel az endokondrális úton fejlődő csontok csontosodási magvaiban. A porclemez négy fő morfológiailag elkülöníthető zónára osztható, amelyek egy differenciációs sort alkotnak: a tartalék- (v. nyugvó-), a proliferatív-, a prehipertóf- és hipertróf porczónára. Az alsó, már mineralizált hipertróf zóna sejtjei végül elhalnak, a X-es típusú kollagénben gazdag mátrix lebontódik, miközben az erek inváziójával érkező oszteoblasztok elkezdik kialakítani a trabekuláris csontszövetet. A folyamatot számos szisztémikus és lokális mediátor szabályozza. A szisztémikus faktorokhoz különböző hormonok tartoznak, pl. a növekedési hormon-inzulinszerű növekedési hormon (GH-IGF-1), a pajzsmirigy hormonok, ösztrogének, a glükokortikoidok, valamint a D-vitamin hormon. A 6. ábra a lokálisan megjelenő ill. ható transzkripciós- és növekedési faktorokat, valamint az egyes stádiumokra jellemző ECM molekulákat szemlélteti (Goldring *et al*., 2006). Jelen keretek között csak a legfontosabb molekulák hatásmechanizmusát ismertetem a porcfejlődés kapcsán.



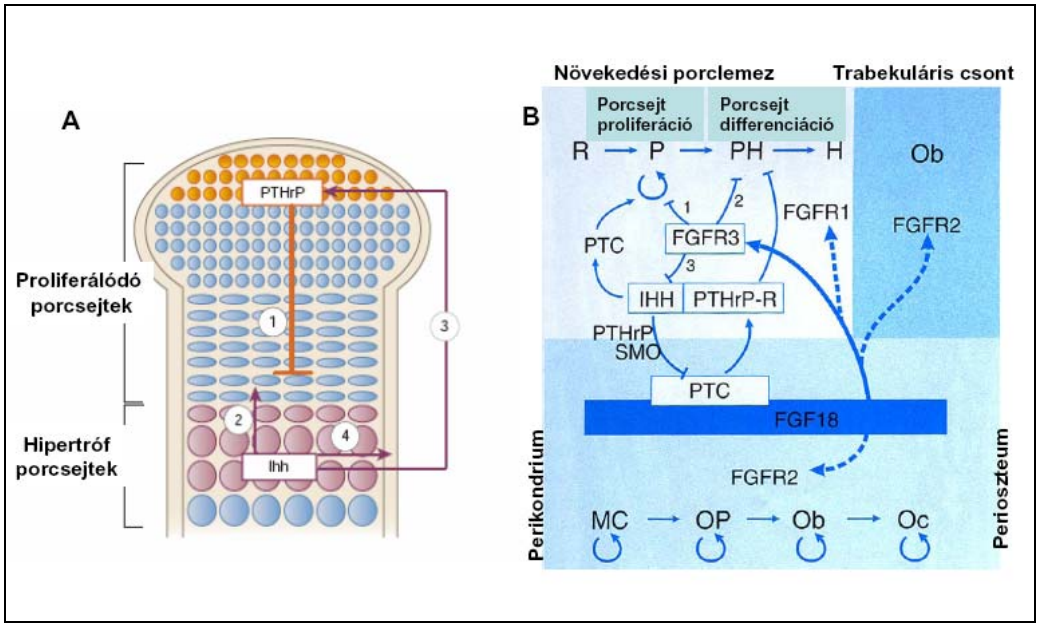
6. ábra: Az endokondrális csontosodás szabályozó-, és ECM molekulái.

(adaptálva: Goldring *et al*, 2006)

A PTHrP/Ihh negatív visszacsatolás

A porcsejtek proliferációja az alsó proliferatív- és a pre-hipertróf zónában egy lokális negatív visszacsatolási mechanizmus hatása alatt áll, amelynek legfontosabb szereplői a Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) és az Indian hedgehog (Ihh) fehérjék. Az *Ihh* expressziója a prehipertóf zónára (7. ábra: A/2) korlátozódik, a PTHrP receptort (PPR) pedig a proliferatív porcsejtek (7. ábra: A/1) termelik. Az ez utóbbit körülvevő porchártya expresszálja a Patched (PTC) nevű Hedgehog receptort, amely kötődve az Ihh ligandjához, a Smo aktiválásán keresztül indukálja a Gli transzkripciós faktort, amely pozitív (Gli1 és 2) vagy negatív (Gli3)

módon szabályozza az Ihh célgének expresszióját (Ingham PW és McMahon AP, 2001). Korábbi munkák azt mutatták, hogy az Ihh indukálja a *PTHrP* expresszióját (7. ábra: A/3) a porchárthában (Vortkamp A *et al*., 1996), amely a receptorához kötődve stimulálja a porcsejtek proliferációját (Lanske B *et al*., 1996), valamint gátolja a prehipertóf és hipertróf porcsejtek érését, így az Ihh expresszióját is (7. ábra: A/1) (Kobayashi T *et al*., 2005). Ezáltal az Ihh és PTHrP molekulák egy negatív visszacsatolással térben és időben szabályozzák a proliferatív- és hipertróf porcsejtek arányát, amellyel azt is meghatározzák, hogy mely sejtek maradnak a porcfejlődési útvonalban, és mely sejtek lépnek be a csontosodási folyamatba. Az Ihh a porchártya sejtjeire is hat, elősegíti ezen sejtek oszteoblaszttá alakulását a csontgallér képződés során (7. ábra: A/4).



7. ábra: A növekedési porclemez legfontosabb szabályozási lépései.

A: a PTHrP/Ihh negatív visszacsatolási kör (adaptálva: Kronenberg HM, 2003). **B:** Az FGF-útvonal szabályozási folyamatai a növekedési porclemezben (adaptálva: Liu Z *et al*., 2002). MC: mezenhima-sejtek; OP: oszteo-progenitor sejtek; OB: oszteoblaszt; OC: oszteocita; R: nyugvó-; P: proliferatív-; PH: pre-hipertróf; H: hipertróf porcsejtek.

Az FGF-szignál útvonal

Ezidáig több mint 22 féle Fibroblast growth factor (FGF) ligandot azonosítottak, amelyek hatását a porcfejlődésre nehezen lehet értelmezni anélkül, hogy megvizsgálnánk receptoraik térbeli megnyilvánulását. Az FGFR2 a korai mezenhimális kondenzációkban expresszálódik, amely a fejlődés előrehaladtával a kondenzációk szélső, differenciálatlan sejtjeire

korlátozódik az FGFR1-el egyetemben. Az FGFR3 a kondenzációs magban nyílvánul meg a legerősebben és részben átfed az FGFR2 expressziós doménjével. A funkciót illetően az FGFR3-ról van a legtöbb ismeret. A növekedési porclemezben az FGFR3 funkciója a porcsejtek proliferációjának gátlásában van azon mód, hogy a Stat1 transzkripciós faktor foszforilációján keresztül fokozza a p21 sejtciklus gátló fehérje termelődését (Sahni M *et al*., 1999). A legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy az FGFR3 preferált ligandja az FGF18 fehérje, mivel mind az *FGF18*-, mind pedig az *FGFR3*-deficiens egérben megnövekszik a proliferatív zóna hossza, valamint az FGF18 gátolja az *Ihh* expresszióját (Liu Z *et al*., 2002). Az FGF18 és FGF9 a porc- és csonthártyában expresszálódnak, ahol a proximális proliferatív zónától kiindulva egy funkcionális gradienst hoznak létre, receptoraikhoz kötődve pedig gátolják a proliferációs- és az érési folyamatokat (Liu Z *et al*., 2002). A prehipertróf és hipertróf zónában az FGF18 és FGF9 kapcsolódik az FGFR1-hez is, ahol indukálják az erek inváziót a *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) és receptorának (VEGFR1) expresszióján keresztül. A növekedési porclemez fejlődésével a prehipertróf-, hipertróf zónában az *FGFR3* expressziója eltűnik, az *FGFR1* megnyilvánulása pedig fokozódik, amely az FGFR1 terminális porc-differenciációban betöltött szerepét sejteti (Ornitz DM, 2005).

A Sox fehérjék szerepe a porcfejlődésben

Az előzökben láttuk, hogy a Sox9-nek fontos szerep jut a sejtsors kialakításában és a mezenhimális kondenzációban. E mellett szintén nélkülözhetetlen a korai kondroblaszt differenciációhoz is. Erre a fázisra az elő-porc sejtek intenzív proliferációja és a porc-mátrix szintézisének kezdete jellemző. Ha Col2a1 transzgén segítségével inaktiválták a Sox9 gént, a kondenzáció ugyan végbement, de az előporc sejtek nem voltak képesek kondroblasztokká differenciálódni (Akiyama H, 2002). A Sox család másik két tagja, az L-Sox5 és Sox6 szintén nélkülözhetetlenek a kondroblasztok fejlődéséhez (Lefebvre V, 2001). Az L-Sox5 és Sox6 szinte teljesen identikusak egymással, a Sox9-el azonban csak a HMG doménben hasonlítanak. Nincs transz-aktivációs sem transz-repressziós doménjük, feltehetően a transzkripciós komplex létrejöttében játszanak szerepet. Amíg az *L-Sox5*$^{-/-}$ vagy *Sox6*$^{-/-}$ egerek csak limitált vázproblémával jellemezhetők, addig a dupla mutáns egyedek már a méhben elhalnak, gyengén fejlett ill. degenerált porc-kezdeményt hagyva (Smits P *et al*., 2003). Ezeket az embriókat megvizsgálva azt tapasztalták, hogy a kondenzáció normálisan végbemegy, azonban a kondroblaszt differenciáció visszamarad, amit a porc markerek alig észlelhető szintézise mutat. E mellett a sejtosztódás mértéke is kisebb. Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy az L-Sox5/Sox6 a Sox9-el együtt fejtik ki hatásukat és kötődnek a *Col2a1*

gén első intronjában található enhanszer régióhoz. A Sox9 e mellett képes aktiválni számos egyéb porc specifikus gének expresszióját is, mint pl. a XI-es típusú kollagén (*Col11a2*), az aggrecan (*Agc1*) és a matrilin-1 (*Crtm*) géneket (Bridgewater LC *et al*., 1998; Sekiya I *et al*., 2000; Rentsendorj O *et al.*, 2005).

A Sox5/Sox6 duónak a prehipertróf-hipertróf zóna kialakításában is szerepet tulajdonítanak. Ezt a *Sox5*$^{-/-}$/*Sox6*$^{-/-}$ dupla mutáns egérmagzatok vizsgálata bizonyította, ahol a prehipertróf sejtek nem voltak képesek hipertóf porcsejtté alakulni, valamint lecsökkent a Col10a1 expressziója. A Sox5/Sox6 hatásmechanizmusa a hipertrófiára ez idáig még nem ismert.

A Runx fehérjék szerepe a porcfejlődésben

A Runx fehérjék Runt-domént tartalmazó transzkripciós aktivátorok. A Runx2 az α-alegységet képviseli a PEBP2/CBF heterodimér transzkripciós komplexben, a β-alegységet a *Cbfb* gén kódolja. A Runx2 (Cbfa1) már a késői kondenzációs fázisban elkezd termelődni, expressziója valamelyest csökken a proliferatív zónában, majd a prehipertróf-hipertróf zónában megint erőteljesen megnyilvánul. Úgy tűnik, hogy a Runx3-al karöltve játszik szerepet az oszlopos szerkezetű proliferatív porcréteg kialakításában. A *Runx2*$^{-/-}$/*Runx3*$^{-/-}$ kettős mutánsokban hiányzik az oszlopos szerkezet. A Runx2/Runx3 szerepe feltehetően indirekt és főleg annak köszönhető, hogy aktiválja az *Ihh* expresszióját a pre-hipertróf sejtekben (Lefebvre V és Smits P, 2005). A porc hipertrofizációban esszenciális a Runx2/Runx3 párosnak a szerepe. A *Runx2*$^{-/-}$ egér humerus-ban és femur-ban a porc differenciáció leáll a prehipertróf fázis előtt, amit a *Pthr1, Ihh* és *Col10a1* expresszió hiánya is bizonyít; a tibia-ban, radius-ban és az ujjpercekben a hipetrófizáció csak késleltetett. További bizonyítékot jelentett azon transzgénikus egerek vizsgálata, ahol a Runx2-őt túltermeltették a kondroblasztokban; itt a porcsejtek korai érése volt megfigyelhető. Ha a Runx2 domináns-negatív formáját termeltették túl, a hipertóf irányú kondroblaszt differenciáció gátolt volt (Takeda S *et al*., 2001; Ueta C *et al*., 2001). Az a tény, hogy a Runx2-/- mutáns egérben a porcsejtek érése kis késleltetéssel normálisan végbement, további faktorok jelenlétét feltételezte. Ez vezetett a felismeréshez, hogy a Runx3 is szerepet játszik a porcsejtek hipertóf átalakulásában. Míg a *Runx2-/-* vagy *Runx3-/-* mutánsokban csak késleltetett az endokondrális csontosodási folyamat, addig dupla mutánsukban teljesen hiányzik a prehipertóf/hipertóf porc zóna (Yoshida CA *et al*., 2002). Úgy tűnik, hogy a Runx2 közvetlenül kapcsolódik a DNS-hez. *In vitro* kísérletekben bizonyították, hogy kötődik a Col10a1 gén promóteréhez és képes aktiválni a Col10a1 riporter konstrukciót (Zheng Q *et al*., 2003). A Runx2 az *Ihh* expressziót is fokozza és *in vitro* kötődik promóteréhez és képest azt

aktiválni (Yoshida CA *et al*., 2004). Azzal a megfigyeléssel együtt, hogy a PTHrP gátolja a *Runx2* expressziót, úgy tünik a Runx2 része az Ihh/PTHrP feedback-loop hatásmechanizmusnak. A Runx2 kötődését a cél-DNS-hez egy kofaktorral történő heterodimerizációja biztosítja. Ez a fehérje a core-binding faktor beta (Cbfβ). A *Cbfβ*$^{-/-}$ egér hasonló fenotípust mutat, mint a *Runx2*$^{-/-}$ mutáns egér (Kundu M *et al*., 2002).

A Runx2 és Osterix szerepe a csontfejlődésben

A Runx2 erőteljesen expresszálódik az oszteoblasztokban és a porchártya sejtjeiben. A porcfejlődés mellett elsősorban az oszteoblaszt differenciációban betöltött szerepéről vált ismertté, hiszen a *Runx2*$^{-/-}$ egereknek hiányzik mind az endokondrális-, mind pedig az intramembrán úton fejlődő csontozata (Ducy P *et al*., 1997, Komori T *et al*., 1997). De nemcsak az oszteoblaszt differenciációban játszik szerepet, hanem felelős számos ECM molekula transzkripciójának aktiválásában is. Számos gén promóteréhez képes kapcsolódni, mint pl. az osteocalcin, bone sialoprotein, alkálikus foszfatáz és az I-es típusú kollagén génekhez, így a mineralizációt is szabályozza.

Az Osterix (Osx) fehérje egy cink-ujj tartalmú, elsősorban oszteoblaszt specifikus transzkripciós faktor (Nakashima K *et al*., 2002). Expressziója egérben nem detektálható a 13. embrionális napig (E13). Nagyon kis mértékben a porcsejtek is termelik, de elsősorban a perikondriumban, valamint a intramembrán csontosodással fejlődő vázelemek mezenhimális kondenzációjiban expresszálódik az E13.5 stádiumban. Az *Osx*$^{-/-}$ mutáns egér a születés körül elpusztul. Habár ezekben az egerekben a porcszövet normálisan kialakul, teljesen hiányzik mind az endokondrális-, mind pedig az intramembrán úton képződő csontszövet (Nakashima K *et al*., 2002). Az Osx-deficiens egerekben az I-es típusú kollagén szintje minimális, az *Osteonectin, Osteopontin* és *Bone sialoprotein* 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. Érdekes módon az *Osx*$^{-/-}$ emriókban a mezenhimába ágyazva kerek, porcszerű sejteket találtak, amelyek expresszálják a *Sox9, Sox5, Col2a1* és *Ihh* porcspecifikus géneket. Lehetséges, hogy az Osx-nek szerepe van a sejtsors kialakításában egy közös oszteo-kondroprogenitor sejtvonalban, hiányában a porc sejtvonal irányába mozdul el a differenciáció (Nakashima K és de Crombrugghe B, 2003).

2.2. Az agancsfejlődés

A gímszarvas (Cervus elaphus) a párosujjú patások rendjének (Artiodactyla) *Cervidae* családjába tartozik. Ez a család 17 nemzetséget és kb. 53 fajt foglal magába. Széchenyi Zsigmond (1979) szép leírást ad a különféle szarvasok elterjedéséről és jellemzőikről. A szarvasfélék az egész világon elterjedtek, kivéve az Antarktiszt, Ausztráliát, Madagaszkárt, Közép- és Dél-Afrikát, valamint Új-Zélandot. A fajok közötti megkülönböztetésben az agancs formája taxonómiai bélyeg, fajon belül az egyedek és törzsek (Szederjei Á, 1960) megkülönböztetésére is szolgál. A rénszarvas (ill. a karibu) kivételével csak a hímek viselnek agancsot. Az agancs nem közvetlenül a koponyán fejlődik, hanem a homlokcsonton kialakuló, maradandó csontos nyúlványról, a csapról (vagy más néven kocsányról) növekszik. A csap pubertás korban androgén hormonok hatására alakul ki az ún. „antlerogén perioszteum" (AP) fejlődésével (Goss RJ és Powel RS, 1985). Magzati korban az AP mindkét nemben jelen van, de szarvastehenekben inaktív marad az androgén stimulus hiánya miatt; hím nemi hormonok adagolásával azonban dámvadban a nőivarú egyedek is fejlesztenek csapot (Kierdorf U *et al*., 1993). Transzplantációs kísérletekkel igazolták, hogy az AP felelős a csap- és az agancs kialakításáért. Amikor az AP sejtjeit a homlokcsont más területére ültették át, az új helyen agancsfejlődés indukálódott, az eredeti helyen azonban nem (Hartwig H, 1967). Abban az esetben, amikor az AP-t a lábközépcsont bőre alá ültették, szintén agancsnövekedés kezdődött. A heterotópikus „mini" agancs, hasonlóan viselkedett, mint a „normál" agancs, pl. az év megfelelő időszakában dobta le a barkát, ami azt sugallja, hogy ugyan olyan hormonális hatások érték (Hartwig H és Schrudde J, 1974; Goss RJ és Powel RS, 1985). Az AP sejtek differenciációs képességét az is bizonyítja, hogy amikor immun-deficiens egerek koponyacsontjára ültették, egy csontos kinövés képződött (Li C és Suttie M, 2001). Li és Suttie (1994) részletes szövettani leírást adott a csapról és négy csontosodási stádiumot különböztettek meg. Az első az intramembrán csontosodási stádium, amikor az agancsképző („antlerogén") sejtek elkezdenek proliferálódni és oszteoblasztokká differenciálódni. A második fázist tranzícionális csontosodásnak nevezték; ekkor a csap apikális felületének középső részén az agancsképző sejtek megváltoztatják fejődési útvonalukat és kondroblasztok alakulnak; kevert csontos-porcszövetet hátrahagyva. A harmadik a csap endokondrális porcosodás fázisa, amikor csak porcfejlődés történik. A negyedik fázis az agancs endokondrális csontosodási fázisa, amikor az agancsképző sejtek a kondrogén útvonalban maradnak az első agancs kialakulásáig. Erre a fázisra a bársonyos bőr megjelenése jellemző a

csap disztális felszínén. Természetesen a harmadik- és negyedik fázis között nem lehet éles szövettani határvonalat elkülöníteni. Az elsődleges agancs és a regenerálódó agancs morfológiai jellemzői nagyon hasonlóak és számos tanulmányban olvasható leírásuk (ld. 4.1. fejezet).

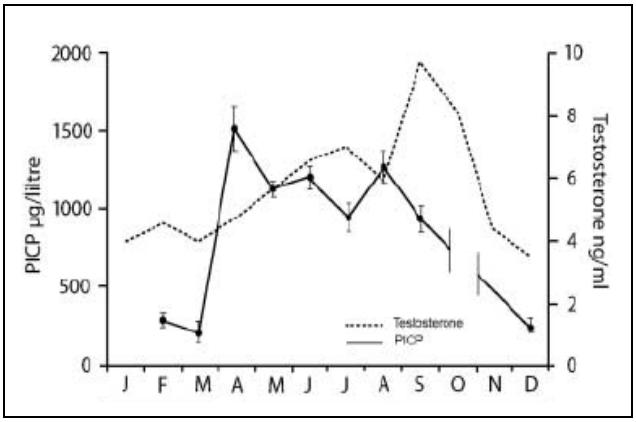
Az AP sejtek differenciációs képességét az agancs csúcs mezenhima (ill. perikondrium) sejtjei részben megtartják. *In vitro* kísérletek azt mutatták, hogy patkány szérum jelenlétében képesek adipocita-szerű sejtekké differenciálódni, dexametazon hozzáadásával pedig növekszik a sejtek ALP termelése (Price JS és Faucheux C 2001; Price JS és Allen S, 2004). Ezen sejtek fejlődési potenciálja (uni-, bi-, multipotenciál) azonban nagyrészt ismeretlen. Maga az agancsnövekedés egy módosult endokondrális- és intramembrán csontosodás speciális keveréke (Banks JW és Newbry WJ, 1983). A folyamat sok tekintetben hasonlít az embrionális végtagfejlődésre (Allen S *et al*., 2002; Li C és Suttie SM, 2001). Az embrionális csontfejlődéshez hasonlóan, az agancsnövekedés, regeneráció és érési folyamat szisztémikus és lokális faktorok hatása alatt áll (Goss RJ, 1983), de nem elhanyagolható a környezet hatása sem.

2.2.1. Szisztémikus hatások

Mérsékelt éghajlaton az agancs növekedése éves ciklust mutat a szarvas reprodukciós ciklusával összhangban. A szexuális ciklust természetesen hormonok befolyásolják a fotoperiódus változásával összhangban. A bikák kasztrálása ill. hormonok exogén adagolása bizonyította, hogy legfontosabb hatása a szex-szteroidoknak van; már Arisztotelész leírta a kasztrálás hatását az agancsnövekedésre. Az agancshullatás a mi éghajlatunkon alacsony tesztoszteron-szint mellett történik. A legintenzívebb agancsnövekedés a kora nyári periódusban történik, amikor bőségesen áll rendelkezésre táplálék, ilyenkor a szarvasok „magányos” életet élnek. Mivel ez az intenzív agancsregeneráció arra az időszakra esik, amikor a reproduktív szervek inaktívak, már rég óta feltételezik, hogy az agancsnövekedés szabályozásában léteznie kell valamilyen nem gonád eredetű stimulusnak (Wislocki, 1943). Az egyik kandidáns faktor az IGF-I, amely a májban szintetizálódik, és szintje párhuzamot mutat az agancsnövekedéssel (Suttie JM *et al*., 1985). Az IGF-I receptorát azonosították az agancscsúcsban (Elliott JL *et al*., 1992), valamint *in vitro* kísérletben bizonyították, hogy az IGF-I elősegíti az agancssejtek proliferációját (Price JS *et al*., 1994; Sadighi M *et al*., 1994). Az agancsciklussal összhangban egyéb hormonok szintje is változik, pl. a D-vitamin hormon

szintje (van der Eems KL *et al*., 1988), a pajzsmirigy hormonok szintje (Shi és Barrell, 1994), a kortizol- (Bubenik GA *et al*., 1975), valamint a prolaktin (Sempere AJ, 1983) hormonok szintje, habár ezek funkciója jórészt ismeretlen. Habár a szexuál-szteroidok alacsony szintje a regeneráció szempontjából „permisszív" hatás, magas szintjük gátolja a növekedést (Goss, 1968). A szaporodási időszak (bőgés) közeledtével a tesztoszteron szintje erősen megnövekszik, leáll a további növekedési folyamat, az agancs teljes kalcifikációja megtörténik, a barka elvékonyodik, elhal, majd ledobódik. A legmagasabb tesztoszteron szint ősszel, a szaporodási időszakban tapasztalható.

Amennyiben az intenzív agancsnövekedés periódusában kasztrálták a bikákat, késett a barka levedlése és a mineralizáció sem volt teljes. Dámszarvas (*Dama dama*) esetében a kasztrálás csontkinövekedéseket okozott a lapáton, amelyeket Goss (1983) „antleroma"-nak nevezett, amely név a tumorokkal való rokonságra utal. Őz és dámvad esetében a kasztrálás vagy a herék sérülése oszteoszarkóma szerű „parókás" agancs kialakulását eredményezheti. Ezek a fibrózus-csontos burjánzások jóinulatú daganatoknak tekinthetők (Kierdorf U *et al*., 2004). Érdekes módon a tesztoszteronnak nincs direkt hatása az agancs mezenhima vagy porcsejtek proliferációjára in vitro, a tesztoszteron kötőhelyek jelenléte ellenére sem. E mellett a tesztoszteron adagolása nem tette érzékenyebbé a sejteket az IGF-I hatásra sem (Li C *et al*., 1999; Sadighi M *et al*., 2001).



8. ábra:

A tesztoszteron és I-es típusú kollagén C-terminális pro-peptid (PICP) koncentrációja gímszarvas vérszérumában az agancsciklus során (adaptálva: Price *et al*., 2005). A PICP koncentrációja a vér-szérumban a szervezetben zajló oszteoblaszt tevékenység indikátora.

A vázcsontok fejlődése kapcsán már bizonyították, hogy a tesztoszteronnak részben indirekt a hatása, azt az aromatáz enzim ösztrogénne képes alakítani (Riggs B *et al*., 2002) és az fejti ki

a hatást. Úgy gondolják, hogy az agancs esetében is ez lehet a helyzet (Price JS és Allen S, 2004). Már rég megfigyelték, hogy az agancsnövekedés érzékenyebb az ösztrogén-, mint a tesztoszteron adagolásra (Goss RJ, 1968). Ösztrogén kezelés hatásaként leáll az agancsnövekedés és beindul a barka levetése. Az ösztrogén receptort (ER) kimutatták az agancs perikondriumban (Barrell GK *et al*., 1999), valamint az aromatáz enzimet kódoló mRNS-t az agancscsúcsban (Price JS *et al*., 2002). Immuncitokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az ERα a domináns receptor izoforma. Úgy tűnik, az ösztrogén adagolása gátolja a sejtproliferációt és elősegíti a differenciációt és mineralizációt (Price JS és Allen S, 2004).

