

SZENT ISTVÁN EGYETEM

A GÍMSZARVAS AGANCSFEJLŐDÉSÉBEN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

Doktori (PhD) értekezés

MOLNÁR ANDREA

Gödöllő 2008.

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztési Doktori Iskola

tudományága: állattenyésztés

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

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

Dr. Mézes Miklós

Dr. Orosz László

Dr. Mézes Miklós iskolavezető Dr. Orosz László témavezető

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések	3
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A gímszarvas	7
2.1.1. A gímszarvas genetikája	8
2.2. Az agancs-ciklus	9
2.2.1. Az agancs-ciklus hormonális szabályozása	9
2.3. Az agancs fejlődése	12
2.3.1. A vázcsontozat kialakulása	12
2.3.2. Az endochondrális csontosodás molekuláris mechanizmusa	14
2.3.3. A rózsatő és az első agancs kialakulása	19
2.3.4. A fejlődő agancs felépítése	21
2.3.5. Az agancsfejlődés molekuláris biológiai háttere	24
3. Anyag és módszer	27
3.1. Anyagok	27
3.1.1. Felhasznált baktériumtörzsek és táptalajok	27
3.1.2. Standard oldatok	27
3.2. Mintagyűjtés	
3.3. Szövettani vizsgálatok	29
3.4. mRNS izolálás és cDNS szintézis	29
3.5. AFLP Differential Display	30
3.6. cDNS fragmentek klónozása és tesztelése	
3.7. Northern hibridizáció	
3.8. cDNS könyvtár készítése	32
3.9. Valós-idejű mennyiségi RT-PCR	32
3.10. In situ hibridizáció	33
3.11. Western blot analízis	33
3.12. Immunohisztokémia	34
4. Eredmények	35
4.1. A vizsgált agancs minták szövettani ellenőrzése	35
4.2. Expressziós különbségek kimutatása AFLP-vel	36
4.3. A gímszarvas ortológ gének azonosítása	
4.4. Az mRNS expressziók mintázatának megerősítése	
4.5. A génexpressziók mennyiségi analízise.	
4.6. A génexpressziók térbeli lokalizálása in situ hibridizációval	
4.7.A gímszarvas Annexin 2 immunlokalizációja	
4.8. Új tudományos eredmények	
5. Következtetések és javaslatok	
5.1. Expressziós mintázatok vizsgálata a feilődő agancsban	
5.2. Intenzív sejtosztódás a fejlődő agancscsúcsban	50
5.3. Seitdifferenciáció az agancscsúcsban	
5.4. A proliferáció és a differenciáció szabályozása a feilődő agancsban	53
5.5. Javaslatok	
6. Összefoglalás	
6. Summary	

7. Mellékletek	
1.számú melléklet: Irodalomjegyzék	61
2.számú melléklet	
8. Köszönetnyilvánítás	

Rövidítések

Apikális ektodermális redő (Apical ectodermal ridge)
Agancs növekedési központ (Antler Growth Center)
Amplified fragment length polymorphism
Alkálikus foszfatáz
Annexin
Antlerogenic periosteum
Apolipoprotein D
Bone morphogenetic protein
Bovine Serum Albumin
Core binding factor
I típusú kollagén
II típusú kollagén
X típusú kollagén
cAMP response element-bindig protein
Dimetil-szulfoxid
Ditiotreitol
Extracelluláris mátrix
Etilén-diamin-tetraecetsav
Expressed sequence tag
Fibroblast growth factor
Fibroblast growth factor receptor
Tüszőserkentő hormon (follikulus stimuláló hormon)
Glükóz-amino-glikán
Insulin-like growth factor
Indian hedgehog
Sárgatest serkentő hormon (luteinizáló hormon)
MOPS-EDTA
4-Morfolino-propán-szulfonsav
A Drosophila Msh (Muscle segment homeobox) gerinces ortológia
Osterix
Phosphatidylethanolamine binding protein
PTH/PTHrP receptor
Prolaktin
Parathyroid hormon
Parathyroid hormon related peptide
Retinoic acid
Receptor activator of NF κ B (Nuclear factor kappa B)
Receptor activator of NFkB ligand
R: Retinoic acid receptor
Runt-related transcription factor
Nátrium-dodecil-szulfát
SRY (sex determining region Y)-boksz
Konyhasós nátrium-citrát
lesztoszteron
Transgelin

TGF:	Transforming growth factor
TPM1:	α-tropomiozin
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
VEGFR:	Vascular endothelial growth factor receptor
WNT:	A Drosophila Wingless ortológjai

1. BEVEZETÉS

Minden este bánva bánják, Hogy e vadat mér' kivánják, Mért is űzik egyre, nyomba, Tévelyítő bús vadonba.

Mégis, mégis, ha reggel lett, A gímszarvast űzni kellett, Mint töviset szél játéka; Mint madarat az árnyéka

Arany János: Buda halála, 6. ének

A gímszarvas mindig fontos szerepet töltött be mitológiánkban: csodaszarvasunk nem csak az új hazába vezető utat mutatta meg, de a későbbi korok legendáiban is feltűnik (lásd: Szent Lászlóhoz kapcsolódó mondakört). A szarvas ősidők óta a bőség, a termékenység és a bölcsesség egyetemes jelképe. A szarvasbikák fához hasonló, tavasszal "kirügyező", télen lehulló, ágas-bogas agancsa maga az életfa, a megújulás, az újjászületés szimbóluma.

Az agancsot sok nép használta/használja mitikus amulettként. A keleti gyógyászatban orvosságként alkalmazzák – nemcsak mint afrodiziákumot. A megszárított barkás-bársonyos agancsból, a pantenből készült szerek hatása a biológiailag aktív összetevők magas szintjén alapszik, és a Föld számos országában hasznosítják étrend-kiegészítőkben.

Napjainkban a modern tudomány is "felfedezte" magának a csodaszarvast, az agancs-ciklus mögött zajló élettani folyamatok csodáját. Hiszen az évenként lehullatott és újranövesztett agancs egyedülálló és látványos példája egy szerv teljes regenerálásának az emlősök körében. A gímszarvas bikája mintegy 100-120 nap alatt rakja fel az akár 14-17 kg-os hatalmas trófeáját. Ez napi 1-2 cm-es növekedést jelent ágvégenként, amihez hihetetlen gyors szövetgyarapodás és sejtdifferenciáció szükséges. Ez az erőteljes növekedés a csúcsi részben elhelyezkedő embrionális jellegű mezenchimasejtek intenzív sejtosztódására vezethető vissza (amely párhuzamba állítható a növények csúcsi növekedésével). Bár ezen őssejt jellegű mezenchimasejtek fejlődési potenciájáról még kevés ismeretünk van, az elmondható, hogy multipotens sejtek, amelyekből porc- és csontszövet mellett vérerek is fejlődnek, valamint idegek is regenerálódnak. Ezért az agancsfejlődés az idegregeneráció folyamatának feltárásában is előbbre visz. Emellett sok új információval szolgálhat a differenciáció és a regeneráció mechanizmusairól, amelyek korunk egyik legnagyobb orvos-biológiai kihívása.