Itt említenék meg egy érdekes megfigyelést, miszerint az intenzív agancsnövekedés időszakában a szarvas nem képes a táplálékkal kielégíteni az óriási ásványi anyag igényét, ezért a vázcsontozatból vonja el azokat. Ezt ciklikus fiziológiás oszteoporózisnak nevezik (Bubenik G, 1982), és elsősorban a terhet nem viselő csontokat, mint pl. a bordákat érinti. A folyamat reverzibilis, a bőgési időszakot megelőzően az ásványi anyagok a táplálékból fokozatosan visszapótlódnak a vázcsontozatban.

2.2.2. Lokális hatások

Ez idáig csak korlátozott számú, az agancsnövekedésben szerepet játszó molekulát sikerült azonosítani. Kiindulási pontot legtöbb esetben a vázcsontozat fejlődésében szerepet játszó gének ill. fehérjék jelentették. Az agancsnövekedés esetében e molekulák szerepéről csak indirekt következtetések vonhatók le, hiszen még nem lehetséges funkciójuk in vivo vizsgálata. Jelenleg az egyik járható út az mRNS és fehérje molekulák térbeli lokalizálása agancs szöveti metszeteken és az eredmények interpretációja a morfológia tükrében. E mellett néhány labor már létrehozott elsődleges agancs sejttenyészeteket, amelyeken *in vitro* vizsgálható az egyes növekedési- és transzkripciós faktorok hatása.

Az egyik viszonylag jól jellemzett molekula a PTHrP és receptora, amelyet két csoport is vizsgált (Faucheux C *et al*., 2002; Barling PM 2004a). Agancs sejttenyészetben a PTHrP fokozza a porcsejtek proliferációját és gátolja azok differenciációját (Faucheaux C és Price JS, 1999); valamint a PTHrP szintézis TGFβ hozzáadásával fokozható (Faucheaux C *et al*., 2004). Erős PTHrP expressziót figyeltek meg az agancs porchártyában, mezenhimában, elő-porcban és a perivaszkuláris sejtekben. A növekedési porclemezzel ellentétben, agancsban a PTHrP nem detektálható a differenciálódott porcszövetben.

Faucheaux *et al*. (2004) az *Ihh* expresszióját is megvizsgálták az agancsban. Azt tapasztalták, hogy az *Ihh* megnyilvánul az elő-porcban és a perivaszkuláris sejtekben, de nem detektálható a perikondriumban, a perioszteumban, a mezenhimában, és a PTHrP-hez hasonlóan a differenciálódott porcsejtekben sem. Mint látható, az agancsban is megfigyelhető a növekedési porclemezhez hasonló vertikális elkülönülés a *PTHrP* és *Ihh* expressziójában. Az, hogy az *Ihh* nem expresszálódik a perioszteumban azt jelzi, hogy az Ihh-nak az agancsfejlődés során csak az endokondrális csontosodásban lehet szerepe.

Allen *et al*. (2002) a különböző retinsav (RA) izoformák és azok receptorait (RAR) vizsgálta agancsban. A legszembetűnőbb különbség az agancs és a végtagok fejlődése között az volt, hogy agancsban nagyon alacsony a RARγ szintje, valamint a 9-cisz-RA megjelenése az agancsban, amely a végtagkezdeményekben nem detektálható. Exogén RA adagolás hatására felgyorsul az agancsnövekedés, de megváltozik az agancs formája is (Bubenik AB, 1990). A retinsav egyébként lokálisan szintetizálódik a RALDH enzim hatására, amely enzimet szintén kimutattak az agancsban.

Mundy *et al*. (2001) agancs kivonatban vizsgálta különböző oszteoblaszt stimuláló faktorok jelenlétét. A kísérlet már korábban is leírt molekulák jelenlétét igazolta, pl. a BMP-4 (Feng JQ *et al*., 1995), BMP-2 (Feng JQ *et al*., 1997), FGF molekulák és az IGF-I és IGF-II jelenlétét, amely utóbbiak tehát nem csak a keringésben vannak jelen, hanem lokálisan is szintetizálódnak. Agancsban azonosították az *OT-2* molekulát, amely 70%-os egyezést mutat az IGF-I-el és agancs metszeteken expressziója az oszteoklasztokhoz kapcsolható (Guitierrez G *et al*., 1993). Francis és Suttie (1998) számos mRNS-t azonosított RT-PCR segítségével: *TGFβ1, TGFβ2, c-fos, c-myc*, valamint az *IGF-I* és *IGF-II* RNS molekulákat. Ugyan ez a csoport szubtraktív PCR segítségével azonosította a *dermatopontin* és a *glutathione-peroxidase* (GPX4) molekulákat, amely utóbbi nem expresszálódik adult szervezetben (Lord E *et al*., 2001).

Egy másik új-zélandi csoport számos növekedési faktort és azok receptorait vizsgálta immun-hisztokémiai technikával: EGF, EGFR, FGF2, FGFR1, -2 és -3, BMP-2, -4 és -14, valamint a BMP receptor BmpR1B és ACTRII molekulákat (Barling PM *et al*., 2004a,b).

A Wnt szignál útvonal, amely fontos szerepet játszik a velőléc-sejtek sorsdeterminációjában, polaritásában, migrációjában és proliferációjában a kraniofaciális fejlődés során (Dorsky RI *et al*., 1998), úgy tűnik az agancsregenerációban is képviselteti magát. Mount *et al*. (2006) a kanonikus Wnt szignál útvonalat vizsgálta agancs metszeteken és sejttenyészetben a β-catenin immunlokalizálásával ill. az útvonal specifikus gátlásával. A β-catenin expressziója az

agancsban leginkább a differenciálatlan sejttípusokhoz volt köthető, az útvonal gátlása pedig fokozta a sejtek apoptótikus elhalását, valamint elősegítette a differenciációt.
A differenciáció folyamatát Korpos és munkatársai (2005) a matrilinek és egyéb ECM molekulák segítségével tanulmányozták. A mezenhima sejtek leginkább a Matrilin-2-őt termelik. Az elő-porc sejtek elkezdik termelni a II-es típusú kollagént, a link-proteint és a Matrilin 4-et. Az érett porcban a Matrilin 1 expressziója a legmagasabb.
Csoportunk AFLP-alapú Differential Display technikát alkalmazva keresett olyan géneket, amelyek a növekedési porclemezhez képest eltérően expresszálódnak (Molnár A *et al*., 2007). Vizsgálatunk során 36 olyan gént azonosítottunk, amely a növekedési porclemezhez képest eltérően expresszálódik. Ezek közül 3 gént *in situ* hibridizációval is jellemeztünk: az Annexin (*anxa2*) II, Aplipoprotein D (*apoD*) és α-Tropomiozin (*TM1*) géneket. Ezek a gének (valamint a Transgelint, a Phosphatidylethanolamine-binding proteint kódoló gének) érdekes módon rosszindulatú daganatokban csökkent expressziót mutatnak, amely felhívja a figyelmet a nagyon intenzív agancsnövekedés szabályozott voltára. A fentiekkel összefüggésben megjegyezném, hogy mind az *Annexin II* (Wang W és Kirsch T, 2002), mind pedig az *Apolipoprotein D* (López-Boado YS *et al*., 1994) expresszióját a retinsav indukálja. Habár az Annexin II szerepe a porc mineralizációban (a mátrix vezikulumok ion-csatornáinak része) jól dokumentált (Kirsch T *et al*., 2000), az ApoD megnyilvánulása az agancs porcszövetben teljesen új eredmény, funkciója ismeretlen.

2.2.3. Az agancsnövekedés idegrendszeri szabályozása

Az agancs robusztus növekedése együtt jár az erek és idegek inváziójával is, amelyek hasonló sebességgel növekszenek, mint maga az agancs, követik annak ütemét. Az agancs érző-idegrostokkal gazdagon ellátott szerv, amely pozícionális információt nyújt a szarvasnak 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 epidermisz és dermisz rétegében mielin hüvellyel ellátott és csupasz idegrostok egyaránt megtalálhatók (Vacek Z, 1955). Wislocki és Singer (1946) azt találták, hogy a denervált agancs hossza és formája eltér a normálistól. Ha a csap perioszteum szövetét elektomos úton stimulálták, nemcsak az agancs mérete és tömege, de az alakja is megváltozott, a mineralizáció folyamata pedig késett (Bubenik GA *et al*., 1982). A következő évben, elektromos stimulus hiányában is abnormális formájú agancs fejlődött. Ez vezetett

ahhoz a felismeréshez, hogy az idegeknek közük lehet az ún. trófikus memória jelenségéhez. A fogalmat Bubenik és Pavlansky (1965) vezette be, és arra utal, hogy az agancs sérülése esetén, a szarvas „teste" (innen a trófikus jelző) valahogy megjegyzi a sérülés emlékét és a rákövetkező években is torzult agancs fejlődik. Az egymást követő években a torzulás lassan „kijavítódik", de minél erősebb volt a sérülés, és az agancsfejlődésben minél korábban történt, annál hosszabb ideig tart a „memória".

Agancsban eddig már számos neuropeptidet és idegnövekedési faktort azonosítottak. Gray *et al*. (1992) szerint a Calcitonin gene-related peptide és a Substance-P fontos szerepet játszik az agancs gyors növekedésében. Egy másik csoport mRNS szinten azonosította a Neurothrophin-3 és Nerve growth factor molekulákat, amelyek expresszióját szöveti zónákhoz rendelték (Garcia RL *et al*., 1997; Li C *et al*., 2006). Mindemellett az idegrendszer hatása az agancsnövekedésre a legkevésbé ismert folyamat.

Összességében elmondhatjuk, hogy az eddigi ismeretek azt bizonyítják, hogy a faj-specifikus agancs kialakulása három fő tényezőtől függ: (1) a homlokcsonton elhelyezkedő induktív v. agancsképző periosztеum jelenlététől; (2) a tesztoszteron permisszív koncentrációjától, amely az induktív periosztеum indukciójával létrehozza a csapot; (3) és a megfelelő idegi összeköttetéstől, amely az induktív periosztеum és egy 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 GA *et al.,* , 1982). A fenti hipotézis azt feltételezi, hogy az AGC és az induktív periosztеum közötti összeköttetés nélkülözhetetlen az agancsnövekedés létrejöttéhez. Viszont ha már létrejött a megfelelő összeköttetés, a csap szövetei már nem szükségesek a további agancsképzéshez. Amennyiben a csapot eltávolították, az nem gátolta meg a további agancs kialakulását; a seb begyógyultával az idegek és a periosztеum találkozási pontjánál új agancs létrehozása volt lehetséges (Bubenik AB és Pavlansky R, 1965).

2.3. A gímszarvas genetikai jellemzői

Az összehasonlító géntérképezés, azaz a gének helyzetének és sorrendjének fajok közötti összehasonlítása, alkalmas a genom-szerveződés evolúciós aspektusainak feltárására, másrészt alkalmazható egy ismeretlen géntérképű faj gén-elrendeződésének megismerésére egy már jól feltérképezett faj adatai alapján. Tágabb értelemben két fő markertípus használható a térképezéshez (O'Brien S *et al*., 1993). Az egyik az ún. I-es típusú markerek használata, 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 utóbbi évtizedben a párosujjú patások géntérképezésének az volt a fő célja, hogy termeléssel kapcsolatos mennyiségi jellegeket azonosítsanak. Ebből kifolyólag elsősorban II-es típusú markereket használtak a gazdasági állatok genetikai térképezéséhez. Habár az így megismert mennyiségi jellegekhez kapcsolt markerek nagyrészt átjárhatók voltak a különböző kérődző fajok között (pl. juh-szarvasmarha), emberben ezek nem voltak használhatók az összehasonlító géntérképezéshez (amely a másik fő célja lehet a mennyiségi jellegek megismerésének). A gímszarvas géntérképezés célja is elsősorban az, hogy végső soron hús- és agancstermeléssel kapcsolatos mennyiségi jellegeket tudjanak azonosítani. Ebben segítséget nyújt az emlősök összehasonlító géntérképezése is (Orosz L, 2001). A gímszarvas genomika egyik lehetősége, a II-es típusú szarvasmarha- és juh markerek felhasználása. A másik lehetőség az interspecifikus hibridek létrehozása, majd az F_2 vagy „backross" populáció felhasználása a térképezéshez. Mesterséges megtermékenyítéssel létrehozhatók fajok közötti hibridek, mint pl. a gímszarvas és a szambar szarvas (*Rusa unicolor*), vagy a gímszarvas és a milu (*Elaphurus davidianus*) között (Asher GW *et al*., 1988; Muir PD *et al*., 1997). Ez utóbbi használhatónak bizonyult a géntérképezéshez (Tate ML, 1995), annak ellenére, hogy genetikailag viszonylag távoli fajokról van szó (Pitra *et al*., 2004; Kuehn *et al*., 2005), eltérő a szezonalításuk, viselkedésük és morfológiájuk (pl. agancs); viszont azonos kromoszómaszámmal (2n=68) rendelkeznek. A meglepő az, hogy a Haldane - féle szabállyal ellentétben, az F_1 hibrid nemzedék hím (heterogamétás) egyedei fertilisek, így felhasználhatók a backcross térképező populáció létrehozásához, gímszarvas tehenek visszakeresztezése révén (ld. Bevezetés). Ezzel a módszerrel Tate *et al*. (1995) „első körben" négy kapcsoltsági csoportot azonosítottak, elsősorban I-es típusú markerek (RFLV) felhasználásával, amelyet később kiegészítettek más kérődzőkből származó, II-es típusú markerek segítségével kapott adatokkal (Slate J *et al*., 2002). A térképadatokat összesen 33 kapcsoltsági csoportba rendezték. A kapott eredmények azt tükrözték, hogy nagyfokú, konzervált homológ szakaszok figyelhető meg a szarvas, szarvasmarha és ember kromoszómái között. Ez a tanulmány 48 szinténikus (kapcsoltsági) szakaszt írt le a gímszarvas és ember között, amely a genom-elrendeződés konzervált voltára is rávilágít (O'Brien SJ *et al*. 1997).

3. Anyag és Módszer

3.1. Mintavétel

Az agancs csúcsokat a bőszénfai szarvasfarmon (Pannon Lovasakadémia, Szarvaságazat) gyűjtöttük. A kábított gímszarvasok (*Cervus elaphus*) bikáitól késő tavasszal vettük a mintákat, mielőtt elérték volna a koronaágak szétválásának fázisát. Az agancs csúcs felső 10 cm-es végét távolítottuk el és szövet zónákra szeparáltuk egy már leírt módszer alapelveit követve (Li et al. 2002) kisebb módosításokat végrehajtva: az agancs csúcsát mezenhima, elő-porc és porc zónákra osztottuk, közöttük átmeneti zónákat hagyva, valamint a mintavételt a középső, periaxiális régióból vettük (9. ábra). A minták egy részét paraffinba ágyaztuk, majd metszés után hematoxylin-eozin, valamint alcián-kék festéssel (Carlson FL, 1997) állapítottuk meg a szövet típusok ill. a mintavétel helyességét.
A szarvas-magzati porcmintákat egy hivatásos vadász segítségével gyűjtöttük egy olyan területen, ahol a bikák és tehenek arányát mesterségesen kell egyensúlyban tartani, így a selejtezés elkerülhetetlen. Az átlagosan 4 hónapos korú (december vége és január eleje között gyűjtött) magzatokat felboncolva, a hosszú csövescsont kezdeményeket szeparáltuk és a növekedési porclemezeket kivágtuk. Az izületi porcot és a csont középdarabját (diaphysis) nem használtuk fel. Mind az agancsminták, mind pedig a magzati minták több bikától és anyától származtak, hogy elkerüljük az egyedi különbségeket. A mintákat preparálásuk után azonnal folyékony nitrogénben fagyasztottuk és tároltuk.

3.2. RNS izolálás

A három fent említett agancsmintából (mezenhima, elő-porc és porc), valamint a magzati porcból közvetlenül poliA-RNS-t izoláltunk Dynabeads Oligo$(dT)_{25}$ paramágneses gyöngyök segítségével (Dynal Biotech) a gyártó által ajánlott pufferek és protokoll felhasználásával. Az RNS elúcióját RNáz-mentes vízben végeztük, majd DNázI (Promega) kezelésnek vetettük alá 30 percig 37°C-on, 80 unit RNasin (Promega) RNáz inhibitor jelenlétében. Az RNS minőségét 1%-os formaldehid-agaróz gélen elektoforézissél, spektofotometriával és a Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz teljes hosszúságú transzkriptumának amplifikálásával (G3PDH amplimer set, Clontech,) ellenőriztük.

3.3. cDNS szintézis és könyvtárak létrehozása

A cDNS szintézist és könyvtárak készítését a SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech) segítségével végeztük, kisebb eltérésekkel a megadott protokolltól. 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. A duplaszálú cDNS sokszorozásához 1 μl-t használtunk az elsőszál cDNS szintézis reakcióelegyéből, továbbá 1 μl dNTP mixet (egyenként 10 mM), 5 μl 10X BD Advantage2 PCR Puffert, 10 μM primereket (CDSIII és 5'PCR), 1 μl 50X Advantage Polymerase (Clontech) mixet és 1 μl (5 U) KlenTaq LA DNA Polymerase mixet (Sigma), 50 μl végtérfogatban. A PCR reakció ciklusai a következők voltak: 5 perc 94 ^{o}C-os kezdeti denaturáció egy ciklus hosszan, amelyet 94 ^{o}C-on 1 perces denaturáció és 68 ^{o}C-on 7 perces elongáció követett 25 ciklus hosszan. A termékből 5 μl-t futtattunk 1 %-os agaróz gélen, hogy ellenőrizzük a cDNS mennyiségét és minőségét (hosszát). Tisztítás és kicsapás után 3 μg terméket *Sfi*I (Promega) enzimmel vágtunk, majd méret frakcionáltuk SizeSep400 (Pharmacia) kromatográfiás oszlop segítségével. A keletkező terméket kicsapás után *Sfi*I emésztett, defoszforilált λTriplEx2 fág-karokba ligáltuk, különböző ligálási arányok felhasználásával. A ligálási reakciókból 1 μl mennyiségeket használtunk az *in vitro* pakoláshoz (GigapackGold, Stratagene). Titrálást követően 1-2 x 10^6 pfu/ml rekombináns fágot tovább sokszoroztuk XL1-Blue baktérium törzsben, így 10^9 - 10^{10} pfu/ml nagyságrendű fágot kaptunk. A könyvtárakat 1xlabmda pufferben 10% DMSO hozzáadásával, -80 ^{o}C-on tároljuk.

A szarvasagancs cDNS klóntárakat AFLP fragmentek azonosítására (könyvtárszűrés), valamint agancs cDNS microarray fejlesztésére használtuk, amely munkák kollégáim doktori értekezését képezik.

<u>A könyvtár készítése során felhasznált primerek:</u>

SMART IV^{TM} Oligonucleotide
5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG – 3'
CDS III/3' PCR Primer
5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)30N–1N-3'
(N = A, G, C, vagy T; N–1 = A, G, vagy C)
5' PCR Primer
5' – AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT – 3'
5' Sequencing primer
5' – TCCGAGATCTGGACGAGC – 3'

3'Sequencing primer
5' – TAATACGACTCACTATAGGG – 3'
5' Insertscreening
5' – CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT – 3'
3' Insertscreening
5' – ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC – 3'

3.4. Microarray konstrukció

A microarray készítését és használatát már korábban leírták (Kitajka K et al. 2002; Puskas LG et al. 2002b) és az erre vonatkozó kísérleteket a Szegedi Biológiai Központ, Genomikai Laborjában végezték. Röviden: az egér microarray esetében 3200 szekvenálással visszaigazolt cDNS inzertet használtak, amelyet pSPORT1 (Invitrogen) vektorról sokszoroztak fel, M13 forward és reverse primerek felhasználásával. A termékeket MultiScreen-PCR plate (Millipore) kit-el tisztították, 50%-os DMSO/víz elegyben oldották és FMB cDNS lemezre nyomtatták MicroGrid Total Array System (BioRobotics) robot segítségével. A DNS mintákat duplikátumban nyomtatták 16 tűvel, 4x4-es formátumban. A pontok átlagos mérete 200 μm volt. Nyomtatás után a DNS mintákat UV keresztkötötték (Stratagene, 700 mJ), majd utókezelés és blokkolási lépések következtek (Puskas LG et al. 2002a; Puskas LG et al 2002b).
M13-forward primer: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13-reverse primer: 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

3.5. Próbakészítés és microarray hibridizáció

Próba készítéséhez 300 nanogramm egyesített agancs mRNS-t (100-100 nanogramm mennyisében a mezenhimából, elő-porcból és porcból) és 300 nanogramm magzati porc eredetű mRNS-t használtunk, amelyeket a Genisphere Expression Array 350 Detection system (Genisphere) segítségével írtak át a gyártó ajánlásának megfelelően. A jelőlt cDNS mintákat Ventana hibridizációs automatában (Ventana Discovery) hibridizáltatták az egér cDNS microarray-hez un. „antitest" protokoll segítségével. Az első hibridizációt 40 ^{o}C-on 6 órán keresztül végezték Chyphyb pufferben (Ventana), majd 2,5-2,5 μl Cy5 és Cy3 „capture" reagenst adtak hozzá 200 μl "Ribohyb" hibridizációs pufferben (Ventana) jelamplifikáció

céljából és 2 órán keresztül 42 ^{o}C-on inkubálták. A hibridizációt követően kétszer mosták 0.2XSSC-ben szobahőmérsékleten, majd megszárították és szkennelték.

3.6. Az adatok beolvasása (scanning) és kiértékelése

A szkennelést zöld (543 nm a Cy3 jelöléshez) és vörös (633 nm a Cy5 jelöléshez) lézerrel végezték ScanArray Lite (GSI Lumonics) konfokális lézerszkennerrel 10 µm-es felbontáson. A beolvasott adatokat GenePix3.0 (Axon Instruments Inc.) software-el értékelték. Az adatpontokat automatikusan pozícionálták egy rácsháló segítségével. Mindkét csatornára megállapították az átlag és médián intenzitás arányokat, valamint meghatározták minden egyes pontra a helyi hátteret és kiszámították az átlagos expressziós arányokat, ami az átlagos helyi háttérrel korrigált pixel intenzitás arányait jelöli (Kitajka K et al. 2002; Puskas LG et al. 2002b). A normalizálást a globális Lowess-módszerrel végezték (Puskas LG et al. 2002b). Kizártuk azokat az eredményeket, amelyek eltértek az azonos array-en lévő replika ponttól vagy az ismétléstől. A dolgozatban szereplő eredmények 4 adatpontból és 2 független kísérletből származnak (i.e. RNS tisztítás, jelölés és hibridizáció). Azokat az eredményeket definiáltuk „up-reguláltnak” v. „down-reguláltnak”, ahol legalább kétszeres volt az átlagos expressziós különbség.

3.7. Klónozási eljárások

Az összes agancsból azonosított (de nem a cDNS könyvtárból származó) cDNS fragmentet pBluescriptKS (R_{amp}) (Stratagen) vagy pGemTeasy (R_{amp}) (Promega) vektorba ligáltuk, majd DH5α baktériumtörzsbe transzformáltuk. A transzformáláshoz használt kompetens sejteket a Mandel és Higa (1970) által leírt módszer szerint készítettük és -80 ^{o}C-on tároltuk. Transzformálás során a kompetens sejteket 10 percig jégen tartottuk, majd a ligálási reakcióval elegyítve további 30 percig jégen hagytuk. Ezt követően 2 perces hősokkot alkalmaztunk 42 ^{o}C-on, majd 5 percig jégen hűtöttük a sejteket. A szelektív táptalajon való szélesztés előtt 1 órán keresztül antibiotikum-mentes LB tápoldatban, 37 ^{o}C-on regeneráltuk a sejteket. A klónozás sikerességét a felnőtt baktériumtelepekből származó plazmid DNS restrikciós emésztésével végeztük. Plazmid DNS tisztításához a Qiaprep plazmid miniprep kitet használtuk (Qiagen). A pozitív klónok valódiságát szekvenálással igazoltuk, amelyet Perkin Elmer ABI prism 377 DNS szekvenáló készüléken végeztek a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont szekvenáló laborjában.

A felhasznált primereket az Oligo vagy a Primer3 software-el terveztük. Az oligonukleotid szekvenciákat a mellékletben foglaltam össze.

3.8. Valós-idejű mennyiségi RT-PCR (Real-Time Q-PCR)

A mennyiségi meghatározáshoz 1 μg mRNS-t írtunk át 300 unit Superscript II reverz transzkriptáz (Life Technologies) segítségével 40 μl térfogatban, 200 nanogramm random hexamer (Promega) és 60 unit RNasin ribonukleáz inhibitor hozzáadásával. Az egyes transzkriptumok gyakoriságától függően az első szál cDNS-t 10-100 szorosra hígítottuk, amelyből 2 μl-t használtunk fel a PCR reakcióban. Ennek összetétele a következő volt: 10 μM primerek, 5 μM TaqMan próba (Fam+Tamra), 10 μl JumpStart Taq ReadyMix 2X premix (Sigma), valamint 0,5 μl (10 mg/ml) BSA (New England Biolabs), 20 μl végtérfogatban összemérve. A PCR reakciókat LightCycler 3 (Roche) készülékben futtattuk. Minden egyes kísérlet háromszoros ismétlésben szerepelt (mind az agancsminták esetében, ami a „target" volt, mind pedig a magzati porc esetében, ami referenciaként szolgált). A mért adatokat (C_T értékeket) a béta-aktin gén expressziójához normalizáltuk (méréseink szerint a béta-aktin gén expressziója nem változik a vizsgált agancszónákon belül) és a RelQuant software (Roche) segítségével elemeztük. A felhasznált oligonukleotidok és próbák szekvenciája a mellékletben találhatók.