Az agancs elcsontosodásához sok ásványi anyag szükségeltetik, amelyet a szarvasbika nem képes a mineralizáció mintegy 3 hete alatt csupán táplálékából fedezni. Ezért hatalmas mennyiségű kalcium és foszfor szállítódik a szegycsontból, bordákból és a gerincoszlop csontozatából az agancsba. A vázcsontok eme oszteopórozis-szerű folyamata a bőgést megelőző időszakban megfordul, az agancs letisztulása idején az ásványi anyagok a táplálékból visszapótlódnak a csontokba. Ezt a folyamatot nevezik ciklikus fiziológiás oszteoporózisnak, amely genetikai hátterének feltérképezése közelebb visz bennünket a humán csontritkulás megértéséhez és ennek révén kezeléséhez és megelőzéséhez.

Ezek ismertében érthető, hogy a világ számos országában miért kezdték meg az agancsképződés vizsgálatát. Tekintve, hogy a világ legjobb minőségű gímszarvas állománya hazánkban található, értető volt az az ambíciónk, hogy mi is bekapcsolódjunk ezekbe a kutatásokba.

Munkánk alapgondolata az volt, hogy a gímszarvas agancs fejlődésének vizsgálatával feltárjuk a robosztus csontfejlődés genetikai hátterét. A folyamat az egyik legerőteljesebb szövetgyarapodás, amelyet az élővilágban ismerünk, még a malignus tumorok növekedését is túlszárnyalja. Ugyanakkor az oszteoszarkómát idéző, un. parókás-tumoros agancsból sem tapasztaltak áttéteket, ami az intenzív növekedés hatékony ellenőrzöttségére és szabályozottságára utal. Ezt támasztja alá az évenként újrafejlődő agancs formájának, ágrendszerének nagyfokú állandósága is. Az agancsfejlődés mögött megbújó molekuláris biológiai folyamatok megismerése közelebb vihet a csontfejlődés, különböző csontbetegségek (pl.: oszteoporózis, osteogenesis imperfecta) megértéséhez. A robosztus növekedés szabályozásának ismerete felhasználható a tumor és a szervregeneráció kutatásában.

Az agancs különböző szöveteinek és a magzati növekedési porclemez génexpressziós mintázatát hasonlítottuk össze, célul tűzve ki:

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

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A gímszarvas

A gímszarvas (*Cervus elaphus*) a szarvasfélék (*Cervidae*) családjába tartozó páros ujjú patás állat. Holoartikus faj, Európában a létszámát tekintve a nyugati állományok jelentősebbek, a minőséget azonban a közép-európai állományok képviselik, hazánkkal az élen. A magyar, elsősorban dél-dunántúli állomány kiválósága a gímszarvas számára optimális élőhely meglétének és a tudatos vadgazdálkodásnak köszönhető.

A gímszarvas testhossza 165-250 cm, farok hossza 12-14 cm, marmagassága 100-150 cm, tömege 100-350 kg. A szarvastehén negyedével, harmadával könnyebb, mint a bika. Eltekintve a borjak pettyezettségétől, a gímszarvas egyszínű: nyáron rozsdabarna, télen szürkésbarna. Testalkatuk erőteljes, hosszú lábaik és kecses csülkeik miatt mégis könnyednek látszanak (1. ábra).



1.ábra: Gímszarvasok (*Cervus elaphus*) (Pannon Lovasakadémia szarvasfarmja, Bőszénfa)

A gímszarvasok tisztásokkal és rétekkel tarkított lombos- és elegyes erdőket kedvelik, a legjobb életteret a folyók árterei biztosítják számukra. Elsősorban lágyszárú növényeket legelnek, azonban tavasszal szívesen csipegetnek rügyeket, ősszel pedig a makkterméssel egészítik ki étrendjüket, hogy vastag szalonna réteget fejleszthessenek télre. A gímszarvasok ún. rudlikban élnek, amelyek – a bőgési időszakot leszámítva – csak tehenekből és borjaikból vagy csak bikákból állnak.

Szaporodási időszakuk, a szarvasbőgés ideje szeptember-októberre esik. A borjak a következő év május-júniusi időszakában jönnek a világra. A tehenek általában csak egy borjút ellenek, amely a következő ellésig marad az anyával.

2.1.1. A gímszarvas genetikája

A gímszarvas és a milu vagy Dávid-atya szarvas (*Elaphurus davidianus*) keresztezése új fejezetet nyitott az interspecifikus keresztezések és a kérődzők géntérképezésének történetében. E két faj a genetikai divergencia magas fokát mutatja, hasonlóan a *Mus spretus* és *M. musculus* fajokhoz (Bonhomme *et al.*, 1984). A két szarvas faj mind megjelenésükben (az agancs, a láb és a farok morfológiája), mind biológiájukban (szezonalitás, betegségek elleni rezisztencia, viselkedés) jelentősen eltérnek egymástól, azonban kromoszóma számuk megegyezik (2n=68) és kariotípusuk is rendkívül hasonló (Wang, 1988). A két faj hibridjei fertilisek, méghozzá - a Haldane fajhibridekre vonatkozó szabállyal ellentétben - a hímek. Ez rendkívül előnyös a géntérképezéshez szükséges nagy egyedszámú F₂ backcross populáció létrehozásánál, amit tovább könnyít a mesterséges megtermékenyítés sikeres alkalmazása.

A szarvasfélék esetén hiányzott az előzetes genetikai térkép, de sikeresen alkalmazhatóak voltak az evolúciósan konzervált lókuszok, az ún. I-es típusú markerek a kapcsoltsági csoportok meghatározásánál (Tate *et al.*, 1995). További térképpontok azonosítására felhasználtak szarvasmarha és birka mikroszatelliteket, amelyek a II-es típusú markerek közé tartoznak (Slate *et al.*, 2002). Ezek alapján 33 autoszómális kapcsoltsági csoportot alkottak. Az így kapott 2532 cM hosszú szarvas kapcsoltsági térkép ugyan rövidebb, mint a szarvasmarha (3532 cM Barendse *et al.*, 1994) vagy a birka (3063 cM de Gortari *et al.*, 1998) géntérképe. Ennek okai lehetnek a szarvas genom térkép hiányai illetve, hogy az interspecifikus hibridekben a rekombinációs ráta alacsonyabb. Mindazonáltal a szarvas interspecifikus géntérkép alkalmas a haszonállatok összehasonlító géntérképezés révén gazdaságilag fontos génekre lehet következtetni, illetve a módszer a másik irányba is járható: a gímszarvastól más fajok felé.