3.9. *In situ* hibridizáció agancs metszeteken

A hibridizációkat egy korábban leírt módszert követve végeztük (Korpos et al., 2005). A szarvas *C21orf70* és szarvas *Osterix* cDNS-eket pGemTeasy vektorba klónoztuk, a szarvas *Collagen 2a1* gént a klóntárból azonosítottuk (pTriplEx vektorba ágyazva). A plazmid konstrukciók linearizálását követően az *in vitro* transzkripciót SP6, T7 vagy T3 RNS polimeráz enzimmel végeztük, amelyek segítségével jelölt sense és antisense ribo-próbákat nyertünk digoxigenin-UTP (Roche) beépítésével. A hibridizációt 60 ^{o}C-on (*C21orf70*) vagy 55 ^{o}C-on (*Osterix, Col2a1*) végeztük. A hibridizációt követően mosási sornak vetettük alá: kétszer 2XSSC-50%formamid, kétszer 2XSSC-25%formamid, majd kétszer 0,2XSSC-0,1%Tween20 oldatok felhasználásával. A detektálást a 3.10. fejezetben ismertetem.

3.10. Hibridizáció teljes egér embriókon (whole-mount) és egér embrió metszeteken

Az egér cDNS-ek azonosításához mRNS-t izoláltunk E10.5 (a vagina-dugó megjelenésétől számított napok száma) egér embriókból. Az egér C21orf70 (ezután mC21orf70) esetében egy 1280 bp hosszú szakaszt amplifikáltunk a következő primerek segítségével: forward pimer: 5'-TGCCATGAGATCTAGAGGACTC-3', and reverse primer: 5'-AAGGTGCTCGCC ATGGCCAGAC-3'. A Tenascin-C esetében egy 701 bp hosszú szakaszt amplifikáltunk a következő primerek segítségével: forward primer 5'-ATCAGT ACCACGGCTACCACAGA–3'; reverse primer 5' – GTGCGTGTAACTTC TGGCACTCT – 3'. A termékeket pBluescriptKS (mC21orf70) ill. pGEM-Teasy (Tenascin-C) vektorokba klónoztuk A Digoxigenin-UTP jelölt próbákat a fentebb leírtak alapján végeztük. A hibridizációt standard protokoll szerint végeztük (Xu Q and Wilkinson DG 1998), 5 μm vastag metszeteken (agancs és egér esetében egyaránt), amelyeket Microm (Microm GmBh, Germany) készülékkel metszettünk . Röviden, 10 μg/ml proteinase K emésztést alkalmaztunk a teljes embriók és a metszetek feltárásához, természetesen az embrió stádiumához optimalizált ideig. A hibridizációt 67 °C-on (mC21orf70, whole-mount), 60 °C-on (m*C21orf70,* metszet), vagy 53 °C-on (*Tenascin-C*, metszet) végeztük a 3.15-ös szekcióban feltüntetett pufferekben. A digoxigenin jelölt RNS-t juh anti-digoxigenin-alkálikus-foszfatáz antitestel (Fab fragment, Roche) detektáltuk alkálikus foszfatáz reakcióval egybekötve. Kromogén szubsztrátként nitrotetrazolium-kék- kloridot (NBT) és a 5-bromo-4-kloro-3-indolyl foszfatázt (BCIP) használtunk (Sigma). A metszeteket Kaiser-féle glicerines zselatinnal (Pharmacia) fedtük le.

3.11. A rekombináns mC21orf70 fehérje szub-celluláris lokalizációja

Az m*C21orf70* teljes kódoló szekvenciáját Pfu DNS polimerázzal (Promega) amplifikáltuk a következő primerek segítségével: forward 5' - TAG CGG AAT TCT CCA GGG AAG ATG – 3', reverse 5' - CCT CTA GAT CTC ATG GCA CAC ACT – 3'. A PCR terméket *Eco*RI-*Bgl*II enzimekkel emésztettük, majd *Eco*RI-*Bam*HI emésztett pEGFP-C1 (Clontech) vektorba ligáltuk. A kapott konstrukciót (pC21orf70-EGFP) szekvenálással ellenőriztük. Egér embrionális fibroblasztot (MEF) E13.5 egér embriókból izoláltuk (ICR törzs), amelyet antibiotikum és 10% FBS-el kiegészített DMEM médiumban tartottunk fel. A tranziens transzfekcióhoz 5 μg plazmidot (kontrol és kísérleti) elektroporáltunk a sejtekbe Genew

Pulser X-cell (BioRad) készülék segítségével, elektroporációs pufferben, a következő beállításokon: 240 V, 500 μF, 250 Ω ; 4 mm elektród távolságú küvettában. A kísérletet 24 órával követően a sejteket fotografáltuk Olympos IF71 mikroszkóp és DP70 kamera (Olympos) felhasználásával.

3.12. Túltermeltetési teszt (overexpresszió) RCS sejtekben és szemikvantitatív RT-PCR

Az mC21orf70 cDNS-t pCDNA3 ($R_{amp+neo}$) vektorba (Life Technologies) ligáltuk, DH5α baktérium törzsbe transzformáltuk, majd szekvenálással ellenőriztük. Az RCS (Rat Chondrosarcoma) sejteket 6 üregű lemezekben növesztettük, majd Kollagenáz-A (Sigma) enzimes emésztést (Mukhopadhyay K et al. 1995) követően 3 párhuzamos kultúrát transzfektáltunk FuGene6 (Roche) transzfekciós reagens felhasználásával. Az élő sejtszám normalizálásához MTT tesztet végeztünk standard eljárás szerint (DeLise AM és Tuan RS, 2000). A transzfekciós hatékonyságot a gyártó instrukcióinak megfelelően optimalizáltuk pEGFP-C1 vektor felhasználásával. A transzfeció mértékét FACS analízissel határoztuk meg. A FuGene6 reagens higításához OptiMeM (Life Technologies) szérum-mentes tápoldatot használtunk. A sejtek inkubálását 24 óra elteltével befejeztük és totál RNS-t tisztítottunk belőlük RNA Bi (AMS Biotechnology, UK) reagens felhasználásával.
A szemikvantitatív PCR analízishez 4 μg DNázI-kezelt RNS-t írtunk át reverz transzkripcióval a fent említett módon, majd tízszeres hígítást követően 2-2 μl templátot használtunk a PCR reakciókhoz. A ciklusszámot minden egyes vizsgált génre nézve úgy optimalizáltuk, hogy az amplifikáció kezdeti, lineáris fázisában tudjuk detektálni. A primereket úgy terveztük, hogy 300 bp körül legyenek. Az oligonukleotid szekvenciák a mellékletben találhatók. A PCR protokoll a következő volt: kezdeti denaturáció 94 C°-on 5 percig (1 ciklus), majd 94C° 40 másodpercig, 58 C° 30 másodpercig és 72 C° 45 másodpercig különböző ciklusszámmal (ld. melléklet), végül 72 C° 5 percig (1 ciklus). A reakciókat 3 párhuzamos kísérletben végeztük. A PCR termékeket 1,5%-os agaróz/TBE gélen futtattuk, majd gél képeket készítettünk Kodak Digital Science 1D (Kodak, USA) készülék segítségével. A csík intenzitásokat GeneTools softwear (Syngene) segítségével analizáltuk és a *glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz* gén expressziójához normalizáltuk.

3.13. Northern hibridizáció

A totál RNS tisztítása során a Chomczynski, P. és Sacchi, N. (1987) féle módszert követtük. A folyékony nitrogénben tárolt szövetmintákat (kb. 500 mg-os darabokat) először porrá törtük, ezt követően két térfogat 5 M guanidium-tiocianátban homogenizáltuk, majd savas fenol-kloroformban vontuk ki. A totál RNS-t izopropanollal csaptuk ki, majd 80 %-os etanolban mostuk, szárítás után RNáz-mentes vízben oldottuk. A Northern analízishez 10 µg RNS mintákat futattunk 1,2 %-os formaldehid-agaróz gélen, majd HybondN+ (Amersham) membránra vittük át kapilláris blottolási technikával (Sambrook J et al., 1989). A próbákat (kb. 50 ng) [α^{32}P]dATP –vel jelöltük random hexamer és *E. coli* DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega) felhasználásával, „random priming" pufferben.

A hibridizációkat 65 C°-on végeztük PerfectHyb TM Plus (Sigma) pufferben, majd a membránokat ugyan ezen a hőmérsékleten (2xSSC-0,1%SDS, majd 0,2xSSC-0,1%SDS) mostuk. A radioaktív jelet Storm Phosphorimager készülék (Molecular Dynamics) segítségével detektáltuk.

3.15. Standard pufferek:

10xMAE (pH 7):	MOPS	0,5M
	EDTA	100 mM
10xlambda puffer:	NaCl	1.0 M
	$MgSO_4$•7H2O	0.1 M
	Tris-HCI (pH 7.5)	0.35 M
1xlambda puffer:	10x lambda puffer tízszeres higítása desztillált vizzel és 0,01% zselatin hozzáadása	
5xTBE:	Tris bázis	445 mM
	Bórsav	445 mM
	EDTA	10 mM
20xSSC:	Nátrium-citrát	300 mM
	NaCl	3 M
Random priming jelölő puffer:	Tris·Cl (pH 8.0)	0,5 M
	BSA	4 mg/ml
	$MgCl_2$	50 mM
	DTT	100 mM

	dNTP mix	20 mM dCTP, dGTP, TTP
	HEPES (pH 6,5)	2 mM
Hibridizációs puffer- whole mount:	Blocking reagens	1%
	Formamid	50%
	SSC	5x
	Torula RNS	1 mg/ml
	Heparin	1 mg/ml
	Tween-20	0,1%
	CHAPS	0,1%
	EDTA	5 mM
Hibridizációs puffer-*in situ*:	Formamid	50%
	Tris·Cl (pH 7,6)	100mM
	tRNS	0,2 mg/ml
	Denhard's reagens	1x
	Dextrán-szulfát	10%
	NaCl	0,5 M
	SDS	0,05%
	EDTA	1 mM
Detektáló puffer- *in situ:*	Polivinil-alkohol	10%
	Tris·Cl (pH 9,5)	100 mM
	NaCl	100 mM
	$MgCl_2$	5 mM
Elektroporációs puffer:	HEPES (pH 7.0)	20 mM
	NaCl	137 mM
	KCl	5 mM
	Na_2HPO_4	0,7mM
	glükóz	6 mM
	β-merkaptoetanol	0,1 mM

Táptalajok:

LB médium:	Bacto tripton	10g	1000 ml
(pH 7.0)	Bacto élesztő kivonat	5g	
	NaCl	10g	

LB agar lemez: 12g agar/1 liter LB médium

LB top agar: 7g agar/1 liter LB médium

A felhasznált baktériumtörzsek genotípusa:

E. coli DH5α	*supE44 ΔlacU169 (φ80 LacZΔM15)*
(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' lacI qZ DM15, proAB, Tn10]*

4. EREDMÉNYEK

4.1. A vizsgált agancsminták és a magzati porclemez szövettani leírása

Az agancs csúcs szövettani leírása korábbi publikációkban részletesen megtalálható (Banks JW és Newbry WJ 1983; Price JS et al. 1996; Korpos É et al. 2005). A dolgozat szempontjából azonban lényegesnek tartom annak rövid leírását a saját tapasztalataink szerint, amely jól egyezik a fenti leírásokkal.

Munkánk során az ún. barkás-bársonyos agancsot három fő szövettanilag elkülöníthető zónára szeparáltuk: mezenhima, elő-porc és porc zónákra (9.A. ábra).

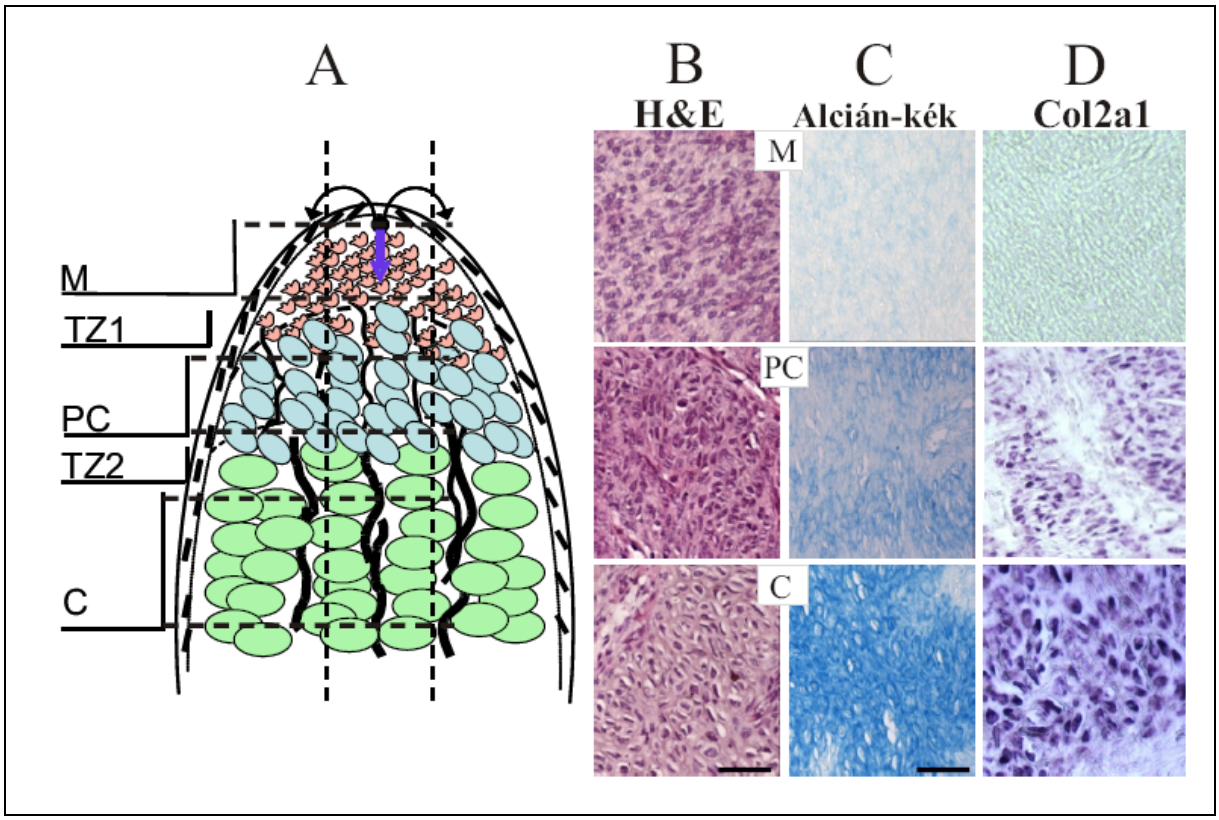
Az agancs csúcs apikális részén található a mezenhima szövetréteg, vagy más néven tartalék mezenhima, amely elnevezés arra utal, hogy az amúgy embrionális kötőszövetek közé tartozó mezenhima szövet megmarad a felnőtt állatban és intenzív osztódásával templátot szolgáltat új szövetek létrehozásához. A csúcsi részben, közvetlenül a dermisz alatt található régióban a perichondrium fibrózus rétege található, amely itt nagyon keskeny sejtekből álló, rostos kötőszöveti extracelluláris mátrixban gazdag szövet. Ez alatt található a mezenhimából származtatható (nem publikált megfigyelésünk) porchártya sejtes állománya, amely itt szorosan együtt álló, orsó alakú sejtekből áll. A mezenhima mélyebb rétegében a sejtek csillag formájúvá válnak és a differenciáció előrehaladtával megnő a térfogatuk. A mezenhima réteg a csúcsi részben a legvastagabb, azonban megtalálható végig az agancs oldalsó felszínén is körkörösen, mint a perikondrium és később a periosztеum belső, sejtes rétegeként (ezután „oldalsó mezenhima”). Az általunk már nem vizsgált zónában (proximálisan a vizsgált porc zónától) intramembrán csontosodással csontgallér képződik közvetlenül a mezenhimából. A csúcsi mezenhima keskeny vérereket tartalmaz vékony perivaszkuláris szövettel övezve, amelyek párhuzamosan futnak az agancs hossztengelyére nézve.

Az elő-porcszöveti zóna morfológiailag nagyon hasonló, de sejttanilag heterogén pre-kondroblasztokból és kondroblasztokból tevődik össze. A tojásdad vagy orsó alakú sejtek a vérerek mentén hengeres elrendezésben épülnek fel. A vérerek itt már vaskosabbak, mint a mezenhimában, a perivaszkuláris zóna is kifejezettebb.

A vizsgált porcszöveti zóna főleg érett és hipertóf sejtekből áll és a vérerek között porc-gerendákat hoz létre (9.BC. ábra). Jól szemlélteti a porc fejlődését a II-es típusú kollagén (*Col2a1*) progresszív felhalmozódása, amit az 1. ábra *in situ* hibridizációs képei mutatnak: a mezenhimában gyakorlatilag nem detektálható, az elő-porcban gyenge, míg a porcban erőteljes expressziót mutat a *Col2a1* gén (9.D. ábra). Szintén jól megfigyelhető alcián-kék

festés segítségével a GAG molekulák progresszív felhalmozódása a mezenhimától a porcszövet irányába.

Az összehasonításként szereplő szarvas magzati porclemezben felismerhetők a jól definiált képletek: nyugvó, osztódó, hipertóf porcsejtek, valamint az elsődleges csontosodási központ egy része (13.F. ábra).



9. ábra: Az agancscsúcs sematikus ábrázolása

A.: Az ábra az agancscsúcs fő szövetzónáit jelöli. M: mezenhima; PC: elő-porc; C: porc; TZ: átmeneti zónák. A szaggatott vonalak közötti terület a mintavételi helyeket jelöli. Apró rózsaszín alakzatok: mezenhima; kék ovális formák: elő-porc; zöld ovális formák: porc; fekete csíkok: perikondrium; fekete hullámos vonalak: vérerek. A három-irányú nyíl a mezenhima sejtpopulációk útvonalát jelöli (fekete nyíl a perikondrium-, kék nyíl az elő-porc irányába). **B.**: H&E: hematoxilin és eozin festés; **C.:** alcián-kék festés; **D.:** Col2a1: II-es típusú kollagén - *in situ* hibridizáció. Vonalmérték: 100 µm.

4.2. Az egér cDNS microarray-en detektált agancs génexpressziós profil

Az agancs csúcs génexpressziós profilját szarvas magzat növekedési porclemezével hasonlítottuk össze, mivel széles körben elfogadott nézet szerint az agancs képződése egy módosult endokondrális csontosodási típust képvisel. Mivel a kísérlet idején még nem létezett

szarvas microarray (azóta már létrehoztuk az elsőt a világon), ezért egy olyan egér cDNS microarray-t készítettünk, amely 3200, vegyes könyvtárakból származó génpróbát hordozott, majd ezt használtuk az expressziós profil felállításához. Mivel a magzati növekedési porclemez nem tartalmazza az agancsban megtalálható homológ szöveteket, mint a mezenhima és elő-porc, ezért azoknak a géneknek a fokozott működését vártuk az agancsban a porclemezhez képest, amelyek (i) szerepet játszanak a mezenhima porc (és talán csont) irányú differenciációjában, valamint (ii) az agancsporcban fellelhető fokozott működésük felelős lehet az agancs intenzív növekedésében. Ezzel az összehasonlítási eljárással a háztartási gének nagy része is kiszűrhető, hacsak magas expressziójuk nem szükséges a robosztus agancsnövekedést jellemző fokozott metabolikus igényhez. A microarray hibridizáció eredményeként 15 olyan gént kaptunk, amely expressziója minimum kétszerese volt a növekedési porclemezben tapasztaltaknak (1. táblázat). Eredményként megjelentek a magas metabolikus igényt reprezentáló gének, mint pl. a *Peroxysomal long-chain acyl-CoA thioesterase* (peroxiszómális enzim), *Gluthatione-S-transferase alpha 2* (mitokondrális enzim), *CTD small phosphatase 2* (riboszóma, megnövekedett transzlációs aktivitás) és a *Golgi reassembly stacking protein 1* (Golgi-apparátus, megnövekedett poszt-transzlációs aktivitás). A géneket tovább osztályoztuk annak alapján, hogy ismert e a szerepük a porc-, vagy csontképződés kapcsán. Különösen érdekesnek találtuk az ún. Polycomb gének megjelenését, hiszen eddig kevés publikáció említi feltételezhető szerepüket a csontfejődés kapcsán. Az 1. táblázat a gének és az öröklődő betegségek kapcsolatát is feltünteti, valamint azt, hogy az eddigi kutatások vizsgálták e valamilyen állat modellen a funkciójukat (homozigóta null-mutáns egér, géncsendesített vagy túltermeltetett gén).

Természetesen az ún. „down-regulált” géneket is megvizsgáltuk a microarray hibridizáció során, azonban ez nem tartozott az eredeti kérdésfeltevéshez, valamint a fenti kifejezés itt más értelmet nyer: erősebben expresszálódó géneket jelent a magzati porclemezben (ld. a 2. táblázatot az M2.1. mellékletben). Szembetűnő volt a fehérjelebontás ún. proteoszómás útvonal génjeinek (és egyéb háztartási gének) megjelenése, azonban ezekről a génekről nem találtunk információt, hogy milyen szerepük lehet a vázfejlődésben. A fehérjelebontás génjeinek csökkent működése számunkra azt jelenti, hogy az agancsnövekedés során a felépítés (anabolizmus) dominál a lebontó folyamatok (katabolizmus) felett.

1. táblázat: A heterológ microarray hibridizáció eredménye. Az agancsfejlődésben szerepet játszó kandidáns gének, amelyek expressiója ≥2X értéket mutat a kontroll szarvas magzati porchoz képest (médián értékek) **A.:** Gének, amelyeket már kapcsolatba hoztak a vázfejlődéssel. **B.:** Gének, amelyek szerepét még nem igazolták a vázfejlődés kapcsán

	A GÉN NEVE	ELÉRÉSI SZÁM	A VÁLTOZÁS MÉRTÉKE	FUNKCIÓ	MUTÁNS FENOTÍPUS
A	Growth arrest specific 2 (Gas2)	AA423395	2,00 **V**	Apoptózis és kondrogenezis	Fokozott érzékenység a a p53 függő apoptózisra **(ov-ex) (a)**
	Bmp Receptor type 2 (BmpR2)	AA276913	2,04 **V**	TGF-béta signalizáció	Primary pulmonary hypertension(OMIM-600799), gasztruláció leállása **(-/-) (b)**
	Glypican 3	AA274932	2,08 **V**	Bmp4 szignalizáció modulálása	Simpson-Golabi-Behmel Szindróma (OMIM300037)
	Sprouty homolog 1	W82668	2,25 **V**	FGF szignalizáció	Chondrodisplasia **(ov-ex) (c)**
B	G-rich sequence binding factor 1 (Grsf1)	AA222738	2,00 **V**	Transzlációs szabályozás Wnt szignalizáció	Megrövidült hátulsó testfél, A neuroepitélium túlnövése **(RNAi) (d)**
	Peroxisomal long-chain acyl-CoA thioesterase	W70705	2,00	Metabolizmus	**ND**
	CTD small phosphatase 2	AA253923	2,00	Transzláció	**ND**
	Ring 1 and YY1 binding protein (Rybp) (D)	AW545359	2,16	Transzkripciós represszió	**ND**
	Mitochondrial ribosomal protein S25	AA290443	2,20	Metabolizmus	**ND**
	Glutathione-S-transferase alpha 2 (Yc2)	AA274682	2,41	Transzláció	**ND**
	Neuronal protein 3.1 (p311)	AA259807	2,45 **V**	TGF-béta szignalizáció	**ND**
	C21orf70	AA242209	2,50	Ismeretlen	**ND**
	Golgi reassembly stacking protein 1	AA222141	2,75 **V**	Golgi struktúrális protein	**ND**
	Tribbles homolog 2 (Trb2)	AA268333	2,91 **V**	Sejtosztódás	**ND**
	Ring finger protein 2 (Rnf2) (D)	AA407545	3,50 **V**	Transzkripciós represszió	Gasztruláció leállása **(-/-)** homeotikus transzformáció **(ov-ex) (e, f)**

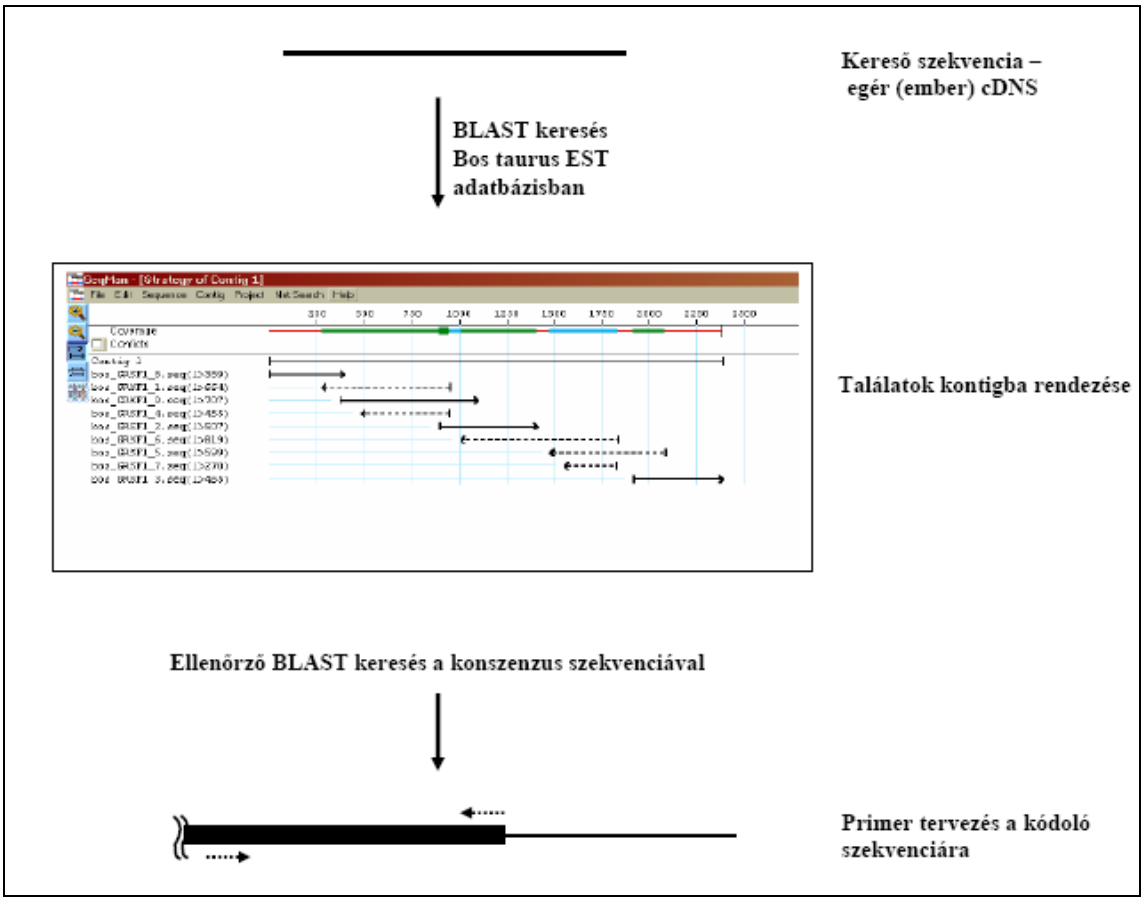
V.: Validálva valós idejű RT-PCR-el
ND.: Nem vizsgált; **D.:** két különböző mátrixponton detektált
OV-EX.: ha túltermeltették; **(-/-):** homozigóta null-mutáns egér
RNAi.: gén-csendesített
a.: Benetti R et al. (2001)
b.: Beppu H et al. (2000)
c.: Minowada G et al. (1999)
d.: Lickert H et al. (2005)
e.: Voncken JW et al. (2003)
f.: Suzuki M et al. (2002)

4.3. A szarvas ortológ gének azonosítása

Ahhoz, hogy meg tudjuk erősíteni a heterológ microarray hibridizáció eredményeként kapott géneket, szükségünk volt az ortológ szarvas gének szekvenciáinak ismeretére. Független módszernek a mennyiségi valós idejű QRT-PCR-t választottuk. Az 1. táblázat génjei közül 9 olyan gént választottunk ki, amelyeknek valamilyen közük lehet a csontfejlődéshez, vagy nem ismert a funkciójuk. A tizedik gén a béta-actin háztartási gén volt, amely mint normalizációs kontroll szerepelt.

Mivel nagyon csekély számú szarvas cDNS szerepel az adatbázisokban a szarvas ortológ gének azonosításához az általunk zoo-klónozási eljárásnak elnevezett módszert fejlesztettük ki. Lényege, hogy először az egér cDNS szekvenciával BLAST keresést végeztünk a szarvasmarha EST adatbázisban. Az így kapott találatokat a SeqMan (DNAstar) program segítségével kontigokba rendeztük, így az átfedő EST szekvenciákból viszonylag hosszú szekvenciákat nyertünk. Ezen hosszabb szekvenciákkal újra BLAST keresést végeztünk, hogy ellenőrizzük valóban az adott mRNS-t kódolja a kapott nukleotidsorrend (10. ábra). Mivel a szarvasfélék (*Cervus*) és a marhafélék (*Bos*) közeli rokonságban álló nemzetségek, a szarvasmarha felépített mRNS kontigok kódoló szakaszára terveztük a primereket. A tapasztalatunk azt mutatta, hogy a hasonlóság a gímszarvas és a szarvasmarha szekvenciák között 90-99%-os az mRNS-ek kódoló részén. Abban az esetben, ha az adatbázisok nem tartalmazták az adott mRNS-nek megfelelő EST szekvenciákat, többszörös illesztést végeztünk annyi emlősfajtól származó szekvenciákkal, amennyi elérhető volt. Az így kapott konszenzus szekvenciákra terveztük a primereket. A *Gas2, Grsf1, Glypican3, p311, C21orf70, Trb2,* és *Rnf2* génekre a marha szekvenciák felhasználásával, míg a *BmpR2* és *Sprouty1* génekre a konszenzus szekvenciák alapján terveztük a primereket. A kapott cDNS fragmenteket klónozás után szekvenáltuk. Az eredmény azt mutatta, hogy az adott szarvas mRNS 80-98%-os hasonlóságot mutat a megfelelő egér génszakasszal, 83-94%-os hasonlóságot az emberi, és ahogy azt reméltük, 91-98%-os hasonlóságot a szarvasmarha gén szakaszokkal (M.2.6. melléklet, 6. táblázat). A gímszarvas mRNS szekvenciákat elküldtük a GenBank adatbázisba. A primerek oligonukleotid sorrendje, valamint a GenBank elérési számok a mellékletben találhatók (3. táblázat).

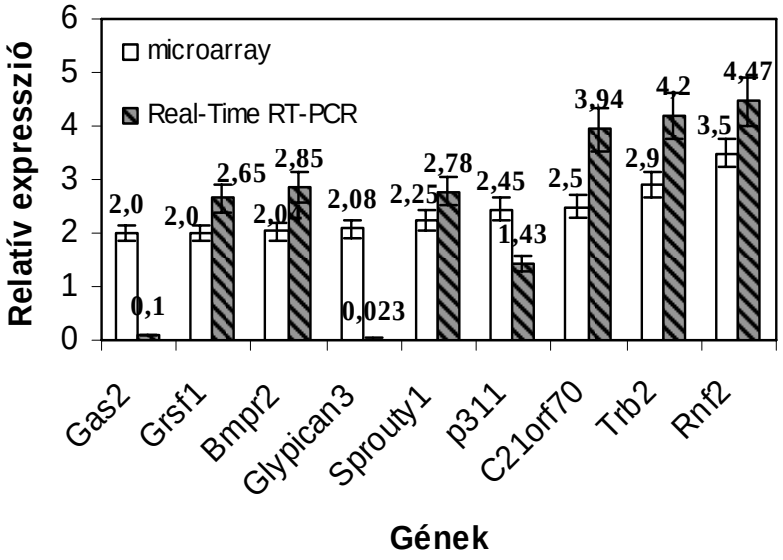
A fenti két módszerrel számos porc- és csontfejlődési marker gént is azonosítottunk a gímszarvasban: *Cbfa1, Bone sialoprotein, Msx1, Bmp2, Bmp4, Dlx5, Fgf8, FGFR4, Gdnf, N-cadherin, Osteopontin, Osterix, Sox9, Twist1, Tenascin-C* és *Wnt1* géneket (nem publikált eredmények).



10 ábra: A zoo-klózozási eljárás munkafolyamata

4.4. A microarray adatok validálása

A microarray adatok megerősítése kvantitatív PCR segítségével történt. A kilenc kiválasztott gén közül hat gén esetében tapasztaltunk a microarray adatokkal egybeeső eredményeket. Egy gén esetében (p311) szintén fokozott expressziót tapasztaltunk (1,43- szoros különbség), de nem érte el a kétszeres expressziós különbséget. Két gén esetében ellentétes eredményeket mutatott a kvantitatív PCR, tehát a magzati porclemezben magasabb volt az expressziójuk (11. ábra). Ezeket a géneket kizártuk a további vizsgálatokból.



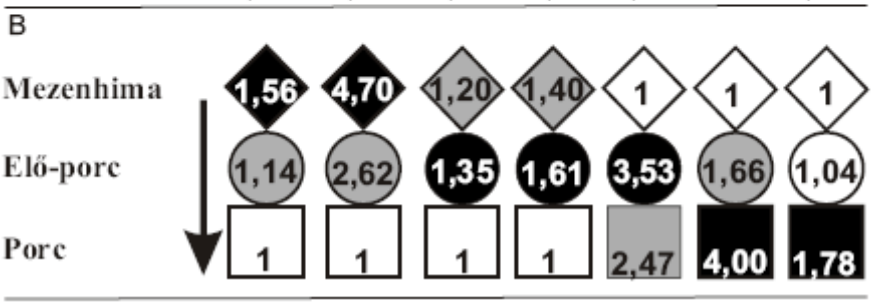
11. ábra:

A heterológ microarray hibridizáció (üres oszlopok) és a kvantitatív valós-idejű PCR (csíkozott oszlopok) eredmények összehasonlítása 9 kiválasztott gén esetében. Relatív expresszió: génexpresszió az agancsban *per* génexpresszió a magzati növekedési porclemezben.

A gének expressziós profilját az agancs különböző szövetrétegeiben is meghatároztuk (12. ábra). A kiválasztott (validált) gének expressziós szintjét, a *p311* nevű gént is beleértve (mivel erről a génről még nem szerepelt eddig információ a vázfejlődés kapcsán) páronként elemeztük: (1) a mezenhimát viszonyítottuk az elő-porchoz, (2) a mezenhimát viszonyítottuk a porchoz, (3) valamint az elő-porcot viszonyítottuk a porchoz. Természetesen ebben az esetben is az expressziós értékeket a béta-aktin gén expressziójához normalizáltuk. Az expressziós értékek a 12.A ábrán láthatók. Ahhoz, hogy az expressziós dinamikát szemléltetni tudjuk, bevezettünk egy ún. expressziós logot. Ennek célja, hogy egyszerű rátekintéssel meg tudjuk állapítani azt, hogy melyik agancs zónában a legerősebb az egyes gének expressziója, valamint azt, hogy hogyan változik az expressziójuk az agancsfejlődés során, ami egyben azt is jelenti, hogy hogyan változik a gének aktivitása a differenciáció során a mezenhimából porcszövet irányába (12.B ábra).

A hét vizsgált gén közül 2 génnek a mezenhimában volt a legmagasabb az expressziója (*Grsf1, Sprouty1*), 3 génnek az elő-porcban (*Trb2, Rnf2, C21orf70*) és 2 génnek a porcban (*p311, BmpR2*). Ez utóbbi géneket „robusztus" típusúaknak neveztük el, mivel a porcszövetben mutatott magas expressziójuk hozzájárulhat az agancs felfokozott növekedéséhez. Ha az expressziós változásokat is figyelembe vesszük ötféle expressziós mintázatot láthatunk. Azonban három esetben tapasztalható az agancs szövetrétegek közötti jelentős expressziós változás: a *Sprouty1* (4,7- szeres), az *Rnf2* (3,5- szeres) és a *BmpR2* (4-szeres) esetében.

A	*Grsf1*	*Sprouty1*	*C21orf70*	*Trb2*	*Rnf2*	*BmpR2*	*P311*
Mezenhima *per* Elő-porc	1,367 ± 0,107	1,761 ± 0,112	0,896 ± 0,063	0,919 ± 0,137	0,283 ± 0,038	0,601 ± 0,001	0,960 ± 0,023
Mezenhima *per* Porc	1,563 ± 0,038	4,700 ± 0,234	1,210 ± 0,085	1,411 ± 0,111	0,404 ± 0,011	0,250 ± 0,024	0,569 ± 0,085
Elő-porc *per* Porc	1,144 ± 0,117	2,622 ± 0,251	1,351 ± 0,127	1,615 ± 0,097	1,592 ± 0,131	0,412 ± 0,038	0,589 ± 0,043



12. ábra:

Génexpressziós arányok és dinamikák az agancs vizsgált szöveti zónáiban.

A.: Génexpressziók kvantitatív, páronkénti összehasonlítása az agancs három (a differenciációban egymást követő) szöveti zónában, valós idejű kvatitatív PCR segítségével.

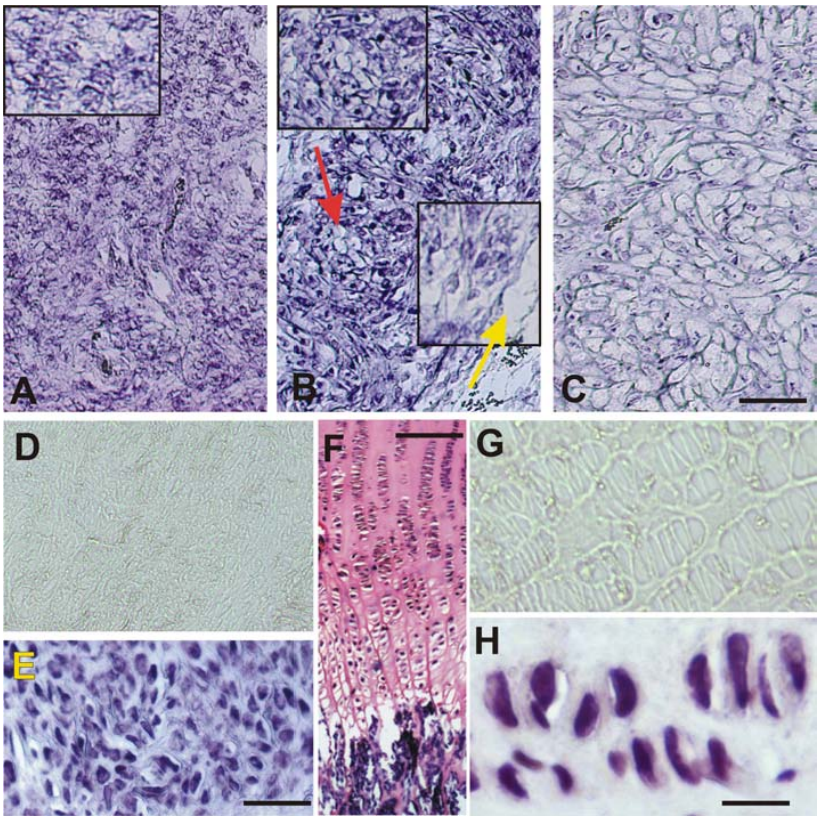
B.: Az expressziók sematikus ábrázolása „logó" segítségével az ábra **(A)** részének adatai alapján. Rombusz: mezenhima-; kör: elő-porc-; négyzet: porc zónát jelöli. A szimbólumokon belüli számok relatív expressziós értékeket jelölnek, ha a legalacsonyabb expressziót egységnek tekintjük.

4.5. A szarvas C21orf70 mRNS *in situ* lokalizálása agancs metszeteken

Az egyik visszaigazolt gén esetében semmiféle adat nem állt rendelkezésre a funkciójáról a vázfejlődés kapcsán, ezért kíváncsiak voltunk, hogy az agancs milyen sejttípusaihoz köthető

az aktivitása. Ez a *C21orf70* (a humán 21-es kromoszóma 70-es nyitott leolvasási kerete) nevű gén volt. Ezt a gént emberben találták a 21-es kromoszóma transzkripciós egységeinek vizsgálatakor és *PRED56*-nak nevezték el (Reymond et al., 2001).

Az agancs csúcsban *in situ* hibridizációval detektáltuk a *C21orf70* (szarvas ortológ) transzkriptum jelenlétét (13. ábra). A mezenhimában egyöntetűen közepesen erős jelet detektáltunk. Az elő-porc zónában valamivel erősebb jelet kaptunk. A képződő elő-porc nodulusok (kondenzációs egységek) szélső, laposabb sejtjei erősebb expressziót mutattak, mint a csomók közepén elhelyezkedő már differenciáltabb, kerek sejtek. A perivaszkuláris zóna sejtjei hasonló intenzitást mutattak, mint a mezenhima sejtjei. A porcszöveti zónában, mind a mezenhimához, mind az elő-porchoz képest gyengébb expressziót tapasztaltunk. A kapott eredmény összhangban van a kvantitatív PCR mérések adataival. Megvizsgáltuk a *C21orf70* expresszióját a szarvas magzati porclemezben is, de a mi rendszerünkben a detektálási határ alatt maradt, míg a pozitív kontrollként szereplő *Col2a1* antiszensz próba erős jelet adott.



13. ábra

A C21orf70 RNS (szarvas ortológ) *in situ* lokalizálása agancs metszeteken.

13. ábra jelmagyarázat: A *vörös nyíl* az erek közötti elő-porc kondenzációkat mutatja, a *sárga nyíl* a perivaszkuláris szövetet jelöli. A: mezenhima; B: elő-porc; C: porc-szöveti zónák. D: *In situ* hibridizáció szensz *C21orf70* RNS próbával agancs metszeten (negatív kontroll). E: *In situ* hibridizáció antiszensz *Col2a1* próbával agancs metszeten (pozitív kontroll). F: Példa a kísérletekben szereplő szarvas magzat növekedési porclemezének szövettani felépítésére; hematoxilin-eozin festés. G: *In situ* hibridizáció antiszensz *C21orf70* RNS próbával szarvas magzati porclemezen. H: *In situ* hibridizáció antiszensz *Col2a1* RNS próbával szarvas magzati porclemezen (pozitív kontroll).
Mértékvonalak: 80 µm (A-C); 100 µm (E); 200 µm (F); 50 µm (H).

4.6. Az egér C21orf70 mRNS in situ lokalizálása teljes embriókon és metszeteken

Tágabb értelemben véve az agancsregeneráció során történő differenciáció nagyban hasonlít az embrionális végtag fejlődéséhez, azzal az eltéréssel, hogy ott izomelemek képződése is követi a porcelemek kialakulását. A C21orf70 embrionális fejlődés alatti expressziója nem ismert. A gén expressziójának lokalizálásához E9.0, E10.5, E11.5, E12.5 és E13.5 stádiumú teljes embriókon ill. metszeteken végeztünk *in situ* hibridizációs kísérleteket. Az embriók stádiumát a párzási nyálkatömlő megjelenésétől számítottuk (plusz fél nap), valamint a boncolás után megállapítottuk a fejlettségüket a szomiták száma és egyéb jellegzetes képletek alapján (EMAP, embryo stage selector, http://genex.hgu.mrc.ac.uk/Atlas/intro.html). Az anatómiai képleteket atlasz segítségével azonosítottuk (Kaufman MH, 1992).
Az E9.0 stádiumú embriókban (15-18 pár szomita) a legjellegzetesebb a feji mezenhimában tapasztalható szignál volt az elő- és középagy szintjén középvonalban, a velőcső elülső záródásának régiójában (14.A. ábra). Ennek a stádiumnak jellemző sajátossága a velőcső feji végének záródása. Szintén erős jelet kaptunk a fejlődő látó-hólyag területén, de nem tudtuk eldönteni, hogy a tapasztalt jel a neuroepitéliumban vagy pedig a feji mezenhimában van, amely utóbbi ebben a stádiumban még elválasztja a látó-hólyagot a felszíni ektodermától. Közepesen erős jelet tapasztaltunk az első kopoltyúív állkapcsi részében. Erre a stádiumra jellemző a testfal oldalsó részén megjelenő redő, ahol közepes erősségű jelet detektáltunk azon a tájékon, ahol az elülső végtagbimbó kitűrődése várható. A jel azonban jóval diffúzabb volt, mint amit az FGF8 expressziójánál tapasztaltak (McGrew MJ és Pourquie O, 1998).
Az E10.5 stádiumú embriókban (35-38 pár szomita) gyenge jelent kaptunk mindenhol a testen (14.B. ábra). Erős jelet tapasztaltunk azonban az előagy, az oldalsó frontonazális nyúlvány és a középagy oldalsó területén. A látó-hólyagban tapasztalt szignál az előző stádiumhoz képest

nagymértékben csökkent. Közepesen erős jelet tapasztaltunk a halló-hólyag környékén és a második kopoltyúív csúcsának poszterio-laterális oldalán. A legjellegzetesebb az erős és éles szignál volt az apikális ektodermaredő körül (AER).

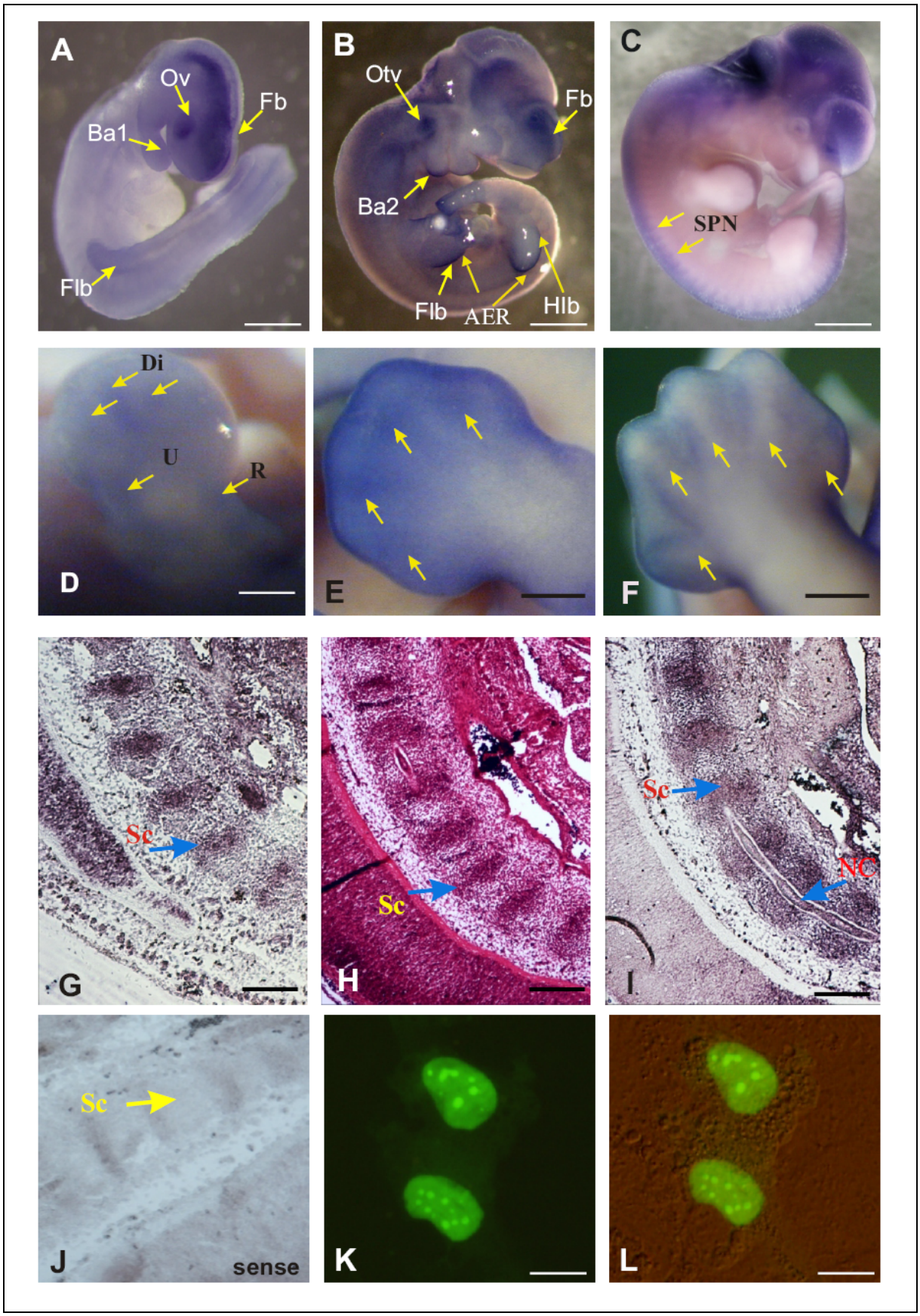
Az E11.5 stádiumú embriókban (43-48 pár szomita) a C21orf70 expressziója dominánsan az idegrendszerben jelent meg legerősebben (14.C. ábra). A gerincvelői idegek szegmentált elrendeződése a test hossztengelye mentén jól látszódott a jelölt *C21orf70* mRNS lokalizálásával. Az apikális ektodermaredő körüli jel nagyrészt eltűnt. Valamivel fejlettebb állapotú E11.5 embriókat (14.D. ábra) megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a végtagbimbók átvilágításával viszonylag gyenge jelet adtak, de jól látszódtak a végtagban kialakuló mezenhimális elő-porc kondenzációk (ujjak, alkar és lábszárcsontok elő-alakjai). Úgy véljük, hogy az m*C21orf70* specifikusan a mezenhimális kondenzációhoz toborzódó sejtekben expresszálódik, tehát a kondenzáció megindításában játszik szerepet.

Az E12.5 stádiumú embriókban (48-51 pár szomita) az m*C21orf70* expresszióját csak a középagy területén detektáltuk (az adat nem látszik), valamint gyengén a fejlődő végtaglemezekben az ujjak közötti hártyában (14.E. ábra). Úgy gondoljuk, hogy a mezenhimális elő-porc kondenzáció ebben a stádiumban még folytatódik az által, hogy új mezenhima sejtek toborzódnak és rakódnak rá a fejlődő blasztémára az ujjak közötti mezenhimából.

Az E13.5 stádiumú embriókban (52-55 pár szomita) az m*C21orf70* expressziója már nagyon gyenge, csak a gerincvelő (nem látszik), az ujjakat létrehozó porc elemeket ölelő perikondrium és az ujjak csúcsi része mutatott gyenge expressziót (14.F. ábra). Valószínűleg a mezenhima sejtek hozzárakodása az ujjak csúcsi részéhez hozzájárul azok hosszanti növekedéséhez.

Az *in situ* hibridizációt elvégeztük E12.5 stádiumú embriók hosszanti metszetén is, hiszen ebben a stádiumban történik a csigolyatestek kialakulása a szklerotom egységekből. Párhuzamos kísérletben elvégeztük a Tenascin-C hibridizációját is, amely gén expressziója egy jellemző markere a mezenhimális kondenzációnak. Az eredmény azt mutatta, hogy a m*C21orf70* expressziója (14.G. ábra) párhuzamosan jelenik meg a ventrális szklerotómok mezenhima kondenzációjának kialakulásával. A *Tenascin-C* expressziója (14.I. ábra) gyakorlatilag teljesen átfedett a *C21orf70* expressziójával, azonban az utóbbi valamivel specifikusabban jelent meg a szlerotómok kraniális oldalán.

Az E13.5 stádiumú embriókon végzett hibridizáció gyakorlatilag nem adott jelet a gerinctengely mentén; a már kondenzálódott és fejlődésnek indult (epitél sejtekkel körülvett) elő-porc elemek nem expresszálták a m*C21orf70* mRNS-t (az adat nem látszik).