2.2. Az agancs-ciklus

A szarvasfélék hímjének jellegzetes másodlagos nemi jelleget tükröző képződménye az agancs, amely a homlokcsont két csapjából, a rózsatőből minden évben kifejlődő csontos szerv. A bikák által viselt ágas-bogas agancs megjelenése megfelel az állat korának és még inkább kondíciójának. Az első évben csak egy-egy szár fejlődik (nyársak), a következő évben azonban már a közbeeső fokozatokat (villásak) átugorva, akár hatos agancs is fejlődhet (2. ábra).



2. ábra: A gímszarvas agancsának évenkénti fejlődése (Brehm: Az állatok világa után)

A legjobb éveiben és ereje teljében lévő bika sokágú, erős agancsot fejleszt. Az öreg bikák fejdísze akár huszonnégyes, kivételesen még ennél is többágú lehet. A legfelső ágak alkotják az ún. koronát.

Az agancs messziről megmutatja viselője erejét, dominanciáját, méretei és az állat kondíciója között szoros összefüggés van. Amikor a szarvasbika túljutott élete delelőjén, agancsa is leszálló ágba kerül, ahogy a vadászok mondják: "a bika visszarak".

2.2.1. Az agancs-ciklus hormonális szabályozása

A minden évben újra kifejlődő agancs egyedülálló példája egy teljes szerv tökéletes regenerációjának az emlősök körében (Chapman, 1975, Goss, 1983).

Az agancs évenkénti regenerálódása, az agancs-ciklus szorosan kapcsolódik a világosság és a sötétség óráinak változásaihoz. A mérsékelt égövi szarvasok késő tavasszal-kora nyáron fejlesztik koronájukat. Ez alól az őz (*Capreolus capreolus*) képez kivételt a téli agancsnövekedésével (Bubenik, 1990).

Irodalmi áttekintés

A tél végének közeledtével, mikor a nappalok egyre hosszabbak lesznek, a szarvasbika lehullatja előző évi fejdíszét. Néhány nappal ezután már meg is indul az új agancs képződése, amely mintegy 120 nap alatt éri el teljes kifejlettségét. Ez a folyamat rendkívül intenzív szövetgyarapodás és –differenciáció mellett játszódik le. Eme robosztus növekedés a napi 1 cm-es sebességet is elérheti. Az agancs a nyár folyamán elcsontosodik, majd az agancsot borító bőr, a barka elhal (3.ábra).



3. ábra: Az agancs-ciklus (adaptálva: Borsy et al., 2008)

A nappalok hossza a tobozmirigyben termelődő melatonin mennyiségén keresztül képes szabályozni az életfolyamatokat. A melatonin a hipotalamusz-hipofízis-ivarmirigy útvonalon keresztül nemcsak az agancs-ciklusra, de a szaporodási és egyéb szezonális életfolyamatokra (pl.: szőrváltás) is hatással van. A fényt a retina sejtjei érzékelik, innen továbbítódik a jel a tobozmirigybe, ahol kémiai szignállá alakul a melatonin termelésére gyakorolt hatása révén. A melatonin szintje a vérben nappal alacsony, éjszaka megnövekszik (Reiter, 1991). Minél hosszabbak az éjszakák, annál több melatonin kerül a vérbe, így a szintje óraként és naptárként is "szolgál". A tobozmirigy eltávolítása nem szünteti meg teljesen az életfolyamatokban megfigyelhető szenzonalitást, azonban az évszakok során megfigyelhető különböző hormonok

szintjeinek változásait összezavarja (Brown *et al.*, 1978). Ilyen hormon például a prolaktin (PRL), amely a melatoninnal épp ellenkező mintázatot mutat. Tavasszal a melatonin koncentrációjának csökkenését a PRL emelkedése követi, amely júniusban éri el maximumát. A prolaktin hatása a sárgatest serkentő hormonon (luteinizáló hormon, LH) keresztül érvényesül, amely a testis Leydigféle sejtjeinek tesztoszteron (T) szekrécióját stimulálja. A magas prolaktin koncentráció blokkolja az LH receptorokat a Leydig-féle sejteken, ezért a nyár folyamán bekövetkező gyors LH-szint emelkedést a tesztoszteron koncentrációjának növekedése csak pár hónap késéssel követi (4. ábra).



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

A tesztoszteron az agancs-ciklus szabályozásának egyik kulcseleme. Az agancs növekedése alacsony tesztoszteron szint mellett indul el tavasszal. Ebben az időszakban a vérben lévő kevés tesztoszteron elsősorban a mellékveséből származik. A nemi hormon késő nyáron-kora ősszel megfigyelhető gyors emelkedése a herében meginduló tesztoszteron termelésre vezethető vissza (az LH késletett hatása, 4. ábra). Ekkor indul meg a spermiogenezis is, illetve ekkor kezdődik meg az agancs mineralizációja (Bubenik, 1990). Tesztoszteron hiányában (pl. kasztrálást követően) az agancs nem csontosodik el, hanem daganatszerű szövetszaporulatként, ún, parókás agancsként állandósul.

A magas tesztoszteron koncentrációnak esszenciális szerepe van az agancs mineralizációjában, ugyanakkor a tavaszi alacsony tesztoszteron szint serkentőleg hat az agancs növekedésére (Bartŏs *et al.*, 2000), mivel gátló hatása van a sejtproliferációra. Ezért lehetséges, hogy a tesztoszteron a regeneráció egyik természetes inhibitora (Price és Allen, 2004).

A tesztoszteron különböző szervekben, szövetekben (herék, mellékvese, zsírszövet, fejlődő agancs – Bubenik *et al.*, 2005) női nemi hormonná, ösztrögénné alakulhat. Az ösztrögén hasonló szerepet tölthet be az agancsfejlődésben, mint a tesztoszteron, mi több az agancs elcsontosodásában 50-szer hatásosabbnak bizonyult (Morris és Bubenik, 1982). Ugyanakkor az ösztrögén receptorai nem találhatóak meg az agancs csontszövetében, bár a porc- és csonthártyában, valamint a porcban kimutathatóak (Lewis és Barrell, 1994).

Végső soron elmondható, hogy a szaporodási ciklussal szorosan összefüggő agancs-ciklusban mind a tesztoszteron, mind az ösztrögén fontos szerepet játszik.

2.3. Az agancs fejlődése

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

2.3.1. A vázcsontozat kialakulása

A csontszövet fejlődéstani szempontból mezodermális eredetű és általában másodlagosan keletkezik, vagyis egy már meglévő szövet átépülése révén. Emellett ritkán – megfelelő feltételek mellett – közvetlenül is kialakulhat csontszövet. Ebben az esetben nincs előzetes alapszövet, a folyamat a kisebb erek burjánzásával kezdődik. Az ereket övező sejtek, miközben csontsejtté (osteocyta) differenciálódnak, csontállományt termelnek. A csontosodásnak ezt a formáját nevezik elsődleges csontosodásnak, amelyet először Krompecher István figyelt meg a koponyacsont varratok tájékán. Az elsődleges csontosodás feltételei a keskeny csonthézag és a tartós nyugalom, amelyek pontosan összeillesztett törött csontvégek esetén is megvalósulhat, és így a tört végek szinte észrevehetetlen csontheggel gyógyulhatnak (Szentágothai és Réthelyi, 1985).

A másodlagos csontosodás esetén a csontok kialakulása a differenciáltatlan mezenchima sejtek tömörülésével kezdődik a leendő vázelem helyén. Ezek az un. mezenchimális kondenzációk a csontok alakjának megfelelően formálódnak, és két úton fejlődhetnek csonttá. Az un. intramembrális vagy desmális csontosodás során a mezenchima sejtek közvetlenül osteoblastokká

(csontképző sejtekké) differenciálódnak. Így alakulnak ki az agy- és arckoponya csontjainak nagy része és a kulcscsont középrésze. A csontfejlődés a kondenzáción belül az un. csontosodási magban (punctum ossificationis) indul meg és fokozatosan terjeszkedik (Szentágothai és Réthelyi, 1985).

A többi csont endochondrális csontosodással jön létre. Ez a folyamat két fő szakaszra bontható: a chondro- és az osteogenezisre. A mezenchimális kondenzáció sejtjei porcsejtekké differenciálódnak, létrehozva a leendő csont porcos előtelepét. A végső stádiumban a porcsejtek hipertrófizálódnak: osztódásuk megáll, megduzzadnak, majd zsugorodnak és elpusztulnak (Karsenty, 2001). Eközben az extracelluláris mátrix fokozatosan kalcifikálódik, majd a periféria felől vérerek törnek be, amelyek osteoblast-progenitorokat szállítanak. A progenitor sejtek a porcgerendákra tapadva differenciálódnak és megkezdik a csontra jellemző mátrix termelését.

A csontszövet fokozatos kiterjedésével a porcsejtek egy keskeny zónába, az un. növekedési vagy epifízis porclemezre korlátozódnak. Ez biztosítja a csontok hosszanti növekedését. A növekedési porclemezben a porcsejtek négy zónára oszlanak: a nyugalmi, az osztódó, a prehipertróf és a hipertróf porcsejtekére (5. ábra).



5. ábra: A növekedési porclemez (forrás: JayDoc HistoWeb, University of Kansas Medical Center)

Az ötödik régiót, a csontosodási zónát a vérerek betörése és az osteoblastok megjelenése jelzi. Miután az osteoblast körbeveszi magát csontmátrixszal, lacunát alakít ki magának canaliculusokkal, és csontsejtté alakul. Az osteocyták mechano- és kemoreceptorként viselkednek, a csont mechanikai, biokémiai ingerekre adott válaszreakcióit szabályozzák.

A növekedési porclemez egyes régiói a porcsejtek morfológiája és a specifikus molekuláris markerek alapján jól megkülönböztethetőek egymástól (Mundlos, 1994). A nyugalmi zónában a sejtek kicsik és kerekdedek. A proliferációs régióban a porcsejtek intenzíven osztódnak, az ellapult sejtek jellegzetes kukoricaszemekre emlékeztető oszlopokat hoznak létre. Mind a nyugalmi fázisban lévő, mind a proliferálódó porcsejtek termelik a $\alpha 1$ (II) típusú kollagént. A prehipertróf chondrocyták is expresszálják a $\alpha 1$ (II) típusú kollagént, de alacsonyabb szintén. Végül a hipertróf porcsejtek a $\alpha 1$ (X) típusú kollagént termelik.

2.3.2. Az endochondrális csontosodás molekuláris mechanizmusa

A növekedési porclemezben a porcsejtek egy finoman összehangolt és pontosan ellenőrzött folyamaton mennek keresztül, amely magába foglalja a sejtosztódást, -érést és –halált (6. ábra).



 6. ábra: Az endochondrális csontosodásban szerepet játszó fontosabb fehérjék (adaptálva: Provot és Schipani, 2005)

A korai porcképződés mester regulátorai: Sox fehérjék

A porcképződés nélkülözhetetlen szabályozói a Sox fehérjék: a Sox9, Sox5 és a Sox6, amelyek HMG (high-mobility-group) DNS-kötő domént tartalmazó transzkripciós faktorok. A Sox9 a csontfejlődés legkorábbi szakaszában megjelenik: alapvetően szükséges a mezenchimális kondenzációhoz, így a skeletogenesis iniciálásához és a porcsejt-differenciációhoz (Akiyama *et al.*, 2002). A porcmátrix kialakításában fontos szerepet játszó géneket, mint például: az *aggrekán, matrilin-1* vagy a *II , IX és XI típusú kollagén* génjeit a Sox9 képes serkenteni (Sekiya *et al.*, 2000, Rentsendorj *et al.*, 2005, Bridgewater *et al.*, 1998,). Bell és mtsai. (1997) kimutatták, hogy a Sox9 közvetlenül kötődik a *II típusú kollagén* génjének porcsejt-specifikus cisz eleméhez és képes szabályozni annak expresszióját. Számos kísérlet igazolta, hogy a Sox9 pozitívan szabályozza a proliferációt és negatívan a porcsejtek hipertrófizálódását. A Sox9-et az osztódó és a prehipertróf porcsejtek is expresszálják (Bi *et al.*, 1999).

A Sox9 mellett a Sox5 és a Sox6 is nélkülözhetetlen a porcsejtek fejlődéséhez. Bár az egyedi Sox5^{-/-} vagy Sox6^{-/-} genotípusú egerek csak minimális porc defektust mutattak, a dupla nullmutáns egereknél súlyos porchiány keletkezett a sejtosztódás és a porcmátrix termelésének elégtelensége miatt. Mindkettő fehérje képes indukálni porcsejt differenciációs markerek, mint a αl II kollagén, vagy az aggrekán expresszióját a Sox9-cel együtt, ugyanakkor expressziójukhoz szükséges a Sox9 (Smith *et al.*, 2001).

Az FGF szignál útvonal szerepe az endochondrális csontosodásban

Az FGF (Fibroblast Growth Factor) szignál alapvető szerepet játszik mind az intramembrális, mind az endochondrális csontosodásban. Az FGF-ek családja 23, strukturálisan hasonló fehérjéket kódoló génből áll, amelyek hasonló biokémiai és funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek. A négy FGF receptor (FGFR1-4) tirozin-kináz molekula, amely képes kötni és aktiválódni a legtöbb FGF által. Egyedi ligand-kötő képességük alternatív mRNS splicing eredménye (Ornitz *et al.*, 1996). Az FGF-ek aktivitását és specializációját heparán-szulfát oligoszacharidok is szabályozzák, ugyanis az FGF, FGFR és a heparin/heparán szulfát trimolekuláris komplexet képez, ahol a heparán lánc szövetspecifikus módosításokkal rendelkezik (Rapraeger, 1995).