A
Ov
Fb
Ba1
Flb
B
Otv
Fb
Ba2
Flb
AER
Hlb
C
SPN
Di
U
R
D
E
F
Sc
G
Sc
H
Sc
NC
I
Sc
J
sense
K
L

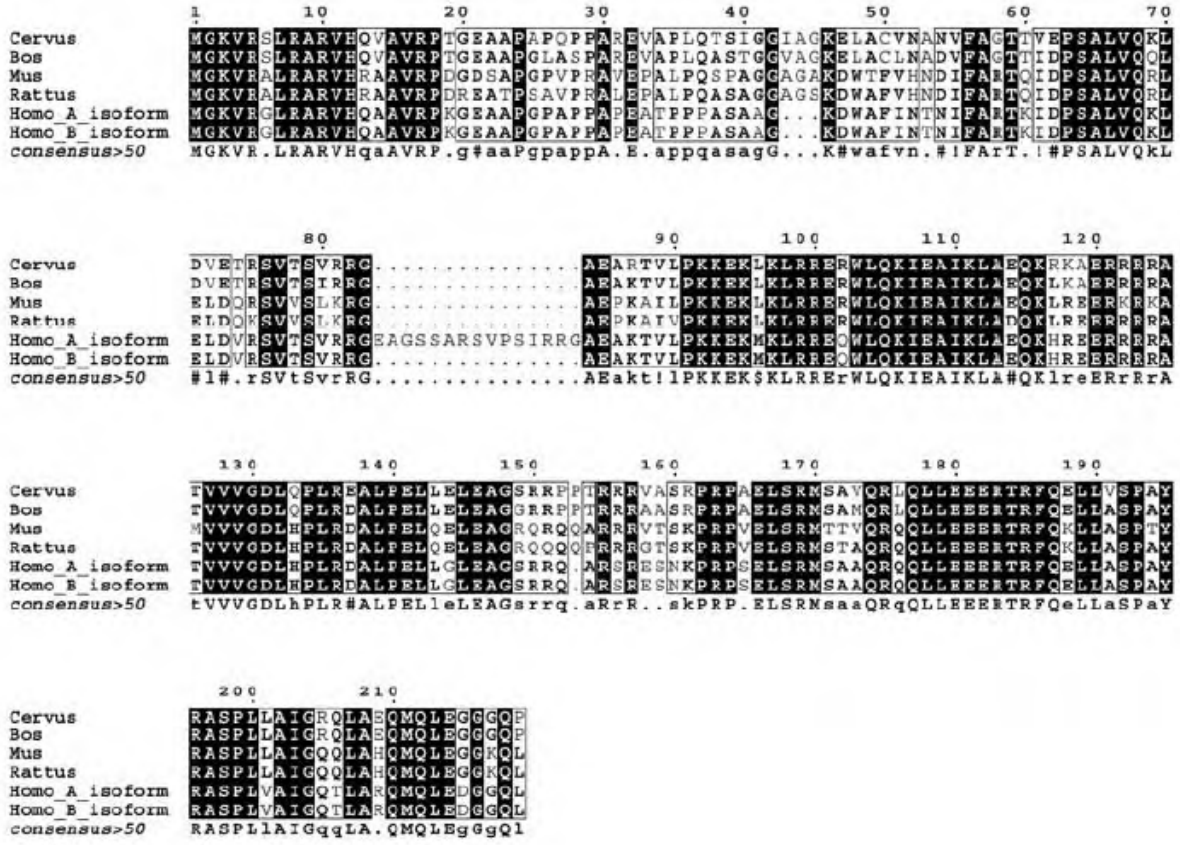
14. ábra

14. ábra jelmagyarázat: Teljes embrió (whole mount) *in situ* hibridizáció **(A-F)** és *in situ* hibridizáció egér embrió metszeteken **(G-J)** egér *C21orf70* ribopróbával. Az m*C21orf70* génexpresszió általános fenotípusos jellemzői korai stádiumú egér embriókon. **A:** E9.0 egér embrió; **B:** E10.5 egér embrió; **C:** E11.5 egér embrió. **D-I:** Teljes embrión és egér embrió metszetek végzett *in situ* hibridizáció m*C21orf70* RNS próbával a mezenhimális kondenzációk jellemző helyszínein. **D:** Késői stádiumú E11.5 embrió elülső végtaglemeze. **E:** E12.5 embrió hátulsó végtaglemeze. **G-I:** E12.5 embriók szaggitális (egymást követő) metszetei. **G:** *In situ* hibridizáció m*C21orf70* antiszensz ribopróbával. **H:** hematoxilin-eozin festés. **I:** *In situ* hibridizáció *Tenascin-C* antiszensz próbával. **J:** *In situ* hibridizáció mC21orf70 szensz ribopróbával. Mértékvonalak: 500 µm (A); 1000 µm (B); 1500 µm (C); 500 µm (D-E); 1000 µm (F); 250 µm (G-I). Jelölések: *AER:* apikális ektoderma redő; *Fb:* előagy; *Otv:* hallóhólyag; *Ba1:* első kopoltyúív; *Ba2:* második kopoltyúív; *Flb:* elülső végtagbimbó; *Hlb:* hátulsó végtagbimbó; *Ov:* látóhólyag; *Spn:* gerincvelői idegek kiágazásai; *Di:* az ujjak mezenhima kondenzációi; *U:* a singcsont (ulna) mezenhima kondenzációja; *R:* az orsócsont (radius) mezenhima kondenzációja; *ID:* ujjak közötti hártya; *DC:* az ujjak porc-előalakja; *Sc:* a ventrális szklerotómok mezenhimális elő-porc kondenzációi; *Nc:* gerinchúr. **K-L:** A C21orf70-EGFP fehérje sejtmagi lokalizációja egér embrionális fibroblasztban. **K:** sötét látómező; **L:** világos látómező. Mérték: 5 µm.

4.7. Rekombináns mC21orf70 fehérje sejten belüli lokalizálása

A C21orf70 fehérje szekvenciák többszörös illesztése (MultAlign; http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) (Corpet F, 1988) azt mutatta, hogy ez a fehérje emlősök között erősen konzervált (15. ábra). A szekvenciák analízise egy feltételezett kétrészes, sejtmagi lokalizációs szignál motívumra hívta fel a figyelmet (emberben 93-110. aminosavaknál, egérben 81-89. aminosavaknál). Ezt a predikciót szerettük volna ellenőrizni, ezért létrehoztunk egy EGFP-vel jelölt *C21orf70* cDNS-t tartalmazó expressziós plazmid konstrukciót, majd egér embrionális fibroblaszt sejtekbe juttattuk elektroporációval. Az eredményként kapott fluorescensz jel egyértelműen bizonyította, hogy a fehérje bejutott a sejtmagba és még szub-nukleáris foltokat is kijelölt (14.K.L. ábra). A sejteket azonban nem

tudtuk sokáig fenntartani, a még jelet adó sejtekben 5 nap inkubáció elteltével apoptótikus hólyagok jelentek meg, majd lekerekedtek és elpusztultak, míg a kontroll kísérletben lévő EGFP expresszáló sejtek túléltek. Megemlíteném, hogy a fehérje „*in silico*” vizsgálata nem talált a fehérjében ismert, konzervált DNS-kötő motívumot. Emberben a C21orf70 fehérjének (ill. transzkriptumának) két izofromáját sikerült eddig azonosítani (Reymond et al., 2001).



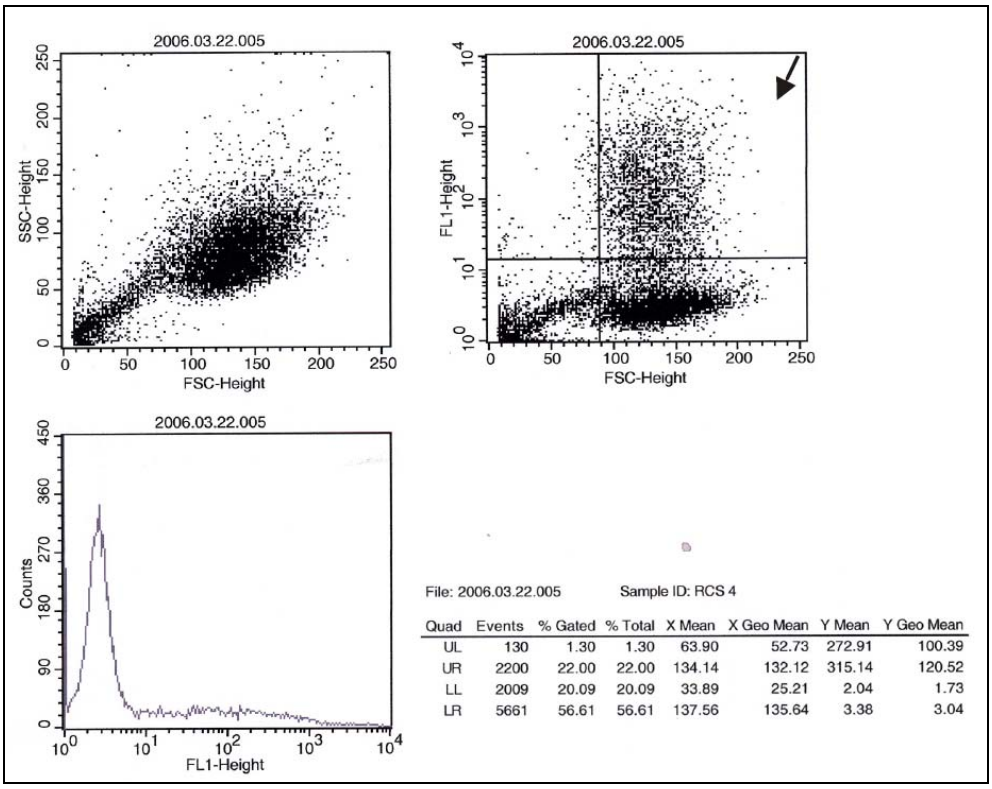
15. ábra

A C21orf70 fehérjék többszörös illesztése. Cervus: gímszarvas; Bos: szarvasmarha; Mus: háziegér; Rattus: patkány; HomoA: Pred56A; HomoB: Pred56B (Homo sapiens).

4.8. Az egér C21orf70 fehérje túltermeltetése

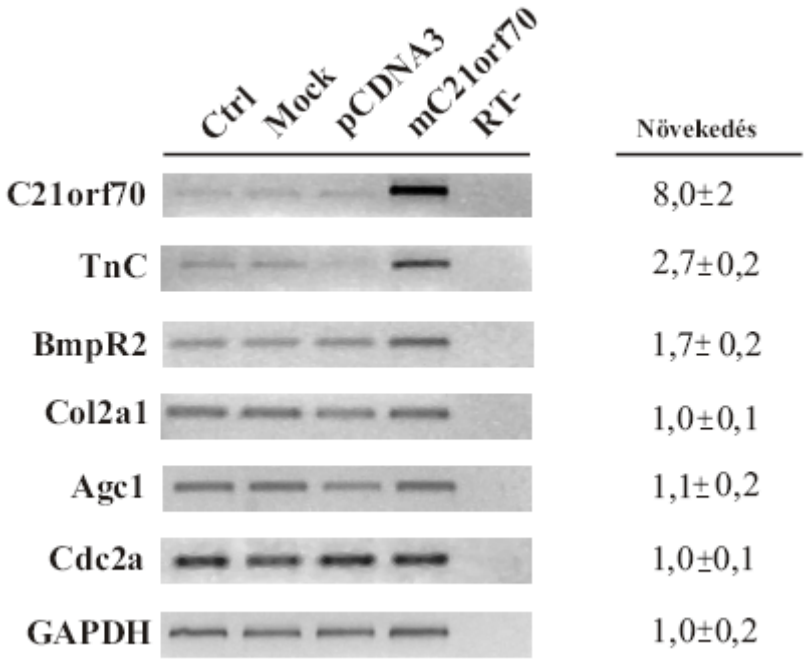
Kísérleteink során szerettük volna kideríteni, hogy a C21orf70 fehérje működése hogyan kapcsolódik a porcfejlődés folyamatába, vagyis a fehérje túltermeltetése okoz e valamilyen indukáló vagy represszáló hatást más gének működésében. Ehhez egy patkány kondroszarkóma (RCS) sejtvonalat választottunk, amelyet Swarm-kondroszarkóma tumorból hoztak létre (Mukhopadhyay et al. 1995). Ez a sejtvonal a legtöbb porcra jellemző marker gént expresszálja, emellett egy sor kevésbé differenciálódott porcra jellemző marker gént is kifejez.

Ahhoz, hogy sikeresen transzfektálni tudjuk ezt a sejtvonalat optimalizálnunk kellett a génbevitel módszerét. Ehhez a pEGFP-C1 plazmidot használtuk fel, majd a transzfektáns sejtek arányát FACS méréssel állapítottuk meg. Az előkísérletek azt mutatták, hogy a sejteket pajzsként körülvevő ECM burok a tripszines kezelés ellenére meggátolja a sikeres transzfekciót (maximálisan 3,7 % transzfektáns sejtet kaptunk). Ezért a sejteket transzfekció előtt CollagenaseA enzimmel kezeltük, amely elemésztette a sejthártyát ölelő ECM pajzsot. A transzfekciós reagens felhasználásának optimalizálását követően maximum 22% pozitív sejtet kaptunk (16. ábra). A pCDNA3 vektorba ágyazott C21orf70 cDNS-ről történt túltermeltetés (CMV promóterről) az m*C21orf70* transzkriptum kb. nyolcszoros mennyiségi növekedését hozta a szemikvantitatív RT-PCR szerint. E mellett, 31-féle porc- és háztartási gén kifejeződését is vizsgáltuk. Ezek közül 9 gén nem adott jelet a PCR reakciókban, 20 gén expressziója pedig nem változott a C21orf70 fehérje stimulusra. Két gén esetében kaptunk változást: a *Bone morphogenetic protein receptor type II* (BmpR2) mRNS 1,7-szeres, míg a *Tenascin-C* (TnC) mRNS 2,7-szeres expressziós növekedést mutatott (17. ábra). Az utóbbit szignifikáns változásnak tartjuk.



16. ábra

A transzfekció eredménye FACS méréssel reprezentálva az optimalizálás utáni legjobb transzfekciós hatékonyságot (gated = 22%). A fekete nyíl az EGFP-t expresszáló sejtek arányát mutatja az összes sejtszámhoz viszonyítva.



17. ábra

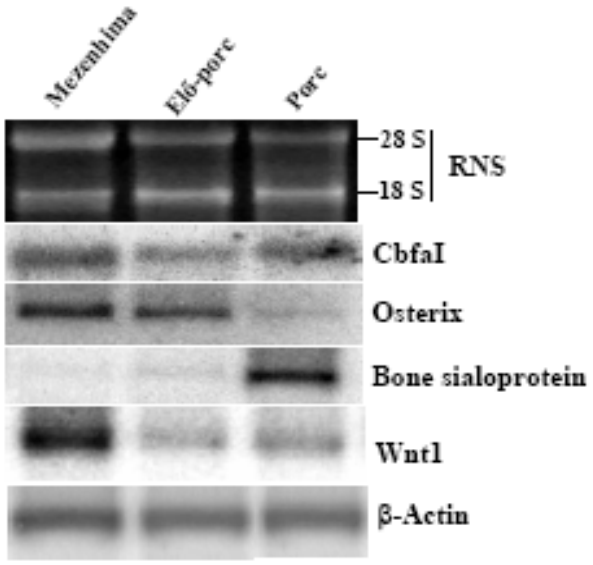
17. ábra jelmagyarázat: A mC21orf70 túltermeltetésének hatása a Tenascin-C, BmpR2, általános porc-marker gének és háztartási gének expressziójára. Az RCS sejteket nem transzfektáltuk (Ctrl), ál-transzfektáltuk (Mock), pCDNA3 vektorral transzfektáltuk (pCDNA3), vagy mC21orf70-el transzfektáltuk a pCDNA3 expressziós vektorban (mC21orf70). A sejtekből totál RNS-t tisztítottunk 24 óra elteltével, a mintákat szemikvantitatív RT-PCR segítségével analizáltuk. Porc marker gének: *II-es típusú kollagén alfa* (Col2a1); *Aggrecan 1* (Agc1). Háztartási gének: *Cell division cycle 2a* (Cdc2a) és *Glycerinealdehide-3-phosphate dehydrogenase* (Gapdh). A változások mértékét a csíkintenzitásokból számoltuk (mC21orf70 transzfektált / a kontrollok átlaga).

4.9. Az agancs csontosodás kezdetének vizsgálata

Az agancs porcszövete abban különbözik a csövescsontok fejődése során létrejövő üvegporc templáttól, hogy erekkel gazdagon átszőtt, erősen vaszkularizált. A proximo-disztális irányban növekedő erek ugyan olyan gyorsan fejlődnek, mint maga az agancs, hiszen szükség van ez utóbbi tápanyaggal való ellátására, vastagsága folytán az már diffúzióval nem megoldható. Az újonnan fejlődő ereket egy fokozatosan kialakuló, vastagodó ún. perivaszkuláris szövet öleli. Úgy is mondtatnánk, hogy egyre több sejtsorból álló perivaszkuláris hüvely veszi körül az ereket. Ennek a szövetnek a sejtjei lapos, elnyújtott alakúak, morfológiailag a kötőszöveti miofibroblaszt/pericita sejtekre emlékeztetnek. Érdekes módon ezek a sejtek agancsban gyengén expresszálják az I-es típusú kollagént (*Col1a1*), az alkálikus-foszfatázt (*ALP*) és az oszteokalcin (*OC*) géneket (Price JS et al.,, 1996; Allen et al., 2002), amelyek csontfejlődési marker géneknek tekinthetők. Szintén érdekes megfigyelés volt az, hogy ezek a sejtek már az általunk vizsgált porczónában elkezdik az ásványi anyagok lerakását (19 ábra, alirazin), valamint erősen expresszálják a Bone sialoprotein (BSP) mRNS-t (18. ábra). Ez vezetett ahhoz a feltevéshez, hogy a perivaszkuláris szövet sejtjei is a csúcsi mezenhimából származnak és képesek fokozatosan csontsejtekké átalakulni. Irodalmi adatok is alátámasztják ezen sejtek transz-differenciációs képességét (Collett GDM és Canfield AE, 2005).

Munkánk során ezért olyan molekuláris markert keresünk, amely kizárólag az oszteoblaszt sejtekre jellemző. A *Cbfa1* (Runx2) gén, mint a csontfejlődés „mester-regulátora” sajnos nem

használható erre a célra, hiszen expressziója végig kíséri a differenciációt a mezenhimális kondenzációtól a hipertróf porcsejtek kialakulásáig, így az agancsban, ahol a porc- és csontsejtek egymás mellett „élnek”, nem ad jó megkülönböztetési lehetőséget. A Northern-hibridizáció is azt mutatta, hogy a *Cbfa1* mRNS mindhárom vizsgált agancsszövetben kifejeződik (18. ábra).



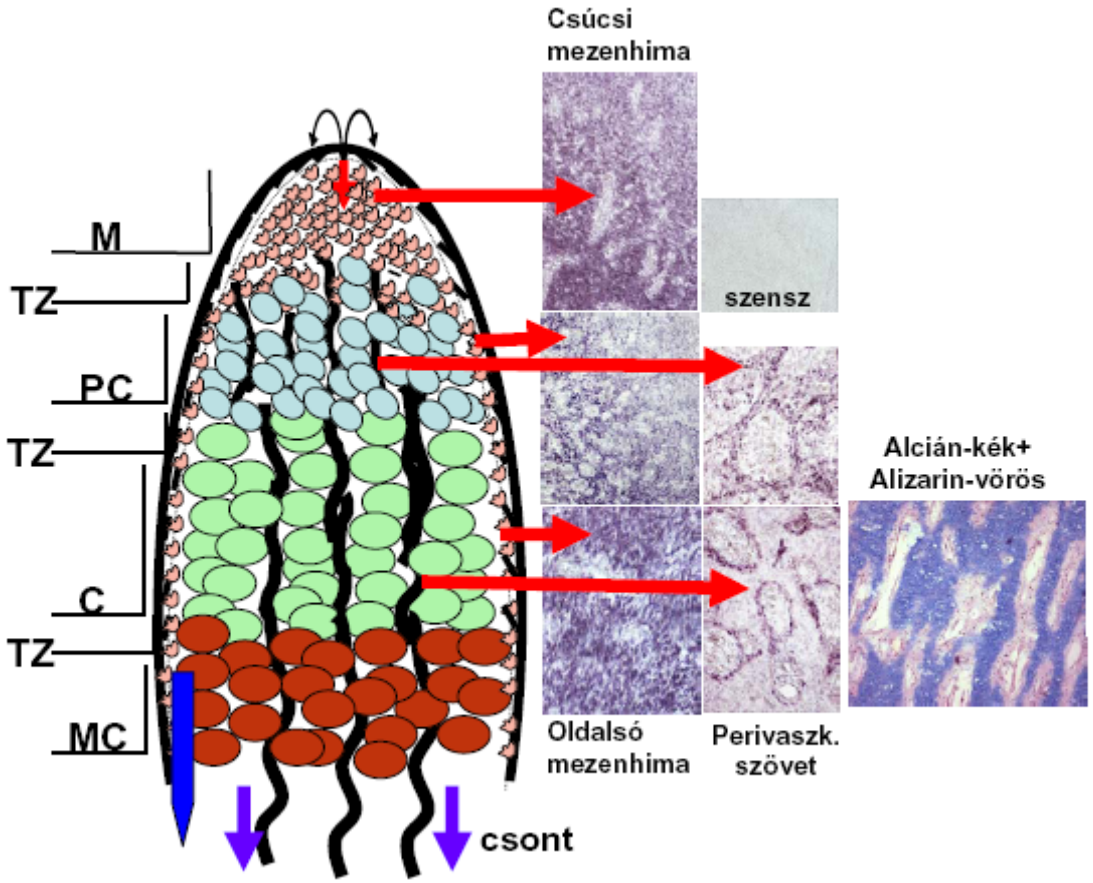
18. ábra

Néhány, a csontfejlődésben szerepet játszó gén, valamint a velőléc-sejtek marker génjének (*Wnt1*) Northern-hibridizációja.

A fellelhető közlemények alapján az *Osterix* gén expressziója köthető legspecifikusabban a csontsejtek differenciációjához (Nakashima K és de Crombrugghe, 2003). A Northern-hibridizáció azonban meglepő eredményt hozott: a vizsgált agancsszövetek közül legerősebben a mezenhimában fejeződött ki, majd fokozatosan lecsengett a porc irányába (18. ábra). Agancs metszeteken elvégeztük az *Osterix* mRNS *in situ* hibridizációs vizsgálatát is (19. ábra). Az eredmények egybevágtak a Northern blot-hibridizációval és alátámasztották a fenti feltevésünket. Az *Osterix* gén viszonylag erősen fejeződik ki a csúcsi mezenhima sejtjeiben. A mezenhimális szövetzónán belül is különbségek figyelhetők meg. Közvetlenül a dermisz alatt található mezenhima sejtek gyengén expresszálják az Osterix mRNS-t, majd fokozatosan erősödik megnyilvánulása és legerősebben a mezenhima átmeneti zóna felé eső (proximális) régiójában ad erős jelet. Szintén erős jel tapasztalható a csúcsi mezenhima

folytatásának tekinthető oldalsó (laterális) mezenhimában, amely gyakorlatilag a perikondrium sejtes rétege.

Az agancs hosszanti tengelye mentén az előporcban még viszonylag magas az expressziója, azonban a porcrétegben már kizárólag a perivaszkuláris sejtekre korlátozódik a kifejeződése (19. ábra).



19. ábra

Az *Osterix* mRNS *in situ* lokalizálása agancs metszeteken és azok térbeli elhelyezkedése az agancs hossztengelye mentén. M: mezenhima; TZ: átmeneti zóna; PC: elő-porc; C: porc; MC: mineralizálódó porc. Az alcián-kék + alirazin-vörös festés a porc zónában a perivaszkuláris szövet mineralizációját szemlélteti.

4.10. Új tudományos eredmények

Munkánk során a fejlődő szarvasagancs molekuláris biológiai elemzését valósítottuk meg, amelyhez a kísérleti metodikák széles eszköztárát fejlesztettük ki. Ezáltal lehetővé vált a fejlődő agancscsúcsban a mezenhimális sejt-differenciáció folyamatának tanulmányozása és egyéb modell rendszerekben az analóg folyamatok (embrionális vázfejlődés) feltárása.

4.10.1. Metodikai eredmények

- A differenciációban egymást követő, három agancsszöveti zónából (mezenhima, elő-porc, porc) cDNS könyvtárakat hoztunk létre, amely alapját képezte a laborunkban folytatott egyéb munkáknak.
- Először alkalmaztunk cDNS microarray-t az agancs génexpressziós profiljának vizsgálatára egy heterológ kísérleti felállást alkalmazva.
- Valós-idejű mennyiségi PCR mérések segítségével a heterológ microarray hibridizáció alkalmazhatósága bizonyítást nyert.
- Egy hatékony eljárást dolgoztunk ki a gímszarvas ortológ gének azonosítására (zoo-klónozás).

4.10.2. Funkcionális eredmények

- Agancsban és egérben *in situ* hibridizációval jellemeztük az eddig ismeretlen funkciójú fehérjét kódoló *C21orf70* transzkriptum megnyilvánulását a porc- és csont-differenciációhoz kapcsolódóan.

- Bizonyítottuk, hogy a C21orf70 fehérje erősen konzervált emlősökben és a sejtmagban lokalizálódik. Ez a fehérje feltételezésünk szerint szabályozó funkciót tölt be.

- Funkcionális teszttel bizonyítottuk, hogy a C21orf70 fehérje szabályozó feladatot láthat el a *Tenascin-C* transzkripciójának aktiválásában. A Tenascin-C fehérje az extracelluláris mátrix alkotórészeként fontos feladatot lát el a mezenhimális

kondenzáció folyamatában, a kondenzációt megelőző epitéliális-mezenhimális interakciókban, és a citoszkeletális rendszer szabályozásán keresztül a tumorok progressziójában.

4.10.3. Modellek

- Bevezettünk egy expressziós logót, amely az egyes gének agancson belüli expressziós dinamikáját szemlélteti kvantitatív PCR adatokra támaszkodva.

- Egy lehetséges modellt írtunk le az *Osterix* gén expressziója alapján, miszerint az agancs csúcs mezenhima sejtpoulációja csontképzési potenciállal is rendelkezhet.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Agancsregeneráció és heterológ microarray hibridizáció

Az utóbbi évtized egyik legintenzívebben kutatott orvosi-biológiai területe a szervek és szövetek regenerációja. Ezen belül is a csont- és porcszövet, mint a vázrendszer építőköveinek orvoslása különleges jelentőséggel bír; a WHO a második évezred első dekádját a csontok és izületek évtizedének nyilvánította. Míg a csont-defektusok kijavítására spontán módon képes a szervezet (Johnstone B és Yoo JU 1999) a csontvelő eredetű MSC osztódása és differenciálódása által (Shapiro F *et al.* 1993), addig a porcszövet csak kis mértékben képes regenerálódni. A felnőtt emberben csak patológiás körülmények között játszódik le másodlagos, nem-neoplasztikus kondrogenezis. Az izületi porcot érintő leromlások (pl izületi gyulladás) gyakran gondot okoznak a mozgásban, az egészséges életben.