Az FGF szignál jelentőségére a vázfejlődésben először az FGFR3 transzmembrán doménjében bekövetkezett pontmutáció világított rá, amely egyértelműen felelőssé tehető az achondroplasiáért, a humán törpeség leggyakoribb formájáért (Rousseau *et al.* 1994). Azóta számos egyéb humán szkeletális diszpláziát hoztak kapcsolatba az FGF receptor 1, 2 vagy 3-mal (Muenke és Schell, 1995; Cohen, 2000; Britto *et al.*, 2001), de a legtöbb információ az FGFR3- ról van.

Az FGFR3-at a proliferálódó porcsejtek termelik és képes kötni az FGF1, 2, 4, 8, 9, és a 18 faktorokat, amelyek a perichondriumban expresszálódnak. Állatkísérletekkel igazolták, hogy negatívan befolyásolja a porcsejtek osztódását. Hatását a Stat1 transzkripciós faktoron keresztül fejti ki. Az *fgfr3* expresszióját a porcsejtek differenciációja és proliferációja indítja be (Sahni *et al.*, 1999). Legvalószínűbb funkcionális ligandja a FGF18, mivel az *fgfr3^{-/-}* és az *fgf18^{-/-}* nullmutáns egér hasonló defektusát mutatja a csontfejlődésnek (Liu *et al.*, 2002).

Az *fgfr1* a végtagkezdemény mezenchimájában expresszálódik, valamint a mezenchimális kondenzáció perifériáján. A végtagfejlődés későbbi szakaszában az *fgfr1*-t a hipertróf porcsejtek termelik. Az *fgfr2* kifejeződik a végtagkezdemény ektodermájában és a mezenchimális kondenzáció magjában, valamint az osteoblastokban. Mind az *fgfr1*, mind az *fgfr2* expresszálódik a perichondriumban is (Delezoide et al., 1998).

Amíg az *fgfr2* és az *fgfr3* expressziója között átfedés van, addig az *fgfr1* és *fgfr3* expressziója elkülöníthető, ami arra utal, hogy funkciójuk nagyban eltér. Az *fgfr3* a porcsejtek proliferációját és esetleg a differenciációjukat szabályozza, az *fgfr1* szignál pedig a differenciációs rátára, az ECM termelésére vagy az apoptózisra lehet hatással (Delezoide et al., 1998). A hipertróf porcsejtek zónájában az FGFR1-hez az FGF9 és FGF18 képes kötődni és ezzel indukálni a vérerek betörését a VEGF (vascular endothelial growth factor) és receptora (VEGFR) expresszióján keresztül (Hung *et al.*, 2007). A VEGF egy angiogenikus faktor, amelyet normál esetben a hipertróf chondrocyták is termelnek.

Az *fgf2*, *fgf5*, *fgf6*, *fgf7* és *fgf10* expresszióját elsősorban a mezenchimában mutatták ki, az *fgf8* pedig az apikális ektodermális redőben (AER) termelődik, azonban ezek hiánya a kísérletek szerint semmilyen defektust nem okozott a vázfejlődésben (Ornitz és Marie, 2002). Valószínű, hogy az FGF-ek sajátos kombinációja szükséges a teljes FGF szignalizációhoz.

A PTHrP/Ihh visszacsatolás

A parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) egy auto/parakrin faktor, amely számos magzati és felnőtt szövetben termelődik. A PTHrP köti és aktiválja a PTH/PTHrP receptort, amelyet értelemszerűen a paratiroid hormon (PTH) is működésbe hoz. A PTH a kalcium/foszfát metabolizmus központi szabályozója, hatását a csontokban és a vesében fejti ki.

A PTH/PTHrP receptor (PPR) alapvető fontosságú mind az ásványi ion homeosztázisban, mind a csontfejlődésben. Számos szövetben kifejeződik, a legmagasabb expressziója a vesében, a porcban és a csontban van.

A PTHrP-t a perichondrium sejtjei és a periartikuláris régió proliferálódó porcsejtei termelik, a *PTH/PTHrP* receptor mRNS-t a prehipertróf sejtek expresszálják, bár alacsonyabb expresszió az oszlopokba rendeződött osztódó porcsejteknél is kimutatható (Vortkamp *et al.*, 1996). Az aktivált

PTH/PTHrP receptorok gátolják a porcsejtek érését, hipertróf porcsejtekké való differenciálódását, ezáltal késleltetik a csont kialakulását.(Lanske *et al.* 1996). A PTHrP emellett képes stimulálni a sejtosztódást *in vitro* kísérletekben, mégpedig a CREB (cAMP response element-bindig protein) foszforilálásán keresztül. A CREB ezután aktiválja a sejtciklus szabályozásában résztvevő ciklin D1-et (Beier *et al.*, 2001, Ionescu *et al.*, 2001).

A PTHrP hatását támogatja az Indian hedgehog (Ihh), amely az endochondrális csontfejlődés egyik központi irányítója. Az Ihh-t a prehipertróf porcsejtek expresszálják és a perichondrium sejtjeire hat, ahol fokozza a PTHrP szintézisét (St-Jacques *et al.*, 1999). Végső soron az Ihh gátolja a porcsejtek hipertrófizálását és késlelteti a porcmátrix mineralizálódását.

Az Ihh és PTHrP között egy negatív visszacsatolás jön létre (7. ábra), hiszen az Ihh hatására megnövekvő PTHrP gátolja a pre- és hipertróf porcsejtek kialakulását, így végül is az Ihh expresszióját. A PTHrP/Ihh szabályozó mechanizmus meghatározza a proliferálódó és a hipertrófizálódó porcsejtek arányát, biztosítva, hogy a fejlődő csont elérhesse megfelelő nagyságát.

Az PTHrP/Ihh útvonallal az FGF és a BMP szignalizációs útvonalak is kölcsönhatnak (7. ábra).



7. ábra: A PTHrP, az IHH, a BMP-k, FGF-ek és a Runx2 kölcsönhatásai (adoptálva: Provot és Schipani, 2005)

Az FGF szignál gátolja az Ihh expresszióját, azonban ez a hatása a porcsejtek proliferációjára gyakorolt hatásától függetlennek tűnik (Minina *et al.*, 2002).

A BMP (Bone Morphogenetic Protein) fehérjék a porcsejtek osztódására és érésére vannak befolyással, valamint a csontgallér kialakulására. Ez utóbbinál az Ihh is elengedhetetlen, hatását a BMP-k közvetítik (Long *et al.*, 2004).

A BMP-k alapvetőek a legkülönbözőbb fejlődési folyamatokban. Szerepük van a mezenchimális kondenzációban is. A fejlődő csöves csontokban a perichondriumban expresszálódnak (elsősorban a BMP2, 3, 4, 5 és a 7), valamint a hipertróf porcsejtekben is megtalálható mRNS-ük (BMP2-nek és 6-nak) (Minina et al., 2001).

A Runx2 szerepe a porcsejtek differenciálódásában

A porcsejtek terminális differenciációjában a Runx2 transzkripciós faktor a kulcsszabályozó molekula. A Runx2 (egyéb elnevezések: Cbfa1, Ost1, AML3 stb.) a Runt transzkripciós faktor családhoz tartozik (Ogawa *et al.*, 1993), és az osteoblast differenciációhoz elengedhetetlen faktorként azonosították. A *Runx2*-deficiens egerekben ugyanis nincs csontképződés, ugyanakkor *in vitro* a *Runx2* túltermeltetése osteoblast-specifikus gének (pl.: *osteocalcin, bone sialoprotein, alkalikus foszfatáz*) expresszióját eredményezi, *in vivo* pedig ektopikus csontképződéshez vezet (Ducy *et al.*, 1997, Komori *et al.*, 1997).

A *Runx2* az egér csontváz fejlődésének legelején, a 10,5-12,5 napos embrióban, minden mezenchimális kondezációban expresszálódik. A Runx2-t termelő mezenchimális sejtek az osteoblastok és a porcsejtek közös progenitorai. A fejlődés további szakaszában, az embrionális élet 14,5 napjától a születésig, a *Runx2* expressziója az osteoblast vonalban fokozódik, a prehipertróf porcsejtekben pedig csökken és a születéssel meg is szűnik (Takeda *et al.*, 2001). A növekedési porclemezben a Runx2-t a porcsejtek termelik, és termelődése elindítja a porcsejtek hipertrófizlódását (Kim *et al.*, 1999). A Runx2 túltermeltetése transzgénikus egerekben a porcsejtek korai éréséhez vezetett a X-es típusú kollagén, valamint más hipertróf porcsejtekre jellemző markerek expressziója miatt (Takeda *et al.*, 2001).

A *Runx2*-deficiens egerekben a porcsejtek terminális differenciációja késést szenved, azonban nem hiányzik teljesen. Ez a megfigyelés vezetett annak felismeréséhez, hogy egyéb faktorok is szükségesek a hipertróf porcsejtek megjelenéséhez. A Runx2 a Runx3-mal együtt indukálja a hipertrófizálódást (Yoshida *et al.*, 2002). Szintén e folyamat pozitív szabályozójaként azonosították a CBF β -t (core-binding factor β), amelynek hiánya a *Runx2*-decifiens egerekhez hasonló fenotípust eredményez. CBF β egy ko-transzkripciós faktor, amely a Runx proteinekkel heterodimert képez. A Runx2-vel való kölcsönhatása szükséges a Runx2 DNS-kötéséhez és transzkripciós aktivitásához (Kundu *et al.*, 2002, Yoshida *et al*, 2004).

A porcsejtek terminális differenciációra kifejtett hatását a Runx2 – részben – az Ihh expressziójának fokozásával éri el. Az Ihh expressziója pozitívan befolyásolja a PTHrP szintjét, ami egy visszacsatolást hoz létre az osztódó porcsejtek felé (7. ábra).

Ettől a folyamattól függetlenül a Runx2 szerepet játszik a hipertrófizálódás másik jelenségében is, a vérerek betörésében. A *Runx2*-deficiens egerekben a vázelemek nem vaszkularizáltak. *In vitro* kísérletekkel igazolták, hogy a Runx2 képes aktiválni (Zelzer *et al.*, 2001) a VEGF (vascular endothelial growth factor) promoterét.

2.3.3. A rózsatő és az első agancs kialakulása

Az agancs nem közvetlenül a koponya csontjából alakul ki, hanem a homlokcsont állandó képződményéből, a rózsatőből, amely a pubertás korban a tesztoszteron hatására indul fejlődésnek (Lincoln, 1973) – és ezáltal egyetlen példája egy szerv késleltetett fejlődésének (Price *et al.* 2005). Az agancs és a rózsatő bőrből és csontból, valamint vérerekből, idegekből és némi kötőszövetből épül fel.

Mind a rózsatő, mind a belőle évenként regenerálódó agancs a homlokcsont csonthártyájának ún. agancsképző csonthártya (AP= antlerogenic periosteum) régiójára vezethető vissza. Az AP eredete még nem teljesen tisztázott. Mivel a homlokcsontot a kraniális velőlemezből származó sejtek alakítják ki (Jiang *et al.*, 2002), ezért feltételezhető, hogy az agancs és a rózsatő is velőlemez eredetű (Price és Allen, 2004). Az AP-t postnatálisan megmaradt embrionális szövetnek vélik szembeszökő differenciálódási képessége miatt (Li és Suttie, 2001). Magzati korban még mindkét nemen megtalálható, azonban az androgén stimulus elmaradása miatt szarvasteheneknél inaktív marad (kivételt ezalól a rénszarvas (*Rangifer tarandus*) képez, ahol a tehenek is viselnek agancsot, és a borjak néhány héttel a születésük után megkezdik az agancsfejlesztést – Putman, 1989).

Az agancsképző periosteum – más csonthártyákhoz hasonlóan – két rétegből áll: a külső fibrózus és a belső sejtes rétegből. Mindkét réteg sokkal vastagabb, mint a szomszédos csonthártya rétegei. Agancs- és rózsatőképző tulajdonságát transzplatánciós kísérletekkel bizonyították: az AP sejtek átültetése agancsfejlődést indukált, akár a homlokcsont más területéről, akár a mellső láb bőralatti részéről legyen szó (Hartwig, 1967, Goss és Powel, 1985). Az AP xenograft transzplantációja (immun-deficiens egér koponyájára) egy csontos kinövést eredményezett. (Li és Suttie, 2001). Az AP-t borító epidermis eltávolítása ugyanakkor semmilyen defektust nem okoz, a seb begyógyulása után a fejlődés megindult.

A rózsatő kialakulásakor az AP agancsképző sejtei osztódnak és osteoblasttá differenciálódnak frontolaterális nyúlványt képezve desmális csontosodással. E szövet okozta mechanikai nyomás interakciót eredményez a fölötte elhelyezkedő bőrrel, aminek következtében a csontosodási folyamat megváltozik: ún. átmeneti csontosodással csontos-porcos szövet képződik.

Végül a rózsatő fejlődése módosult endochondrális csontosodással fejeződik be, vérerekben gazdag porc jelenik meg, amely később elcsontosodik (8. ábra)(Li és Suttie, 1994).



8. ábra: A rózsatő kialakulásának sematikus rajza (adaptálva: Li és Suttie, 2000) IMO: intramembrális csontosodás, OPC: átmeneti csontosodás, pECO: a rózsatő endochondrális csontosodása, aECO: az agancs endochondrális csontosodása. Érdekes, hogy a rózsatő kialakulásakor a külső (bőr) és a belső (csontos-porcos szövet) fejlődése nincs teljes szinkronban. A rózsatőt borító bőr ugyanis a késői pECO fázisban, a rózsatő kb. 4 cm-es hosszánál alakul át az agancsot fedő barkává, míg a belső rész a rózsatő teljes hosszának (kb. 5 cm) elérésekor formálódik át.