A legtöbb tanulmány a viszonylag könnyen kezelhető sejtkultúrák felhasználásával próbál információkat gyűjteni a csont- és porcszövet differenciációját kísérő molekuláris mechanizmusokról, azonban nagyon kevés ismeretünk van az MSC-ről a natív környezetében (Baksh D *et al.* 2004). Ezzel ellentétben az évenkénti agancsregeneráció egy természetes modell rendszert szolgáltat ezen sejtek vizsgálatára, amely egy felnőtt szervezetben egyedülálló és az agancsban jól körülhatárolódóan jelenik meg. Úgy gondoljuk, hogy az agancsnövekedés génexpressziós mintázatának megismerésével fontos új információkat nyerhetünk arról, hogyan képes egy differenciálatlan mezenhima szövet porc-, ill. csontszövetté fejlődni.

Munkánk során egy heterológ kísérleti felállásban (egér *vs*. szarvas), cDNS microarray hibridizáció segítségével vizsgáltuk az agancs csúcsi növekedését, amely az emlősökben egyaránt megtalálható kódoló szekvenciák hasonlóságán alapul, s amelyről (szarvas *vs* egér, szarvas *vs* ember vonatkozásában) magunk is meggyőződtünk a gímszarvas gének klónozásán és szekvenálásán keresztül. A fajok közötti DNS-hibridizációk sikeressége azonban számos tényezőtől függ. Fontos a lemezre felkötött templát hossza (ezért pl. oligonukleotid microarray nem használható), de az sem mindegy, hogy a templát cDNS melyik szakasza található ott (kódoló és nem-kódoló szekvenciák és azok hosszúságbeli aránya). E mellett természetesen a fajok közötti szekvencia hasonlóság is befolyásolja a hibridizáció eredményességét, a konzerváltság foka fordítottan arányos az evolúciós távolsággal. Az eredmény specifikusságát még ronthatja a multigén családokra jellemző szekvencia-domének

hasonlósága (pl. HMG-box kódoló szekvencia a Sox családban, homeodomén kódoló szekvencia a Hox családban), amely már RNS szinten is jelentős lehet. Ezektől a tényezőktől függetlenül is szükséges azonban minden génexpressziós vizsgálatnál egy független ellenőrzési lépésre. Ehhez mi a valós idejű QRT-PCR technikát választottuk. A 15 gén közül 9 gént választottunk ki az ellenőrzéshez. Ebből a 9-ből 6 mutatott egyezést az első szűrési lépéssel, a microarray hibridizációval. A microarray kísérletben kapott géneket két szélesebb kategóriába lehet sorolni: (1) azok a gének, amelyek az agancsnövekedés felfokozott metabolikus igényéhez szükségesek, és (2) azok, amelyek a differenciációra specifikusabbak.

5.2. Agancsnövekedés és szignál útvonalak

A microarray hibridizációban kapott és kvantitatív PCR segítségével igazolt gének közül számos a különböző szignál útvonalakhoz rendelhető; név szerint a FGF, TGFβ és Wnt útvonalakhoz. Az FGF útvonalra jó példa a *Sprouty 1* homológ gén, amely az agancsban elsősorban a mezenhimában expresszálódik. Először *Drosophila*-ban azonosították a Sprouty gént, mint az FGF jelátvitel negatív szabályozó molekuláját, a trachea elágazások morfogenezise során (Hacohen N *et al.* 1998). Kimutatták, hogy az FGF és EGF jelátvitel során gátolja a Ras tirozin kináz receptor/MAPK mediált útvonalat (Kramer S *et al.* 1999; Reich A *et al.* 1999). Egér embriókban a Sprouty 1 homológ az FGF szignálközpontok mentén expresszálódik (Minowada G *et al.* 1999). Emberben prosztata rákot vizsgálva azt tapasztalták, hogy a Sprouty 1 ortológ génje csökkent expressziót mutat, ennek következtében magas FGF szintet mértek, amely utóbbi jelentősen fokozza a sejt proliferációt (Kwabi-Addo B *et al.* 2004). Egy újabb tanulmány szerint, amelyben inaktiválták a *Spry1* gént egérben, a vese kialakulása során a sprouty 1 fehérje a GDNF/Ret szignál „feedback" antagonistája (Basson MA *et al.*, 2005). Mivel a GDNF a TGFβ-szupercsalád tagja (Chang H *et al.*, 2002), a sprouty fehérje kapcsot jelenthet az FGF és TGF-β útvonal között.

A Wnt (Wingless) útvonalat a G-rich RNA sequence-binding factor-1 (*GRSF1*) gén képviseli. A Sprouty 1-hez hasonlóan az agancsban a *GRSF1* is a mezenhimában expresszálódik elsősorban. Ez a gén egy olyan celluláris fehérjét kódol, amely konzervált guanin-gazdag szekvencia régiókhoz kapcsolódik (Qian Z and Willusz J 1994) és bizonyos mRNS-ek stabilizálásával hozzájárulhat azok poszt-transzkripciós szabályozásához. Egy legújabb tanulmány szerint a GRSF1 a Wnt/β-catenin útvonalhoz rendelhető és szerepe van a közép- és

utóagy fejlődésében, a testtengely hátulsó részének megnyúlásában valamint a mezoderma specifikációjában (Lickert H *et al.*, 2005).

Agancsban a TGFβ-útvonalat a *p311* és *BmpR2* gének képviselik, amelyek dominánsan a porc zónában expresszálódnak. A p311 (vagy más néven neuronal protein 3.1, PTZ17) funkcióját először izomban és idegszövetben írták le (Studler JM 1993). Kimutatták, hogy a p311 fehérje negatívan szabályozza a TGFβ-1 és TGFβ-2 indította szignál útvonalakat (Pan D *et al.* 2002). A *BmpR2* gén egy II-es típusú szerin/treonin kináz receptort kódol, amely a ligand kötését követően képes heterodimér komplexet alkotni az I-es típusú receptorral, így szignált indítani a sejt belseje felé (Liu F *et al.* 1995). A *BmpR2* gén célzott inaktiválása egérben bizonyította, hogy funkciója esszenciális az epiblaszt differenciációban és a mezoderma kialakulásában a korai embrionális fejlődés során (Beppu H *et al.* 2000).

5.3. Negatív szabályozás az agancsfejlődésben

A microarray adataink egy érdekes feltételezést engedtek meg: a nagyon intenzív agancsnövekedés során egy erős gátló mechanizmus érvényesül, amely szabályozza a kontrollálatlan sejtproliferációt. Három gén esetében találtunk a negatív szabályozáshoz kapcsolható funkciót: *Sprouty1, Tribbles2* és a *p311* gének kapcsán. Ha figyelembe vesszük az agancsszövetek egy tengely mentén való elhelyezkedését és azt, hogy a differenciáció iránya ezzel azonos (agancscsúcstól, mint disztálistól a proximális irányban, a test felé), a *Sprouty 1* gén expressziója a mezenhimában felelős lehet az FGF/EGF szignál „fékezéséért”, amely utóbbi a dermisz irányából történhet. Ez a jelenség nagyon emlékeztet a már jól dokumentált embrionális végtagfejlődés kapcsán leírt AER-mezenhima interakció kapcsán megismert folyamathoz (Gilbert, 2002).

Emlősökben a Tribbles 2 fehérje a sejtosztódás negatív szabályozója az által, hogy kontrollálja a MAPK foszforilációját (Kiss-Toth *et al.*, 2004). Ecetmuslicában, ahol a gén „proto-ortológját” azonosították (Tribbles), kimutatták, hogy gátolja a mitozist a String (CDC25 homológ) fehérjén keresztül (Grosshans J and Wieschaus E 2000).

Ahhoz, hogy értelmezni tudjuk a p311 fehérje gátló hatását a TGFβ-útvonal kapcsán, figyelembe kell vennünk, hogy a növekedési porclemezzel ellentétben a fejlődő agancs erekkel dúsan átszőtt szerv. Úgy gondoljuk, hogy a p311 fehérje az ereket körülvevő perivaszkuláris szövet miofibroblaszt/pericita-szerű sejtjeinek túlzott osztódását tartja kordában.

5.4. Polycomb fehérjék

Az agancsfejődés microarray vizsgálata két Polycomb családba tartozó gént azonosított: az Rnf2 (Ring1B) és a Ring1- and YY1- binding protein (Rybp) kódoló géneket. E mellett az *Rnf2* gént sikeresen validáltuk és expresszióját az előporc zónához kapcsoltuk. A Polycomb-csoport (PcG) tagjainak funkciója jól ismert: kromatin-asszociált multimér komplexek alkotóelemei, amelyek fejlődésbiológiailag fontos szabályozó gének transzkripcióját tartják represszált állapotban. Mutációjuk súlyos következményekkel járnak a fejlődési folyamatokban. Hipomorf *Rnf2* allélt hordozó egerekben homeotikus transzformáció tapasztalható a tengelyváz hátulsó szakaszán; túltermeltetésük csirke embriókban pedig gátolja a HoxB9 kifejeződését a velőcsőben (Suzuki *et al.* 2002). Az *Rnf2*$^{-/-}$ mutáns egér embrionális fejlődése leáll az ún. „fejredő" (headfold) stádium előtt (Voncken JW *et al.* 2002).

Érdemes megemlíteni, hogy egy másik microarray hibridizációs kísérletben (amely nem témája dolgozatomnak), amelyben humán cDNS templátot használtunk az agancs cDNS ellenében, két másik PcG kapcsolt faktort hozott felszínre: az E2F6 és a SUV39H-t kódoló géneket. Ez a két fehérje képes komplexet alkotni az Rnf2 és Rybp fehérjékkel a kromoszómális célszekvenciákhoz kapcsolódás során (Otte és Kwaks, 2003). Úgy gondoljuk, hogy az agancsban történő megnyilvánulásuk egy genetikai kapcsoló (switch) része. Szerepük az által van, hogy bizonyos sejtvonalak hovatartozását biztosítják úgy, hogy epigenetiai szinten represszálják a más irányba történő fejlődésüket. A fejlődő „barkás-bársonyos" agancs egy olyan emlős szervnek tekinthető, ahol az elő-porcszöveti zóna térben jól elkülönül és az ehhez a zónához tartózó génexpressziós mintázat jól jellemezhető. Az „upstream" szövetnek tekinthető mezenhima létrehozza a megfelelő mennyiségű templát sejtet, majd a fejlődéstanilag soron következő elő-porcban a sejtproliferáció lelassul és elkezdődik a differenciáció. Az *Rnf2* gén domináns megnyilvánulása az elő-porcban ezzel a folyamattal lehet összhangban.

5.5. Következtetések a C21orf70 fehérjét illetően

A *C21orf70* gén agancsban dominánsan a mezenhima és elő-porc zónában nyilvánul meg. Ezt a gént emberben a 21-es kromoszómára térképezték, ezért lehetségesnek véljük, hogy az extra

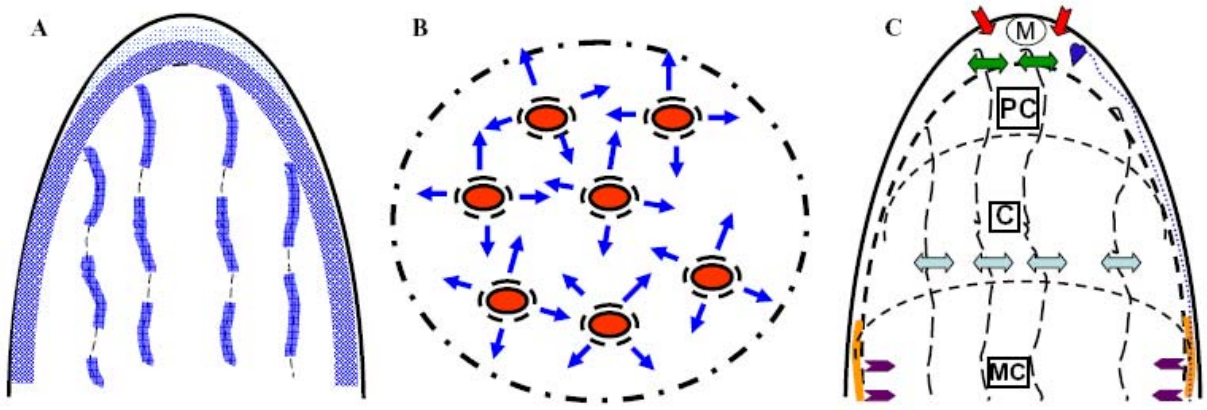
gén által megnövelt géndózis hozzájárulhat a Down-szindróma okozta fenotípus kialakulásához (Menzel O *et al.* 2004). A teljes egér embriókon végzett hibridizációk azt mutatták, hogy a mC21orf70 gén a fejlődő agyban, kopoltyúívekben, a szem- és fülhólyagok körül és az apikális ektoderma redőben (AER) mutat fokozott expressziót. Ez utóbbi a végtagbimbó fejlődésében betöltött szerepét sejteti. Ez az expressziós mintázat párhuzamot mutat a 21-es kromoszóma triszómia okozta fenotípussal, amely különböző penetranciával, de számos szervet érint, beleértve a végtagokat is (Epstein CJ 1995; Antonarakis SE *et al.* 2004). A m*C21orf70* expressziós mintázata a migráció utáni velőléc sejtek lokalizációjára emlékeztet (fülhólyagok, a fej frontonazális területei és kopoltyúívek), bár az AER-ben történő megnyilvánulása nem illik bele ebbe a képbe. Idősebb stádiumú (E11-12) embriókon végzett hibridizációk azt mutatták, hogy nem csak a velőléc eredetű sejtek expresszálják a mC21orf70-et, hanem azok is, amelyek a ventralis szklerotómok kialakításáért felelősek, i.e. azok, amelyek a paraxiális mezodermából származnak (a velőléc-sejtek nem telepítik be a perinotokordális teret (Rickmann *et al.*, 1985).

A ventrális szklerotómok hozzák létre a csigolyatesteket és a csigolyák közötti korongokat. Úgy tűnik a m*C21orf70* inkább a szklerotómok kraniális felében expresszálódik, amelyek a csigolyatesteket alakítják ki.

A túltermeltetési kísérlet azt mutatta, hogy a C21orf70, mint sejtmagi fehérje szabályozó funkciót tölthet be az erősen plejotróp gén, a *Tenascin-C* transzkripciójában. A két génnek nagyon hasonló az expressziós doménje. A tenascin-C gátolja a fibronectin kapcsolódását a syndecan 4-hez, ezáltal tumor sejtekben elősegíti azok proliferációját, egészséges sejtekben viszont gátolja azt (Orend G *et al.* 2003). E mellett számos sejt felszíni receptorral és fehérjével kapcsolódik, mint pl. integrinekkel, annexin II-vel, stb, így befolyásolja a sejt-mátrix interakciókat. Az idegrendszerben is széles körben megnyilvánul, ahol neuronális membrán fehérjékhez kapcsolódik (Zacharias U *et al.* 1999). Egérben a C21orf70 dominánsan a központi- és környéki idegrendszerben nyilvánul meg, amely nem meglepő a Tenascin-C-hez kapcsolható szabályozó funkció tükrében. Habár a *C21orf70* nem porc specifikus gén, úgy gondoljuk, hogy azáltal, hogy részt vesz a csigolyatestek és végtagkezdemények mezenhima kondenzációinak kialakításában, hozzájárul a tengely- és függelékváz kialakításához.

5.6. Az Osterix megnyilvánulása, a porc-és csontképződés kapcsolódása agancsban

Az agancs növekedése nagyon gyors és effektív folyamat. Természetesen ehhez megfelelő tápanyag- és oxigénellátás szükséges, amelyet az agancs gazdag erezettsége biztosít. Az erek fejlődése proximo-disztális irányban történik, a legvékonyabb kapillárisok a csúcsi mezenhimában végződnek. Az eredmények jó összhangba hozhatók egy olyan modellben, ahol a csúcsi mezenhima sejtjei interakcióba lépnek a kapillárisok endotél sejtjeivel, ahonnan lokális morfogének (pl. BMP-2, BMP4)(Guillotin B. *et al.*, 2004; Shin V. *et al.*, 2004; Kaigler D. *et al.*, 2005), valamint a keringéssel hormonok juthatnak oda. A kölcsönhatás következtében proximális irányban egy fokozatosan vastagodó hüvely, perivaszkuláris szövet alakul ki az erek körül. Elgondolásunk szerint ezen szövet sejtjei elkezdik az ásványi anyagok berakását az által, hogy környezetük megváltozik, körülöttük hipertróf porcsejtek lesznek (i.e. itt is szövet-interakciók játszanak szerepet). Ez a folyamat hasonló a növekedési porclemez porchártyája és hipertóf sejtek közötti kölcsönhatáshoz. Ezen elméleteinket nagyban alátámasztják az *Osterix* génnel végzett *in situ* hibridizációs kísérletek. Az irodalmi adatok alapján, az Osterix tekinhtető jelenleg a csontfejlődés legspecifikusabb marker génjének. Egérben a 13. nap után (*post coitum*) jelenik meg expressziója a szklerotómokban és végtagkezdeményekben, a *Cbfa1* (Runx2) gén expresszióját követően, amelynek az Osterix a „downstream" célpontja. Agancsban érdekes módon már a csúcsi mezenhimában megnyilvánul az *Osterix* gén, ami azt tükrözi, hogy a mezenhima sejtjei már elkötelezettek, mind a porc-, mind a csontfejlődés irányában. A differenciáció előrehaladtával az *Osterix* expressziója csak az oldalsó mezenhima és a perivaszkuláris szövet sejtjeiben marad meg (az *Osterix* gén expresszióját a 20. sematikus ábrán foglaltam össze). Úgy gondoljuk, hogy az erek körüli sejtek képesek oszteoblaszttá alakulni. Tehát ellentétben a növekedési porclemezben tapasztalható csontosodási folyamattal, ahol a diafízis felől betörő erek „magukkal hozzák" a perikondrium mezenhima sejtjeit (és amelyek oszteoblasztokká differenciálódnak), agancsban ezek a sejtek a csúcsi mezenhimából származnak. Elgondolásunk szerint a kialakuló perivaszkuláris szövet, mint „belső porchártya" működik. Ennek a szövetnek a funkciója a mineralizáció megindítása, amely biztosítja a gyors csontosodási folyamatot, az agancs hatékony növekedését, a szilárdság gyors elérését (20. ábra).



20. ábra

A: Az *Osterix* expressziójának sematikus ábrázolása az agancscsúcsban (hosszmetszeti nézet), és **B:** a mineralizáció folyamatának teoretikus vázlata (keresztmetszeti nézet). Piros oválisok: vererek; szaggatott vonalak az erek körül a perivaszkuláris hüvelyt jelölik. A pontos- szaggatott vonalú ovális egy nem-definiált határt jelöl. **C:** Feltételezett szövet-interakciók az agancscsúcsban. M: mezenhima; PC: elő-porc; C: porc; MC: mineralizálódó porc. Piros nyíl a csúcson: dermisz-mezenhima interakció; kis zöld nyíl: ér-epitél-mezenhima interakció; világoskék nyíl a porcban: hipertróf porcsejt-perivaszkuláris szöveti sejtek interakciója; lila nyíl az MC-ben: periosztеum-porc interakció az intramembrán csontosodás kezdeti helyén; kék szív a csúcsban: idegvégződés a dermiszben, amely a mezenhimát stimulálja.

5.7. Javaslatok

- Úgy gondoljuk, hogy az agancs, mint csontfejlődési modell nagyon jól használható, mivel a térben jól elkülönülő szövetzónákhoz rendelhető expressziós mintázat könnyen összehasonlítható. Ebben a tanulmányban egy 3,2K cDNS microarray-t alkalmaztunk, de szeretnénk kísérleteinket kiterjeszteni egy egész genomot átfogó microarray kísérlettel. A kérődzők közeli evolúciós rokonsága következtében az ortológ gének homológiája rendkívül nagy fokú, ezért úgy gondoljuk, hogy ezen nagyfokú homológia miatt célszerű lenne a szarvasmarha microarray használata, így csökkenthető lenne a „fals pozitív” és „fals negatív” gének száma. A vizsgált szöveti zónákat is célszerű lenne kiterjeszteni a porcszövettől proximálisan található zónákra: a mineralizálódott porcszövetre és csontszövetre.

- Az agancsfejlődés megismerésével hasznos információkat nyerhetnénk a vázrendszert érintő neopláziákról. A kondroszarkómák pl. az egyik leggyakrabban előforduló típusai a csont-szarkómáknak; a részesedésük kb. 25% (Sandberg AA and Bridge JA 2003). A mezenhimális típusú kondroszarkómák olyan multifokálisan kialakuló elfajulásai a pre-kondrogén sejteknek, ahol a differenciáció az egész porcosodási folyamatot végigjárja, hasonlóan a végtagfejlődéshez (Aigner T 2002). Az agancs fejlődése egy kapcsot jelenthet a végtagfejődés és a vázrendszerben kialakuló rosszindulatú daganatok kialakulása között. Az agancsban jelenlévő negatív szabályozó molekulák fokozott expressziója arra hívja fel a figyelmet, hogy esetlegesen ezen gének a rosszindulatú kondrogén elfajulásokban hibásan vagy megváltozott módon működnek.
- Az agancsfejlődés génexpressziós mintázatának megismerésével fontos információkat kaphatunk a csontregeneráció terén. Az élővilágban nem található még egy emlős, amely felnőtt korban (és nem patológiás okból) képes lenne egy csontszerv teljes újraképzésére. Széles körben elterjedt nézet szerint a regeneráció és tumorok kialakulása során, a leginkább csak embrionális korban működő gének újra aktiválódnak. A különbség az, hogy tumorok esetében nem szabályozott (de-regulált), míg regenerációkor szabályozott módon lépnek működésbe. Az agancsfejlődés felfogható egy embrionális fejlődésnek is, hiszen olyan gének aktívak, amelyek felnőtt egyedben egyébként nem működnek. Jó példa erre az agancsból már azonosított FGF8, Wnt1 és GDNF gének, amely felnőtt egyedben csak a csíravonalban detektálhatók.
- A C21orf70 expressziója a kondenzálódó mezenhima sejtekhez köthető. A multipotens mezenhima sejtek azonban többféle irányba képesek differenciálódni, ezért érdemes volna a C21orf70 funkcióját sejtkultúrában megvizsgálni egy mezenhima sejtvonalban is (pl. C3H10T1/2, embrionális végtagbimbó-eredetű mezenhima sejtvonalban). A túltermeltetés mellett a géncsendesítést (RNAi) is bevezetném kísérleteinkben, ezáltal fenokopizálva a gének funkcióvesztését.
- Érdekes lenne egy C21orf70 túltermelő transzgénikus egérmodell létrehozása, amellyel esetleg betekintést nyerhetnénk, hogy a gén milyen mértékben járul hozzá Down-szindrómás fenotípus kialakulásához. Természetesen a gén inaktiválása egér modellben szintén hasznos információkat nyújthatna a fehérje funkcióját illetően.

- A C21orf70 fehérje ellen termeltetett antitesttel lehetővé válna a lehetséges fehérjepartnerek azonosítása immunprecipitációs és két-hibrid kísérletekben.
- Érdekesnek tartanám a C21orf70 gén szabályozó régiójának vizsgálatát. Ehhez számítógépes programok segítségével transzkripciós faktor kötőhelyeket keresnék a gén promóter régiójában, minél több emlős faj szekvencia adatait felhasználva. Az így nyert „predikció" alapján tesztelhető lenne a C21orf70 gén transzkripciójának szabályozásában feltételezhetően részt vevő transzkripciós faktorok (transz elemek) szerepe sejtkultúrában, „két-plazmidos" riporter rendszer (pl. a vizsgált transzkripciós faktor expressiós-, valamint C21orf70 promóter-luciferáz riporter plazmid konstrukcióval, ko-transzfektálva) segítségével.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A gímszarvas évenkénti agancsnövekedése egy szerv teljes regenerációját jelenti, amely egyedülálló az emlősök között. Az első agancs az ún. agancsképző periosztеumból fejlődik, amely folyamatot pubertás korban a tesztoszteron indukciója vált ki. Az agancs hosszanti növekedését az agancs mezenhima proliferációja tartja fent, amely akár napi 1 cm ágankénti növekedést is eredményezhet. A növekedés üteme meghaladja a legtöbb rosszindulatú daganat növekedési sebességét, de ellentétben azzal, az agancs növekedése szabályozott folyamat. Az agancs fejlődése egy módosult endokondrális csontosodásnak tekinthető, de intramembrán csontosodási folyamatok is szerepet kapnak.

Jelen tanulmánnyal az volt a célunk, hogy (i) betekintést nyerjünk az agancscsúcs génexpressziós mintázatába, beleértve a gének szövettani lokalizáltságát, valamint (ii) hogy összehasonlítsuk az agancscsúcs porcrétegének és a magzati növekedési porclemeznek az expressziós profilját (agancsban történő robosztus csontfejlődés korai fázisa *vs* a vázrendszer csontfejlődésének korai fázisa).

Kísérleteink során egy 3.2K egér cDNS microarrayt használtunk vizsgálatainkhoz heterológ kísérleti felállásban (gímszarvas cDNS *vs* egér cDNS templát). A génexpressziós adatokat valós idejű QRT-PCR segítségével validáltuk. Az egyik gént (C21orf70) részletesebben is jellemeztünk *in situ* hibridizációval és „whole mount” *in situ* hibridizációval, agancs- és egér embrió metszetek, valamint teljes egérembriók felhasználásával. A C21orf70 fehérjét sejten belül lokalizáltuk egér embrionális fibroblaszt sejtekben. A fehérjét túltermeltettük patkány kondroszarkóma sejtvonalban azzal a céllal, hogy az általa befolyásolt génműködésekről képet kapjunk. Az agancs mezenhima csontképzési potenciálját az *Osterix* gén expressziós mintázatának segítségével vizsgáltuk.