Miután a rózsatő eléri fajspecifikus hosszát (ez a gímszarvas esetében 5-6 cm), az első agancs növekedése spontán megindul a rózsatő distális részéből. Az első agancs kialakulását még nem tekinthetjük regeneratív eseménynek. Az első évben létrejövő nem elágazó, ún. nyársas agancsot a következő években egyre nagyobb és morfológiailag komplexebb agancsok követik. Ezekben az esetekben már "hipermorfotikus regenerációról" beszélhetünk. A bikák tél végén, tavasz elején hullatják el az agancsukat. Ez az agancs és a rózsatő határán bekövetkező osteoclast eredetű csontfelszívódás eredménye. A rózsatőn keletkezett seben néhány óra múlva heg keletkezik és megkezdődik a regeneráció. A kialakuló blasztéma sejtei valószínűleg a rózsatő csonthártyájának stem sejteiből származnak, mivel a csonthártyák általában tartalmaznak multipotens stem sejteket, ráadásul a periosteum megduzzad az agancs elhullatása után nem sokkal a rózsatő distális részén (Kierdorf *et al.*, 2003).

Az agancs robosztus fejlődése roppant nagy terhet ró az állat ásványi anyag háztartására. Egyrészt az agancs elcsontosodásához szükséges kalcium- és foszfátionok nem fedezhetőek a felvett táplálékból, ezért a bika vázcsontozatában oszteoporózis alakul ki (Chapman, 1975, Bubenik, 1983). Másrészt az agancs elhullatásakor a reszorpció minimális nagyságú, ennélfogva a szarvasbikának minden évben pótolnia kell ezt az ásványi és élő anyag mennyiséget.

2.3.4. A fejlődő agancs felépítése

Az agancs növekedése a csúcsból indul. Ebben a régióban több szövettípus van jelen, amelyek alapvetően két nagy csoportot alkotnak: a belső csontos-porcos állományt és a külső bőrt, a barkát (9. ábra)(Banks és Newbrey, 1983).



9. ábra: A fejlődő agancs felépítése. Sematikus hosszmetszet (adaptálva: Banks és Newbrey, 1983).

A növekvő agancsot a vérerekben és idegekben gazdag barka burkolja, amely a külső, szőrszálakban gazdag epidermisre és a belső rostokban gazdag dermisre osztható. Bár a dermis alsó régiója fokozatosan megy át a csúcsi részen a perichondrium, a lentebbi régiókban a periosteum fibrózus rétegébe, könnyen leválasztható az alatta húzódó mezenchimáról (Li *et al.*, 2005).

A perichondrium és a periosteum között az átmenet folytonos. A periosteum belső, sejtes rétege számos osteogenikus sejtet tartalmaz, amelyek bizosítják az agancs "hízását". Ezek a differenciálatlan mezenchima sejtekből közvetlenül alakulnak ki osteoblastok (Banks és Newbrey, 1983). Ehhez hasonló, ún rárakódásos vagy periostális csontosodás biztosítja a testi csontok vastagodását.

A növekedési porclemezzel párhuzamba állítva a fejlődő agancsban a proliferációs zónát a csúcsi mezenchima, a prechondroblastok és chondroblastok által alkotott régióként azonosíthatjuk. Ez a réteg sapkaszerűen borítja az agancságak distális részét. Külső része a mezenchima, a mitótikus aktivitás itt a legnagyobb, valamint az apoptótikus sejtek aránya is (Banks és Newbrey,1983). Ez a két jelenség szorosan összefügg, a gyors sejtosztódás mutagenezist eredményezhet, amely ellen védelmet jelent az apoptózis. Hasonló jelenséget a kétéltűek végtag-regenerációnál is leírtak (Brockes, 1998).

Az agancs mezenchima szöveti régiója számos véreret tartalmaz, amelyek az agancs hossztengelyével párhuzamosan futnak. A prechondroblastokba, chondroblastokba való átmenet fokozatos, aminek következtében egy meglehetősen heterogén szövetréteg alakul ki (Banks és Newbrey, 1983). Az egyes sejtek eltérő differenciálódási stádiumban találhatóak, de általánosságban a kevésbé differenciált sejtektől a differenciált sejtek felé mutató irány distoproxális. A differenciálatlan mezenchima sejtekre jellemző, hogy az osteoblast- és fibroblast sejtvonalakra jellemző I típusú kollagént termelik, bár alacsonyabb szinten, ugyanakkor az előbb említett két sejtvonalra szintén jellemző alkalikus-foszfatázt nem (Price et al., 1996). Megjegyzendő, hogy ezek a mezenchimális sejtek nemcsak chondro-, hanem osteogenikus képességekkel is rendelkezhetnek, amit alátámaszt az a tény is, hogy erőteljesen expresszálják az osterixet, hasonlóan az oldalsó mezenchimához, amely biztosan rendelkezik ilyen képességekkel (Gyurján et al., 2007, Gyurján, 2007). A pre- és chondroblastokra nagy kiválasztási aktivitás jellemző, mivel megkezdik az egyre növekvő tömegű, porcra jellemző extracelluláris mátrix termelését, többek között a IIA, IIB és X típusú kollagént (Price et al., 1996), valamint a Link-proteint és a Matrilin 2 és 4-fehérjét. (Korpos et al., 2005). A vaszkuláris és perivaszkuláris tér egyre növekszik, ahogy az agancsalap felé haladunk. A vérerek által megosztott differenciálódó porctömeg előbb helikális mintázat szerint rendeződik, majd hosszanti irányba trabekulákat alkot, némiképp emlékeztetve a növekedési porclemez osztódó régiójának oszlopaira.

A porcos zónába való átmenet rendkívül fokozatos, a határokat az extracelluláris mátrixban bekövetkezett változások jelzik (Li *et al.*, 2005), többek között a Matrilin-3 megjelenése az extracelluláris mátrixban (Korpos *et al.*, 2005). A zóna trabekulái heterogén sejtpopulációból épülnek fel. Ezek a sejtek a fejlődés különböző stádiumában tartanak, proximális irányban egyre több érett porcsejt jelenik meg. Az érett porcsejtek a trabekulák közepén helyezkednek el, míg a periférián fiatal porcsejtek és porcképzősejtek vannak. A különböző fejlődési stádiumban lévő sejtek elhelyezkedése bizonyítja, hogy a chondrogenesis nemcsak longitudinálisan, hanem latitudinálisan is végbe megy.

Az agancsporcban a vérerek nagyok, a perivaszkuláris tér kiterjedt, szemben a test többi részén található porccal (beleértve az endochondrális csontosodásnál formálódót is), amelyek normális esetben nem tartalmaznak vérereket. Másik jelentős különbség, hogy az agancsporc mineralizálódása. A kalcium és más ásványi anyagok berakódása elkülönülő gócpontokban kezdődik el az extracelluláris mátrixban, majd a kalcifikáció növekedésével a gócpontok összeolvadnak és létrejön a kalcifikált porcszövet (Banks és Newbrey, 1983).