Az eredmények azt mutatják, hogy a gímszarvas és egér, és általában az emlős ortológ szekvenciák hasonlósága által a heterológ microarray hibridizáció hatékony eljárás lehet. A microarray kísérlet eredményeként 15 gént kaptunk, amelyek intenzívebben működnek az agancsban, mint a magzati növekedési porclemezben. A kapott géneket a szerint osztályoztuk, hogy funkciójuk ismert vagy sem a csontfejlődési folyamatokban. Egy hatékony eljárást fejlesztettünk ki (zoo-klónozás), amely segítségével az emlős szekvenciák alapján azonosíthatók a megfelelő gímszarvas ortológ gének. A validáláshoz 9 gént választottunk ki, amelyek közül 6

mutatott megegyező eredményt a microarray expressziós adatokkal. A visszaigazolt gének expresszióját az agancscsúcs különböző zónáiban is jellemeztük és a mennyiségi adatokat egy expressziós logo segítségével ábrázoltuk. Az eddig ismeretlen funkciójú C21orf70 gén specifikus expressziós mintázatot mutatott az emlős (egér) embrionális fejlődése alatt, elsősorban a mezenhimális kondenzáció előfordulási helyein. A C21orf70 fehérje a sejtmagban lokalizálódik, a túltermeltetése hozzájárul a Tenascin-C gén aktiválásához. Az agancs mezenhima fejlődési potenciálját az *Osterix* mRNS szövettani lokalizálásával, *in situ* hibridizáció segítségével vizsgáltuk. Az eredmények azt jelzik, hogy az agancscsúcs mezenhimális sejtpopulációja porc- és csontképzési potenciállal is rendelkezhet. A microarray segítségével kapott expressziós profil, az agancsnövekedés negatív szabályozó molekuláira hívja fel a figyelmet, amelyek az agancsnövekedés robosztus, de finoman szabályozott voltát tükrözik, ellentétben a tumorokkal. A validált géneket különböző szignál útvonalakhoz tudtuk rendezni (FGF, TGFβ, Wnt), aktív jelenlétük az agancsban csak az embrionális fejlődéshez hasonlítható.

Összefoglalva az eredményeket, munkánk során először alkalmaztuk a microarray technológiát az agancscsúcs génexpressziós mintázatának megismeréséhez. A módszer sikeresnek bizonyult, az eredményeket QRT-PCR segítségével erősítettük meg. Megállapítottuk, hogy a legtöbb azonosított gén, az agancscsúcson belüli mérések alapján, részt vesz a mezenhimális sejt-differenciációban. Az eddig ismeretlen funkciójú C21orf70 gént az emlős (egér) embrionális fejlődéséhez kapcsolódóan jellemeztük. Az expressziós mintázat jól értelmezhető a Tenascin-C -hez kapcsolt szabályozó funkció tükrében (mezenhimális-epitéliális interakciók, mezenhimális kondenzáció). Érdemes megemlíteni, hogy az extra C21orf70 géndózis emberben hozzájárulhat a triszómia okozta Down-szindróma fenotípushoz.

A közel 100 %-os szekvencia hasonlóság miatt, a jövőben ajánlatosnak tartjuk a szarvasmarha microarray használatát (jelenleg már kereskedésben is kapható) gímszarvas esetén végzett génexpressziós vizsgálatokban. Mivel a C21orf70 gén elsősorban a csont- és porcfejődési „switch” előtt expresszálódik, ajánlatosnak tartjuk egy mezenhimális sejtvonalban is megvizsgálni a funkcióját.

6. SUMMARY

Decidually developing antler of deer is complete organ regeneration which unique among mammals. The initiation of the first antler derived from the antlerogenic periosteum and induced by the gonadal hormone testosterone around puberty. The longitudinal growth of antler maintained by the proliferation of the apical mesenchyme and the growth rate can reach 1 cm per day per tine, which exceeding the growth rate of the most malignant tumors. However, contrary to cancers it proceeds in a finely regulated fashion. Antler develops in a manner of modified endochondral ossification and also by intramembranous bone formation. The process itself resembles to embryonic limb development.

In this study, our aim were (i) to get an insight into the gene expressions, including their histological localization in the developing antler tip and (ii) to compare the expression pattern of the antler tip cartilage and the fetal growth plate cartilage (i.e. antler *vs.* skeleton).

In this investigation we used a 3.2K mouse cDNA microarray in a heterologous hybridization set-up (deer *vs* mouse cDNAs). Validation of gene expression data were done by Real-time QRT-PCR. One of the genes (C21orf70) was further examined by *in situ* hybridization and whole mount hybridizations on antler and mouse tissue sections and whole mouse embryos. The C21orf70 protein was intracellularly localized in mouse embryonic fibroblast and the downstream targets in its overexpressed status in rat chondrosarcoma cells was assessed.

The results indicated that due to the high homology between red deer and mouse orthologous genes the heterologous hybridization can be efficient with high fidelity. We identified 15 genes by the microarray assay and they were classified according their known or unknown function in bone development. We have invented an efficient, gene cloning method, called zoo-cloning, to get the corresponding deer ortologs in hand (required for the validation step). Nine of the genes were selected for validation and 6 of them showed concordant outcome with microarray data. The expressions of the validated genes were further quantified in the different regions of the antler itself and the results were visualized by the invention of an expression logo.

The gene C21orf70 with previously unknown function showed specific hybridization pattern and localized mostly to the site of mesenchymal condensations. The cognate protein is localized to the nucleus and its overexpression showed that its function contribute to the activation of the gene Tenascin-C.

The differentiation potential of the antler mesenchyme was investigated by the *in situ* hybridization of the gene *Osterix*, which demonstrated that the cell population of the apical mesenchyme may have bipotential features, *i.e.* chondrogenic- and osteogenic potential.

The gene expression profile, we got by microarray, calls the attention to the involvement of the negative regulations during antler development that reflect the highly controlled tissue growth in the development of the antler. The validated genes can be classified into different signaling pathways (FGF, TGFβ and Wnt), their vivid activity during antler development resembles and is comparable to only the embryonic development.

In summary, we utilized microarray technology as first in order to study the gene expressions of the antler tip. The method proved to be successful as confirmed by QRT-PCR and based on the QRT-PCR measures in antler, most of the identified genes link to mesenchymal cell differentiation. The gene *C21orf70* with previously unknown function was characterized during mouse embryonic development and its expression pattern can be interpreted in the light of its possible regulatory role on Tenascin-C transcription. It is worth to mention that the extra *C21orf70* gene dosage may contribute in human to the Down-syndrome phenotype, caused by 21th chromosome trisomy.

We propose the introduction of cow cDNA microarray (now it is already available commercially) in the future for gene expression studies in red deer. The higher degree of sequence similarity should improve significantly the fidelity of quantitative charachterization in changes of gene expressions. We also propose further investigations on the function of C21orf70 in mesenchymal cell lines because its role can be coupled to stages before chondrogenic- and osteogenic cell differentiation.

7. MELLÉKLETEK

7.M1. Irodalomjegyzék

Aigner T (2002): Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton - biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants. *Virchows. Arch.* 441: 219-230.

Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, 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.

Akiyama H, Kim J-E, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, Zhang Z, Martin JF, Behringer RR, Nakamura T, de Crombrugghe B (2005): Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 14665-14670.

Allen SP, Maden M, Price JS (2002): A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers. *Dev. Biol.* 251: 409-423.

Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S (2004): Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat. Rev. Genet.* 5: 725-738.

Asher GW, Adam JL, Otway W, Bowmar P, van Reenan G, Mackintosh CG, Dratch P (1988): Hybridisation of Pére David's deer (*Elaphurus davidianus*) and red deer (*Cervus elaphus*) by artificial insemination. *J. Zool.* 215: 197-203.

Baksh D, Song L, Tuan RS (2004): Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 8: 301-316.

Banks JW, Newbry WJ (1983): in: Banks. R. D. (Szerk.), *Antler Development of Cervidae.* Cesar Kleburg Wildlife Research Institute, Kingsville, Texas, pp: 279-306.

Barling PM, Lai AK, Tong AST, Nicholoson LFB (2004b) The distribution of growth factors and their receptors in growing red deer antler. In: *Advances in Antler Science and Product Technology* 2 (ed Suttie JM), pp. 37–44.

Barling PM, Liu H, Matich J, et al. (2004a): Expression of PTHrP and the PTH/PTHrP receptor in growing red deer antler. *Cell. Biol. Int.* 28: 661–673.

Barrell GK, Davies R, Bailey CI (1999): Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in perichondrium af antlers in red deer (Cervus elaphus*). Reprod. Fertil. Dev.* 11: 189-192.

Basson MA, Akbulut S, Watson-Johnson J, Simon R, Carroll TJ, Shakya R, Gross I, Martin GR, Lufkin T, McMahon AP, Wilson PD, Constantini FD, Mason IJ, Licht JD (2005): Sprouty 1 is a critical regulator of GDNF/Ret-mediated kidney induction. *Developmental Cell* 8: 229-239.

Benetti R, Del Sal G, Monte M, Paroni G, Brancolini C, Schneider C (2001): The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53 dependent apoptosis. *EMBO J.* 20: 2702-2714.

Beppu H, Kawabata M, Hamamoto T, Chytil A, Minowa O, Noda T, Miyazono K (2000): BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev. Biol.* 221: 249-258.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, et al. (1999): Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* 22: 85–89.

Bridgewater LC, Lefebvre V, de Combrugghe B (1998): Chondrocyte-specific enhancer elements int he Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J. Biol. Chem.* 273: 14998-15006.

Bronner-Fraser M (1994): Neural crest cell formation and migration in he developing embryo. *FASEB J.* 8: 699-706.

Bubenik AB (1990): Epigenetical, physiological and behavioural aspects of evolution of horns, pronghorns and antlers. In: Bubenik GA és Bubenik AB (Szerk.): *Horns, pronghorns and antlers*. Springer Verlag, New York. pp: 3-113

Bubenik AB és Pavlansky R (1965): Trophic responses to trauma in growing antlers. *J. Exp. Zool.* 159: 289-302.

Bubenik GA, Bubenik AB, Brown GM, Trenkle A, Wilson DI (1975): Growth hormone and cortisol levels in the annual cycle of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) *Can J Physiol. Pharmacol.* 53: 787–792.

Bubenik GA (1982): Endocrine regulation of the antler cycle. In: Brown ED (Szerk.): *Antler development in Cervidae.* Caesar Kleberg Wildl. Res. Inst.; Kingsville, TX. pp: 73-107.

Bubenik GA, Bubenik AB, Stevens ED, Binnington AG (1982): The effect of neurogenic stimulation on the development and growth of bony tissues. *J. Exp. Zool.* 219: 205-216.

Buchberger A, Schwarzer M, Brand T, Pabst O, Seidl K, Arnold HH (1998): Chicken winged-helix transcription factor cFKH-1 prefigures axial and appendicular skeletal structures during chicken embryogenesis. *Dev. Dyn.* 212: 94-101.

Burke D, Wilkes D, Blundell TL, Malcolm S (1998): Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. *Trends Biochem. Sci.* 23: 59-62.

Carlson FL (1997): *Histotechnology*. American Society of Clinical Pathologyst. ASCP Press, Chicago. p.: 96, 118, 221.

Chang H, Brown CW, Matzuk MM (2002): Genetic analysis of the mammalian Transforming Growth Factor-β superfamily. *Endocrine Rev.* 23: 787-823.

Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE.(1996): Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev. Dyn.* 206: 379-390.

Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996): Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383: 407-413.

Chomczynski, P. és Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acidguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156–159.

Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M (1998): Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 125: 813-824.

Clouthier DE, Williams SC, Yanagisawa H, Wieduwilt M, Richardson JA, Yanagisawa M (2000): Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice. *Dev. Biol.* 217: 10-24.

Collett GDM, Canfield AE (2005): Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ. Res.* 96: 930-938.

Corpet F (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16: 10881-10890.

Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM (1993): The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development* 117: 409-429.

Cserjesi P, Brown D, Ligon KL, Lyons GE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Olson EN (1995): Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development*.121: 1099-110.

DeLise AM és Tuan RS (2000): Electroporation-mediated DNA Transfection of Embryonic Chick Limb Mesenchymal Cells. In: Tuan RS és Lo CW (Szerk.): *Developmental Biology Protocols Vol. III.,*Humana Press, Totowa, New Jersey. pp: 377-382.

Dorsky RI, Moon RT, Raible DW (1998): Control of neural crest fate by the Wnt signaling pathway. *Nature* 396: 370-373.

Dubrulle J és Pourquié O (2004): Coupling segmentation to axis formation. *Development* 131: 5783-5793.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 747–754.

El Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Munnich A, Bonaventure J (1997): Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat. Genet.* 15: 42-46.

Elliott JL, Oldham JM, Ambler GR, 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.

Epstein CJ (1995): in: Sly WS, Valle D, (Szerk.): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp.749-794.

Faucheaux C, Nicholls BM, Allen S, Danks JA, Horton MA, 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 MA, Price JS (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 JS (1999): Parathyroid hormone-related peptide may play a role in deer antler regeneration. In: Danks J, Dacke C Flik G, Gay C (Szerk.): *Calcium Metabolism: Comparative Endocrinology.* BioScientifica Ltd, Bristol. pp: 131–138.

Ferrari D és Kosher RA (2002): Dlx5 is a positive regulator of chondrocyte differentiation during endochondral ossification. *Dev. Biol.* 252: 257-270.

Feng JQ, Chen D, Esparza J, Harris MA, Mundy GR, Harris SE (1995): Deer antler tissue contains two types of bone morphogenetic protein 4 mRNA transcripts. *Biochim. Biophis. Acta* 1263: 163-168.

Feng JQ, Chen D, Ghosh-Choudhury N, Esparza J, Mundy GR, Harris SE (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. Biophis. Acta* 1350**:** 47-52.

Ferguson CA, Tucker AS, Sharpe PT (2000): Temporospatial cell interactions regulating mandibular and maxillary arch patterning. *Development* 127: 403-412.

Francis SM, Suttie JM (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.

Garcia RL, Sadighi M, Francis SM, Suttie JM, Fleming JS (1997): Expression of neurotrophin-3 in the growing velvet antler of the red deer (Cervus elaphus). *J. Mol. Endocrinol.* 19: 173–182.

Gilbert SF (Szerk.), (2002): in: *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 504-512.

Goldring MR, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006): The control of chondrogenesis. *J Cell. Biochem*. 97: 33–44.

Goss RJ (1968) Inhibition of growth and shedding of antlers by sex hormones. *Nature* 220: 83–85.

Goss RJ (1969): *Principles of Regeneration.* Academic Press, New York

Goss RJ (editor) (1983): in: *Deer antlers. Regeneration, Function and Evolution.* Academic Press, New York.

Goss RJ, Powel RS (1985): Induction of deer antlers by transplanted periosteum. I. Graft size and shape. *J. Exp. Zool.* 235: 359–373.

Gray C, Hukkanen M, Konttinen YT, Terenghi G, Arnett TR, 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.

Gridley T (2006): The long and short of it: somite formation in mice. *Dev. Dyn.* 235: 2330-2336.

Grosshans J, Wieschaus E (2000): A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in Drosophila. *Cell* 101: 523-531.

Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolgadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V, Amédée-Vilamitjana J (2004): Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol. Biochem,.* 14: 325-332 pp.

Gutierrez G et al. (1993): Identification of a novel bone derived growth regulatory factor which is expressed in osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 8: S117.

Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA (1998): Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell* 92: 253-263.

Hall BK és Miyake T (1995): Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int. J. Devel.* Biol. 39: 881-893.

Hall BK és Miyake T (2000): All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 22: 138-147.

Hall BK (2005): Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology. Elsevier Academic Press, UK, 103-113 pp.

Hanahan D (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

Hartwig H (1967): Experimentelle untersuchungen zur entwicklungsphysiologie der stangenbildung beim reh (*Capreolus capreolus* L. 1758). *Roux. Arch. Entwicklungsmech* 158: 358–384.

Hartwig H, Schrudde J (1974): Experimentelle Untersuchungen zur Bildung der primaren Stirnauswüchse beim Reh (*Capreolus capreolus* L.). *Z. Jagdwiss.* 20: 1–13.

Herbrand H, Pabst O, Hill R, Arnold HH (2002): Transcription factors Nkx3.1 and Nkx3.2 (Bapx1) play an overlapping role in sclerotomal development of the mouse. *Mech. Dev.* 117: 217-224.

Hunt P, Clarke JD, Buxton P, Ferretti P, Thorogood P (1998): Stability and plasticity of neural crest patterning and branchial arch Hox code after extensive cephalic crest rotation. *Dev. Biol.* 198: 279-290.

Iida K, Koseki H, Kakinuma H, Kato N, Mizutani-Koseki Y, Ohuchi H, Yoshioka H, Noji S, Kawamura K, Kataoka Y, Ueno F, Taniguchi M, Yoshida N, Sugiyama T, Miura N (1997): Essential roles of the winged helix transcription factor MFH-1 in aortic arch patterning and skeletogenesis. *Development.* 124: 4627-38.

Ingham PW, McMahon AP (2001): Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes. Dev.* 15: 3059–3087.

Isaac A, Rodriguez-Esteban C, Ryan A, Altabef M, Tsukui T, Patel K, Tickle C, Izpisua-Belmonte JC (1998): Tbx genes and limb identity in chick embryo development. *Development* 125: 1867-1875.

Johnson RL, Laufer E, Riddle RD, Tabin C (1994): Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning in somites. *Cell* 79: 1165-1173.

Jiang X, Iseki S, Maxson RE, Sucov HM, Morris-Kay GM (2002): Tissue origin of mammalian skull vault. *Dev. Biol.* 241: 106-116.

Johnstone B, Yoo JU (1999): Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 367 Suppl: S156-62.

Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang Y-C, Mooney DJ (2005): Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J.* 19: 665-667.

Kaufman MH (1992): *Atlas of mouse development.* Elsevier Academic Press, UK.

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, Schultz M, Fischer K (1993): Effects of an antiandrogen treatment on the antler cycle of male fallow deer (*Dama dama* L.). *J. Exp. Zool.* 266: 195–205.

Kirsch T, Harrison G, Golub EE, Nah HD (2000): The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J. Biol. Chem.* 275: 35577-35583.

Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, O'Neill LAJ, Qwarnstrom EE, Dower SK (2004): Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 279: 42703-42708.

Kitajka K, Puskas LG, Zvara A, Hackler L Jr., Barcelo-Coblijn G, Yeo YK, Farkas T (2002): The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99**:** 2619-2624.

Kobayashi T, Soegiarto DW, Yang Y, Lanske B, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. (2005): Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J. Clin. Invest.* 115: 1734–1742.

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.

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.

Kramer S, Okabe M, Hacohen N, Krasnow M, Hiromi Y (1999): Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in Drosophila. *Development* 126: 2515-2525.

Kronenberg HM (2003): Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423: 332-336.

Kume T, Deng KY, Winfrey V, Gould DB, Walter MA, Hogan BL (1998): The forkhead/winged helix gene Mf1 is disrupted int he pleiotropic mouse mutation congenital hydrocephalus. *Cell* 93: 985-996.

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.

Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N (1994): Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368: 703-710.

Kwabi-Addo B, Wang J, Erdem H, Vaid A, Castro P, Ayala G, Ittmann M (2004): The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer. *Cancer Res.* 64**:** 4728-4735.

Labbe E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L (1998): Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol. Cell.* 1: 109-20.

Langille RM (1994): Differentiation of craniofacial mesenchyme. In: Differentiation and morphogenesis of Bone, ed.: BK Hall, 9:1-63 pp. Boca Raton, FL: CRC Press.

Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Juppner H, Segre GV, Kronenberg HM (1996): PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273: 663–666.

Laufer E, Dahn R, Orozco OE, Yeo CY, Pisenti J, Henrique D, Abbott UK, Fallon JF, Tabin C (1997): Expression of Radical Fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* 386: 366-373.

Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrugghe B. (2001): L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthr. Cartilage* 9 (Suppl A): S69–S75.

Lefebvre V és Smith P (2005): Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res.* 75: 200-212.

Li C, Clark DE, Lord EA, Stanton J, Suttie JM (2002): Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery. *Anat. Rec.* 268: 125-130.

Li C, Littlejohn RP, Suttie JM (1999): Effects of insulin-like growth factor 1 and testosterone on the proliferation of antlerogenic cells in vitro. *J. Exp. Zool.* 284: 82–90.

Li C, Suttie JM (1994): Light microscopic studies of pedicle and early first antler development in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat. Rec.* 239: 198–215.

Li C, Suttie JM (2001): Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? *Anat. Embriol.* 204: 375-388.

Li C, Stanton JA, Robertson TM, Suttie JM, Sheard PW, John Harris A, Clark DE (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 MM, Kemler R, Rossant J (2005): Dissecting Wnt/β-catenin signaling during gastrulation using RNA interference in mouse embryos. *Development* 132: 2599-2609.

Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J (1995): Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell Biol.* 15: 3479-86.

Liu Z, Xu J, Colvin JS, Ornitz DM. (2002): Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes. Dev.* 16: 859–869.

Logan M, Tabin CJ (1999): Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* 283: 1736-1739.

Lord E, Clark DE, Martin SK, et al. (2004): Profiling genes expressed in the regenerating tip of red deer (*Cervus elaphus*) antler. In: Suttie JM (Szerk.): *Antler Science and Product Technology* p 189.

Mandel, M és Higa A (1970): Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 913-949.

McGinnis W, és Krumlauf R (1992): Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283-302.

McGrew MJ és Pourquie O (1998): Somitogenesis: segmenting a vertebrate. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 487-93.

McMahon, JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP (1998): Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes. Dev.* 12: 1438-1452.

Meech R, Edelman DB, Jones FS, Makarenkova HP. (2005): The homeobox transcription factor Barx2 regulates chondrogenesis during limb development. *Development* 132: 2135–2146.

Menzel O, Vellai T, Takacs-Vellai K, Reymond A, Mueller F, Antonarakis SE, Guipponi M (2004): The *Caenorhabditis elegans* ortholog of C21orf80, a potential new protein O-fucosyltransferase, is required for normal development. *Genomics* 84: 320-330.

Miettinen PJ, Chin JR, Shum L, Slavkin HC, Shuler CF, Derynck R, Werb Z (1999): Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nat. Genet.* 22: 69-73.

Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring BD, Tarpley JE, DeRose M, Simonet WS (1998): Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to Drosophila Branchless. *Genes. Dev.* 12: 3156-3161.

Minowada G, Jarvis LA, Chi CL, Neubüser A, Sun X, Haconen N, Krasnow MA, Martin GR (1999): Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* 126: 4465-4475.

Miura N, Wanaka A, Tohyama M, Tanaka K (1993): MFH-1, a new member of the fork head domain family, is expressed in developing mesenchyme. *FEBS Lett*. 326:171-176.

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*). *Mol. Genet. Genomics* 277: 237-248.

Monsoro-Burq AH, Bontoux M, Teillet MA, Le Dourain NM (1994): Heterogeneity in the development of the vertebra. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 10435-10439.

Monsoro-Burq AH, Duprez D, Watanabe Y, Bontoux M, Vincent C, Brickell P, Le Dourain NM (1996): The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development* 122: 3607-3616.

Mori-Akiyama Y, Akiyama H, Rowitch DH, de Crombrugghe B. (2003): Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 9360–9365.

Mount JG, Muzylak M, Allen S, Althnaian T, McGonnel M, Price JS (2006): Evidence that the canonical Wnt signaling pathway regulates deer antler regeneration. *Dev. Dyn.* 235: 1390-1399.

Muir PD, Semiadi G, Asher GW, Broad TE, Tate ML, Barry TN (1997): Sambar deer (*Cervus unicolor*) x red deer (*Cervus elaphus*) interspecies hybrids. *J. Hered.* 88: 366-372.

Mukhopadhyay K, Lefebvre V, Zhou G, Garofalo S, Kimura JH, de Crombrugghe B (1995): Use of a new rat chondrosarcoma cell line to delineate a 119-base pair chondrocyte-specific enhancer element and to define active promoter segments in the mouse pro-alpha 1(II) collagen gene. *J. Biol. Chem.* 270**:** 27711–27719.

Mundlos S, Olsen BR. (1997): Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J.* 11: 227–233.

Nakashima K et al., (2002): The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29.

Nakashima K és de Crombrugghe (2003): Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.* 19: 458-466.

Niswander L (1997): Limb mutants: what can they tell us about normal limb development? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 530-536.

Niswander L, Jeffrey S, Martin GR, Tickle C (1994): A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* 371: 609-612.

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 pp: 171–187.

Noden DM (1983): The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissue. *Dev. Biol.* 96: 144-165.

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, Wienberg J, Lyons LA (1997): Comparative genomics: lessons from cats. *Trends Genet.* 13: 393-399.

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.

Orend G, Huang W, Olayioye MA, Hynes NE, Chiquet-Ehrismann R (2003): Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4. *Oncogene* 22: 3917-3926.

Orosz L (2001): Géntérképektől génekig, génektől genetikai útvonalakhoz és iskolákhoz. *Székfoglalók a Magyar Tudományos Akadémián*. 407-437 pp.

Ornitz DM. (2005): FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth F. R.* 16: 205–213.

Otte AP, Kwaks THJ (2003): Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 448-454.

Ovchinnikov DA, Selever J, Wang Y, Chen YT, Mishina Y, Martin JF, Behringer RR (2006): BMP receptor type IA in limb bud mesenchyme regulates distal outgrowth and patterning. *Dev. Biol.* 295: 103-15.

Palmeirim I, Henrique D, Ish-Horowicz D, Pourquie O (1997): Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91: 639-48.

Pan D, Zhe X, Jakkaraju S, Taylor GA, Schuger L (2002): P311 induces a TGF-beta1-independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype. *J. Clin. Invest.* 110: 1349-1358.

Price JS, Oyajobi BO, Oreffo RO, Russell RG (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.

Price JS, Allen S (2004): Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 359: 809–822.

Price JS, Faucheux C (2001): Exploring the molecular mechanisms of antler regeneration. In: Sim JS, Sunwoo HH, Hudson RJ, Jeon BT (Szerk.): *Antler Science and Product Technology*. Antler Science and Product Technology Research Center, Edmonton, Canada, pp.53-65.

Price JS, Nicholls B, Lanyon LE, Allen SP (2002): Estrogen rapidly induces bone formation in regenerating deer antler. *Bone* 30, 10S.

Price JS, Oyajobi BO, Nalin AM, Frazer A, Russell RGG, Sandell LJ (1996): Chondrogenesis in the regenerating antler tip of red deer: collagen types I, IIA, IIB, and X expression demonstrated by in situ nucleic acid hybridization and immunocytochemistry. *Dev. Dyn.* 203**:** 332-347.

Price JS, Allen S, Faucheux C, Althanaian T, Mount JG (2005): Deer antlers: a zoologival curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals? *J. Anat.* 207: 603-618.

Prockop DJ (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.

Puskas LG, Hackler L Jr., Kovacs G, Kupihar Z, Zvara A, Micsik T, van Hummelen P (2002a): Recovery of Cyanine-dye Nucleotide Triphosphates. *Anal. Biochem.* 305: 279-281.

Puskas LG, Zvara A, Hackler L Jr., van Hummelen P (2002b): RNA amplification results in reproducible microarray data with slight ratio bias. *Biotechniques* 32: 1330-1340.

Qian Z, Wilusz J (1994): GRSF-1: a poly(A)+ mRNA binding protein which interacts with a conserved G-rich element. *Nucleic Acids Res.* 22: 2334-2343.

Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R, Pedersen RA, Rubenstein JL (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.

Reich A, Sapir A, Shilo BZ (1999): Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling, *Development* 126:4139-4147.

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.

Reymond A, Friedli M, Henrichsen CN, Chapot F, Deutsch S, Ucla C, Rossier C, Lyle R, Guipponi M, Antonarakis SE (2001): From PREDs and open reading frames to cDNA isolation: revisiting the Human Chromosome 21 transcription map. *Genomics* 78: 46-54.

Rickmann M, Fawcett LW, Keynes RJ (1985): The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J. Embryol. Exp. Morph.* 90**:** 437-455.

Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C (1993): Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416.

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 JA, Wakamiya M, Behringer RR (1999): Goosecoid acts cell autonomously in mesenchyme-derived tissue during craniofacial development. *Development* 126: 3811-3821.

Rodrigo I, Hill RE, Balling R, et al. (2003): Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. *Development* 130: 473–482.

Rossel M, Capecchi MR (1999): Mice mutant for both Hoxa1 and Hoxb1 show extensive remodelling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* 126: 5027-5040.

Ruvinsky I és Gibbson-Brown JJ (2000): Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution. *Development* 127: 5233-5244.

Sadighi M, Haines SR, Skottner A, Harris AJ, Suttie JM (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.

Sadighi M, Li C, Littlejohn RP, Suttie JM (2001): Effects of testosterone either alone or with IGF-I on growth of cells derived from the proliferation zone of regenerating antlers in vitro. *Growth Hormone IGF Res.* 11: 240–246.

Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. (1999): FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes. Dev.* 13: 1361–1366.

Sambrook J, Fritsch EF és Maniatis T (1989): A laboratory manual I-III. *Cold Spring Laboratory Press.* Cold Spring Harbor, NY.

Sandberg AA, Bridge JA (2003): Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: chondrosarcoma and other cartilaginous neoplasms. *Cancer Genet. Cytogen.* 143: 1-31.

Santagati F, Rijli FM (2003): Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nature Rev. Neurosci*. 4: 806-819.

Satokata I, Maas R (1994): Msx-1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat. Genet.* 6: 348-356.

Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ (1996): Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381: 235-238.

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 up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line TC6. *J. Biol. Chem.* 275: 10738-10744.

Sempere AJ, Boissin J, Dutourne B, Lacroix A, Blanc MR, Ravault JP (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.

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993):Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg.* 75A: 532-533.

Shi ZD és Barrell GK (1994): Thyroid hormones required for the expression of seasonal changes in red deer (*Cervus elaphus*) stags. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7829-7834.

Shin V, Zebboudj AF, Bostrom K (2004): Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J. Vasc. Res.* 41: 193-201.

Slate J, Van Stijn TC, Anderson RM, McEwan KM, Maqbool NJ, Mathias HC, Bixley MJ, Stevens DR, Molenaar AJ, Beever JE, Galloway SM, Tate ML (2002): A deer (subfamily *Cervinae)* genetic linkage map and the evolution of ruminant genomes. *Genetics* 160: 1587-1597.

Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Croumbrugghe B, Lefebvre V. (2001): The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1: 277–290.

St Amand TR, Zhang Y, Semina EV, Zhao X, Hu Y, Nguyen L, Murray JC, Chen Y (2000): Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth-forming anlage. *Dev. Biol.* 217: 323-332.

Studler JM, Glowinski J, Levi-Strauss M (1993): An abundant mRNA of the embryonic brain persists at a high level in cerebellum, hippocampus and olfactory bulb during adulthood. *Europ. J. Neurosci.* 5: 614-623.

Suttie JM, Gluckman PD, Butler JH, Fennessy PF, Corson ID, Laas FJ (1985): Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) antlerstimulating hormone? *Endocrinology* 116: 846–848.

Suzuki M, Mizutani-Koseki Y, Fujimara Y, Miyagishima H, Kaneko T, Takada Y, Akasaka T, Tanzawa H, Takihara Y, Nakano M, Masumoto H, Vidal M, Isono K, Koseki H (2002): Involvement of Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development* 129: 4171-4183.

Széchenyi Zsigmond (1979): Szarvasok nyomában. Gondolat, Budapest

Szederjei Ákos (1960): Szarvas. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest

Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy 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.

Takihara Y, Tomotsune D, Shirai M, Katoh-Fukui Y, Nishii K, Motaleb MA, Nomura M, Tsuchiya R, Fujita Y, Shibata Y, Higashinakagawa T, Shimada K (1997): Targeted disruption of the mouse homologue of *Drosophila* polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development* 124: 3673-3682.

Tate ML, Mathias HC, Fennessy PF, Dodds KG, Penty JM, Hill DF (1995): A new gene mapping resource: interspecies hybrid between Pére David's deer (*Elaphurus davidianus*) and red deer (*Cervus elaphus*). *Genetics* 139: 1383-1391.

Tribioli C, Frasch M, Lufkin T (1997): Bapx1: an evolutionary conserved homologue of the Drosophila bagpipe homeobox gene is expressed in splanchnic mesoderm and the embryonic skeleton. *Mech. Dev.* 65: 145–162.

Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JL, Bishop JM, Martin GR (1999): Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes. Dev.* 13: 3136-3148.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001): Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98**:** 5116-5121.

Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, et al. (2001): Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J. Cell Biol.* 153: 87–100.

Vacek Z (1955): Innervace lyci rostoucia parohu u cervidu. *Cslka. Morf.* 3: 249-264.

Van der Eems KL, Brown RD, Gundberg CM (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.

Voncken JW, Roelen BAJ, Roefs M, de Vries S, Verhoeven E, Marino S, Deschamps J, van Lohuizen M (2003): Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 2468-2473.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ (1996): Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273: 613–622.

Wang W és Kirsch T (2002): Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *J. Cell Biol.* 157: 1061-1069.

Wislocki G (1943): Studies on growth of deer antlers. In *Essays in Biology*, pp. 631–653. Berkeley, CA: University of California Press.

Wislocki GB és Singer M (1946): The occurrence and function of nerves in the growing antlers of deer. *J. Comp. Neurology* 85: 1-19.

Wood WI., Gitschier J, Lasky LA, Lawn RM (1985): Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: A method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc. Natl Acad. Sci.* 82: 1585–1588.

Wright E, Hargrave MR, Christiansen, et al. (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* 9: 15–20.

Xu Q, Wilkinson DG (1998): in Wilkinson DG, (Szerk.): *In Situ Hybridization: a practical approach.* Oxford University Press Inc., New York, pp: 87-106.

Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RL, Ornitz DM, Leder P, Deng C (1998): Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125: 753-765.

Yoshida CA, 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 CA, 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.

Zacharias U, Norenberg U, Rathjen FG (1999): Functional interactions of the immunoglobulin superfamily member F11 are differentially regulated by the extracellular matrix proteins tenascin-R and tenascin-C. *J. Biol. Chem.* 274: 24357-24365.

Zákány J és Doboule D (1999): Hox genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res.* 296: 19-25.

Zeller R, Haramis AG, Zuniga A, McGuigan C, Dono R, Davidson G, Chabanis S, Gibson T (1999): Formin defines a large family of morphoregulatory genes and functions in establishment of polarizing regions. *Cell Tissue Res.* 296: 19-25.

Zhao Q, Behringer RR, de Crombrugghe B (1996): Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the Cart1 homeobox gene. *Nat. Genet*. 13: 275-283.

Zheng Q, Zhou G, Morello R, et al. (2003): Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression *in vivo*. *J. Cell Biol.* 162: 833–842.

Zuniga A, Haramis AG, McMahon AP, Zeller R (1999): Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* 401: 598-602.

Melléklet 2.2.

2. táblázat: Az agancscsúcs és a magzati növekedési porclemez összehasonlítása alapján az agancsban csökkent aktivitást mutató gének a heterológ microarray hibridizáció szerint, (≥2X expressziós különbségek, médián értékek)

A gén neve	Elérési szám	A változás mértéke
Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	AA066208	-3,47
Similar to myosin, light polypeptid 6, alkali, smooth muscle&non-muscle	AA230924	-3,33
RIKEN cDNA 0910001A06 gene **(0910001A06Rik)**	AA274203	-2,68
Proteasome(prosome, macropain) subunit, alpha type 1 **(Psma1)**	AW545777	-2,54
Sar1a gene homolog **(Sara1)**	AW544555	-2,50
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 5 **(Psmc5)**	AW542410	-2,49
Basic leucin zipper and W2 domains 2 **(Bzw2)**	AA068436	-2,47
Proteasome (prosome, macropain) 28, subunit 3 **(Psme3)**	AA245903	-2,40
Similar to Ddx5 protein	AA237184	-2,38
CAP, andenylate cyclase-associated protein 1 **(Cap1)**	AW539801	-2,15
Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4 **(Psma4)**	AA277958	-2,15
Cell division cycle 42 homolog **(Cdc42)**	AA266975	-2,10
Eukaryotic translation termination factor 1 **(Etf1)**	AW540982	-2,09
Chaperonin subunit 3 (gamma) **(Cct3)**	AW536183	-2,09
ATPase, Na+/K+ transporting beta 1 polypetide **(Atp1b1)**	AW544502	-2,06
Actin related protein 2/3 complex, subunit 5 **(Arpc5)**	AW540980	-2,00
Villin 2 **(Vil2)**	AW542365	-2,00
RIKEN cDNA 1810006K21 protein **(1810006K21Rik)**	AA412944	-2,00

Melléklet 2.3.

3. táblázat: A szarvas ortológ gének azonosításához felhasznált primerek. NP: nem publikált szekvenciák.

A gén neve	Elérési szám	Forward primer	Reverse primer
Gas2	DQ239791	5'- TCTGAGCCCAAAGGTACGCAGTG -3'	5' –GGTGAAGGAGAAGGGGCAGAGAGT -3'
Grsf1	DQ239792	5' –GAAGGCCACTGGAGAAGCTGATGT -3'	5' –GGATGAGGAGGGGATGGGTTAGAC -3'
Glypican3	DQ239790	5' - AAGGGCCCAACATGCTGCTCAA - 3'	5'- GCCATACAGCCTTGCATGACCAC- 3'
BmpRII	DQ239788	5' –TGGAGCTGATTGGCCGAGGT- 3'	5' –AGCCGAGCCTCTGCATCCTGGT- 3'
Sprouty1	DQ239788	5' - CAG GCA GCA TAG TTC TGT GAC A - 3'	5'- GTA AGA GTG GAC TGT GAA ATG CA - 3'
C21orf70	DQ239789	5' –CCTGGGAAGATGGGGAAAGTGAG- 3'	5' –TCGTGGGTGGCCTCGGTGCTCTC- 3'
p311	DQ239793	5' –CCCCAAGGAAGTGAACCGCAAGAA- 3'	5' –GTGATTGCTCCCGCTACAGTGACT- 3'
Trb2	DQ239795	5' –CCCCGAGCCCGCCTGAGACT- 3'	5' –CTCCTCTCCGCTGCCCTCTCT- 3'
Rnf2	DQ239794	5' - GCTGAAGATACAGGCCATGAACAG - 3'	5' - GTAAATGGTGTACTGCTTCTCACTG - 3
β-actin	DQ233465	5' –GAAATTGCCGCCCTCGTCATC- 3'	5'–CAGGAAGGACGGCTGGAAGAG-3'
FGFR4	NP	5' – TGAGGATGCAGGCGAGTACA – 3'	5' – ACCTGGTAGGCGCAGGAGAC – 3'
Msx1	NP	5' – GACCGCTCGGCCATTTCT – 3'	5' – TGTCAGGTGGTACATGCTGTAG – 3'
Fgf8	NP	5' – TGCTGTTGCACTTGCTGGTT – 3'	5' – GAAGTGGACTTCGCGCTGGT – 3'
Dlx5	NP	5' – CCAGAGCAGCCCCACAGCCAATT - 3'	5' – TAGCTGGACGCGGGGGACTGGT – 3'
Twist1	NP	5' – TTGGCACGACCTCTTGAGAATG – 3'	5' – AGTCCTACGAGGAGCTGCAGAC – 3'
BSP	NP	5' – GGAATGGCCTGTGCTCTTTCAA – 3'	5' – CACGAGGATCTCCGTTCTCACT – 3'
Osterix	NP	5' – CGAAAGAAGCCGATCCACAGTTG - 3'	5' – GACGGCCTGAGATGAGAGTTTGC – 3'
Osteopontin	NP	5' – AAGGGTGTTACCATGAAGCCACAC – 3'	5' – TGATGGCCGAGGTGATAGTGTG – 3'
Bmp2	NP	5' – GCAGCCAGCCGAGCCAACAC – 3'	5' – CACCCACAGCCCTCCACAACCAT – 3'
Bmp4	NP	5' – CCATGAGCCTCCTTCGGGACTT – 3'	5' – CACCCCTCTACCACCATCTCC – 3'
Gdnf	NP	5' – CGGACGGGACTCTAAGATGAAGT – 3'	5' – AAAGGACAGGTCGTCATCAAAGG – 3'
N-Cadherin	NP	5' – AACCAGCCCTACCTGAGGATTC – 3'	5' – CGCTGATTCTGTAGATGGCGTT – 3'
Sox9	NP	5' – CATGAAGATGACGGAGCAGGAGA – 3'	5' – AGTCCGGGTGGTCCTTCTTGT – 3'
TenascinC	NP	5' – TGGATGGCACAGTCAAGGAAGT – 3'	5' – TGGAACCAGTTAACGCCCTGAC – 3'
Cbfa1	NP	5' – ACAGTCTTCCCCGCCGTGGTCCTAT – 3'	5' – GAACTGCTGTGGCTTCCGTCAG – 3'
Wnt1	NP	5' – CACGACCTCGTCTACTTCGAG – 3'	5' – GGAGAGGGAGGGAGGTAGGTC – 3'

Melléklet 2.4.

4. táblázat: A QRT-PCR mérésekhez felhasznált primerek és próbák.

Gene name	forward primerek 5'-6FAM™ / 3' TAMRA™ jelölt próbák	reverse primerek
Gas2	5' – TTATCCTGGTGCCGAGATTTA – 3' TAGAGCTTGGCCGGATTGCAGC	5' – GAAGGGGCAGAGAGTGTTTCT – 3'
Grsf1	5' – CTTTAGATCCCAAGTCCAAGAAAG – 3' AACATGGGACCGATCCTTGAGCA	5' – AAGCTGATGTGCACTTCGATAC – 3'
Glypican3	5'- GGAACAACTGCTTCAGTCTGC - 3' TGTTGTTCGCCACGCCAAGAA	5'- TCTAAGGTGGACTCTGGAAGG - 3'
BmpRII	5' – CCATCTGCAGTGACTCTCTCATC – 3' AGCGAGCAATGTTGTCATGTTCCATC	5' – CGAGGTCGATATGGAGCTGTA – 3'
Sprouty1	5' – GGACTGTGAAATGCATCTGG – 3' TTATGACAAGAGCCTCTGCCATCCA	5' – CCCAGAGTACCCAATCAAATG –3'
C21orf70	5' – CTCTGCAGACCTCGATTGGT - 3' AGGAGTTGGCTTGCGTGAACGCTA	5' - TCAGCTTCAGCTTCTCCTTCTT – 3'
p311	5' – TGACTCAAGTGAAAACGCTCA – 3' TCTGCTCTCACACAACCGGTCCA	5' – GACTCTCAGCCTCTGCAAGAA – 3'
Trb2	5' – CTTGACCCGAGTCCTTTCTTC – 3' TTGCAGGTGCGGACGAAGGAA	5' – TGTTCTTTGAGCGGAGCTATG – 3'
Rnf2	5' – GTGGGATGAGGCCTGAATACT – 3' TGATTGCTGTGCGTGGATGCG	5' – AGCAGAGGACAATGGAGACAG – 3'
β-actin	5'- GATCTGGCACCACACCTTCTA - 3' ATGTGGCCATCCAGGCTGTGC	5'- CCCAGAGTCCATGACAATACC - 3'

Melléklet 2.5.

5. táblázat: A szemikvantitatív RT-PCR során használt primerek.

Gén neve	Primerek	Ciklus számok
rat C21orf70	F: GAAGAGTGTGGTGTCCCTAAAGA	26
	R: GTCCTCTCTTCCTCAAGAAGCTG	
mouse C21orf70	F: GAGTGTGGTGTCCCTAAAGAGAG	26
	R: CTGCCTCTGTACTGTGGTCATTC	
Tnf	F: CTACTCCCAGGTTCTCTTCAAGG	NED
	R: GCAATGACTCCAAAGTAGACCTG	
Col9a1	F: ACTCCAGGAGCTGATGGATTAAC	28
	R: GGGTCTCAATCATGAAATCCAA	
Ihh	F: CAACTACAATCCCGACATCATCT	NED
	R: GACTCGTAATACACCCAGTCGAA	
Col2a1	F: CACCTACCACTGTAAGAACAGCA	21
	R: TTACAAGAAACAGACAGGCCCTA	
Cbfa1	F: CGGGAATGATGAGAACTACTCTG	27
	R: CTCTCATACTGGGATGAGGAATG	
Sox9	F: AGAAGGAGAGCGAGGAAGATAAA	29
	R:CTCCACGAAGGGTCTCTTCTC	
Beta1-integrin	F: CTGCAGTAACAATGGAGAGTGTG	26
	R: GAACTTGGGATCTGTGCACTTAC	
Syndecan1	F: CAGGGTATGGACTATCTGTTTGG	28
	R: TCTTGTCAACTTCCAGGAGAAAG	
Twist1	F: AGACACCGGATCTATTTGCATT	28
	R: AGAGGTCTTGCCAATCAGTCAT	
Aggrecan	F: AAATGCTCAAGACTACCAGTGGA	18
	R:TCTCATAGCGATCTTTCTTCTGC	
Cdk2	F: TAGTGTTTGGCCTCATCTAGCAA	24
	R: GAAGAACTGAACTTCCCAAAGGA	
Cdc2a	F: GAAGTGTGGCCAGAAGTAGAGTC	26
	R: ATACAAGACAGGAAGAGCCAACA	
BmpR2	F: ACAGCTGACAGAAGAAGACTTGG	27
	R: TAGGTCTCTTCGGAAGGTTCTGT	
Bmp4	F: GCCATGCTAGTTTGATACCTGAG	NED
	R: GATGTTCTTCGTGATGGAAACTC	
FgfR3	F: GATACTCCTAGCTCCAGCTCGTC	26
	R: GCCAGTCAGGAGATCATTCTACA	
FgfR4	F: GAGGCCTTCTGTTCCAAACTTAT	37
	R: AGGCTCCTTCAACAAGATGCTA	
Msx1	F: TTAAACCCTTCGCTACACAGTTC	35
	R: GTCTCTTGGAGCACCAAATAACA	
Tgf-beta1	F: CTGCTCTTGTGACAGCAAAGATA	28
	R: CAGACAGAAGTTGGCATGGTAG	
Tenascin C	F: CACTGGATACCTCCTGGTCTATG	37
	R: GACTTCCAGTGCTTGAGTCTTGT	
N-CAM	F: ATCTGGTCAAGTACAGAGCGAAG	37
	R: TTGTTCAGGAAGTAGCAGGTGAT	
N-Cadherin	F: AAACCTGTGGGAATCAGACG	27
	R: ATACATGTCGGCCAGCTTCT	

5. táblázat folytatása

Pax1	F: AAGTGTTCGCTGCTTATCTAACG	NED	
	R: ATGGAAAGTCCGTGTAAGCTACC		
Bapx1	F: CTTTAACCATCAGCGCTACCTG		37
	R: CCGGGAGACAGTAGTAAGGGTAG		
Delta-like1	F: CGACTGAGGTTTAAGGTGGAAGT	NED	
	R: TGAACTCAAGTCACTCGTCCATT		
EphB3	F: AAATCGTCAACACGCTAGACAAG		37
	R: ACTGCTGAGGATCTTCTTCTGGT		
Hoxa2	F: CCACAAAGAATCCCTGGAAATAG		40
	R: TGACTTCTCTTCCTCGTCTTCCT		
Notch2	F: GAGTGCCTCAGTTACACATGGAC	NED	
	R: GACAACAGGCATTCATCGTACTC		
Wnt3a	F: TGAATTTGGAGGAATGGTCTCTC	NED	
	R: AAGTATGTGTAACGTGGCCTCAA		
Wnt7a	F: GATCCTGGAGGAGAACATGAAAC	NED	
	R: TCACTGGGTCCTCTTCACAGTAA		
Beta-catenin	F: ATACCATTCCACTGTTTGTGCAG		24
	R: GAGATCAGCAGTCTCATTCCAAG		
BmpR1A	F: TCAGATGCAGTAAGGCAGACTCC		26
	R: TGTGGCCAGTGGTTTAAATATGC		
BmpR1B	F: GAGATTGCAAGGAGATGTGTTTC	NED	
	R: GTGTAATTCCTTGCTCTGTCCAC		
Noggin	F: TCATTTCCGAGTGTAAGTGTTCC		29
	R: TACAGTAGAAGCCGGGTAACTTT		
Pax9	F:CATCGCCTGTCTGGAGACATAAC		29
	R: AGGCTAATGCAACAGCTTGAAGA		

ND: nem detektált

Melléklet 2.6.

6. táblázat: Gímszarvas gének hasonlósága a szarvasmarha-, egér- és humán-eredetű ortológokhoz (azonosság/szakaszhossz). Forrás: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Az azonosított gén és hossza (bp)	*Bos taurus*	*Mus musculus*	*Homo sapiens*
GRSF1 (901)	667/694 (96%)	215/246 (87%)	271/302 (89%)
Glypican3 (657)	644/657 (98%)	605/657 (92%)	623/657 (94%)
BmpR2 (854)	842/851 (98%)	764/851 (89%)	806/851 (94%)
Sprouty1 (1875)	1561/1602 (97%)	552/654 (84%)	996/1074 (92%)
C21orf70 (808)	685/717 (91%)	302/373 (80%)	364/441 (83%)
P311 (924)	889/925 (96%)	317/347 (98%)	423/448 (94%)
Trb2 (960)	941/960 (98%)	833/943 (88%)	869/933 (93%)
Rnf2 (455)	431/442 (97%)	397/443 (89%)	411/440 (93%)
Gas2 (795)	536/546 (97%)	485/542 (89%)	515/546 (94%)

7.M.3. Saját közlemények

Nemzetközi publikációk:

István Gyurján Jr., Andrea Molnár, Adrienn Borsy, Viktor Stéger, László Hackler Jr., Zoltán Zomborszky, Péter Papp, Ernő Duda, Ferenc Deák, Péter Lakatos, László G. Puskás, László Orosz (2007): Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 221-235.

Andrea Molnár, **István Gyurján Jr**., Éva Korpos, Adrienn Borsy, Viktor Stéger, Zoltán Zomborszky, Péter Papp, Ferenc Deák, László Orosz (2007): Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus. Molecular Genetics and Genomics* 277: 237-248.

I. Gyurjan Jr., A. Borsy, A. Molnar, V. Steger, Z. Szabolcsi L. Orosz (2006): Initiation of bone formation during antler development. *Bone*, 39 (5) Poster abstract (P01)

A. Borsy, B. Balla, **I. Gyurjan Jr.**, V. Steger, 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 Tissue International*, Volume 78. Supplement 1. Poster abstract

Magyar előadások és poszterek:

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, Előadás: 56. p.

Gyurján I., Papp P.P., Orosz L (2004): A szarvasagancs és a porcfejlődés korai fázisának története, Előadás: Szeged, *Genetikai Műhelyek Magyarországon, minikonferencia.*

Gyurján I., Fodor Z., Papp P., Orosz L. (2000): Az agancs növekedését specifikusan irányító gének izolálására irányuló kísérletek. *Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya,* 5. Munkaértekezlete, Sopron, Poszter: 139. p.

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

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

Molnár, A., **Gyurján I**., Borsy, A., Stéger, V., Orosz, L. és Papp, P. (2002): Az agancsfejlődést determináló gének azonosítása. *Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya,* 7. Munkaértekezlet, Keszthely, Poszter:137. p.

8. Köszönetnyilvánítás

A dolgozatomban olvasható eredmények jelentős hányada az MBK Genetikai Intézetében, 1998-2006 között készült. A munka fennmaradó része az SZBK Biokémiai Intézetében, az SZBK Genomikai Laborjában, valamint az ELTE Genetikai Tanszékén készült.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Orosz László Tanár Úrnak a szakmai irányítását, az elméleti és gyakorlati képzésemet, a munka anyagi hátterének a biztosítását.
Köszönöm Dr. Papp Péternek, hogy szakmai segítséget nyújtott munkám első felében.

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

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

Köszönet a csoport jelenlegi és volt tagjainak Dr. Nagy Tibornak, Dr. Borsics Tamásnak, Dr. Semsey Szabolcsnak, Dr. Csiszovszky Zsoltnak, Dr. Ganyu Anitának, Borsy Adriennek, Molnár Andreának, Stéger Viktornak, Szabolcsi Zoltánnak, Ferenczy Szilamérnak és Blaha Bélának a felvetődött problémák megoldásában nyújtott segítségükért és barátságukért.

Köszönöm Dr. Kobolák Juliának és Bender Balázsnak a munkám során nyújtott esszenciális segítségüket.

Külön köszönet illeti Dr. Deák Ferencet, Dr. Korpos Évát, Dr. Kiss Ibolyát, Dr. Duda Ernőt, Kusz Erzsébetet és Dr. Puskás Lászlót a jól működő kooperációért és segítségükért. Köszönöm Dr. Zomborszky Zoltánnak és Dr. Nagy Jánosnak a mintagyűjtésben nyújtott segítségüket.

Köszönöm Szüleimnek, hogy ennyi éven keresztül támogattak és biztattak munkám folytatására.

Végül köszönet Barátaimnak és Mindenkinek, aki jóindulattal viseltetett irányomban.