Az agancs fejlődésénél, a növekedési porclemezzel ellentétben, nem figyelhető meg határozott hipertróf zóna. A hipertróf porcsejtek a trabekulák közepén jelennek. A hipertróf porcsejtek megjelenése mellett a mineralizált porcszövettől az agancstő irányába haladva chondroclasia és osteogenesis aktivitást lehet kimutatni (Banks és Newbrey, 1983). A porctrabekulák szabálytalan alakú, anasztómikus oszlopokká válnak. A sejtek csillag vagy hosszúkás alakot öltenek, vagy mintegy kiesnek lacunáikból. A sejtekben gyakran megfigyelhető vakoulák. A perivaszkuláris térben számos orsó és csillag-alakú sejt látható a kötőszövetben, így elmosódott lesz a határ a porcoszlopok és a vérerek között (Li *et al.*, 2005).

A porctrabekulák felszíne szabálytalanná, törötté válik a chondroclastok számának megnövekedésével arányban. Sok porcfaló sejt egyesével láthatóak az oszlopok felszínén, néha azonban kettő vagy több sejtből áll csoportokban. Megjelennek a Howship's vagy reszorpciós lakunák is, amelyek a chondroclastok mátrix leépítő munkájának eredményei. Ugyanakkor az oszlopok mélyén még chondroblast sejtek mutathatóak ki (Banks és Newbrey, 1983).

A kalcifikált porcoszlopok felszínére, az oszlopok degradálódásával párhuzamosan, csont rakódik. A csontot a porcfelszínt beborító osteoblastok- és cyták termelik. Az osteogenesis alatt is folytatódik a chondroclasia, míg a porc át nem adja helyét teljesen az újonnan formálódó tömött csontszövetnek (Li *et al.*, 2005). Ezt a csontszövetet felváltja a szivacsos csontállomány, míg a periférián a csontállomány közvetlenül a periosteum csontképzősejteiből formálódik. Ez a rárakódásos csontosodás eredményezi az agancsszár és –ágak vastagodását.

2.3.5. Az agancsfejlődés molekuláris biológiai háttere

Az embrionális vázfejlődés és az alacsonyabbrendű gerincesek regenerációs képességének vizsgálataiból egyre világosabbá válik, hogy ezek a folyamatok meglehetősen konzerválódtak az evolúció során, ezért feltételezhető, hogy az ismétlődő agancsciklusok során is hasonló folyamatok játszódnak le. A vizsgálatok kiindulási pontjai ezért legtöbbször a csontfejlődésben szerepet játszó faktorok, amelyek száma rohamosan nő. Az *in vivo* kísérletek hiányában az mRNS-ek és fehérjék agancson belüli térbeli lokalizációjából igyekeznek következtetéseket levonni.

Mostanában kezdett a figyelem központjába kerülni az új agancs fejlődésének első lépése, az agancshullás jelensége. Bár sok szarvasfajnál az agancs elhullatása és az új növesztése között akár hónapok telhetnek el, a gímszarvasnál az agancshullás és a következő agancs regenerációja egybe esik. Az agancs elhullatása után, órákon belül a seb szinte begyógyul: ráhúzódik az epidermisz szomszédos területről, illetve mezenchimális sejtek vándorolnak oda (Kierdorf *et al.*, 2003).

Az agancs leválása az osteoclastok csontleépítő szerepére vezethető vissza. Az osteoclastok aktiválása finoman és pontosan koordinált folyamat, mivel a csontfalósejtek mátrix bontása csak meghatározott helyen, a rózsatő és az agancs határa mentén játszódhat le, másképp a vázcsontozat legkülönbözőbb helyein következhetne be csonttörés. Ez a helyspecifikus csontfelszívódás ma még kevésbé tisztázott, szabályozásában a RANKL és a PTH vehet részt. Mindkettő receptorait kimutatták a kialakuló blasztéma sejtein (Price és Allen, 2004). A RANKL az osteoclast differenciáció kulcsfaktora, míg a PTH a csontok Ca-tartalmára van hatással. A RANKL szignálra a szexhormonok - így a tesztoszteron is - gátló hatással vannak, tehát amíg magas a tesztoszteron szint az agancs lehullása nem lehetséges.

A másik lehetséges szabályozó molekula a PTHrP, amely szintén elősegíti az osteoclastok képződését. A PTHrP fehérje kimutatható az agancs porcszövetben is a perivaszkuláris térben, ahol a csontfalósejtek differenciálódnak (Faucheux *et al.*, 2001, 2002). Hatása független a RANKL-tól, és sokkal erőteljesebb. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy az agancsban lévő osteoclastok PPR-t termelnek (Faucheux *et al.*, 2002). Emlős csontfalósejtek esetében csak két olyan beszámoló van, amely leírja a PPR expresszióját (Langub *et al.* 2001; Nakashima et al., 2003). Érdekes még az is, hogy az agancs osteoclastokban a PPR elsősorban a sejtmagban helyezkedik el, ami arra utal, hogy közvetlenül képes szabályozni a génexpressziót.

A PTHrP másik funkciója az agancsban a porcsejtek differenciációjának szabályozása, hasonlóan a vázfejlődésben leírt szerepéhez. *In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a PTHrP serkenti a porcsejtek proliferációját és gátolja a differenciálódásukat (Faucheux és Price, 1999). Eloszlása a növekvő agancs csúcsában a chondrogenesis folyamán megegyezik a sejtdifferenciációban játszott

szerepével (Faucheux *et al.*, 2004). Erős expressziót mutattak ki az agancs perichondriumban, mezenchimában, előporcban és a vérereket övező területeken, azonban a differenciált porcsejtekben nem szintetizálódik, ellentétben a növekedési porclemezzel.

A PTHrP és az Ihh közötti kölcsönhatás miatt evidens, hogy az Ihh expressziós mintázatát is vizsgálták az agancsban. Az immunlokalizáció a pre- és hipertróf porcsejtekben mutatta ki az Ihh-t, ami egyértelműen emlékeztet a növekedési porclemezben detektált mintázattal. Az Ihh továbbá kimutatható az agancs osteoblastokban is, azonban a perichondriumban, periosteumban és a mezenchimában nem. Ez arra utal, hogy az Ihh-nak az agancsfejlődés során csak az endochondrális csontosodásban van szerepe (Faucheux *et al.*, 2004).

Az osteoblastok egyébként a PTHrP-t és a receptorát is expresszálják, ami arra enged következtetni, hogy az agancs gyors növekedése alatt a PTHrP nemcsak a porcsejtek, hanem az osteoblastok és osteoclastok esetén is szabályozhatja a sejtdifferenciálódást. Sőt, mivel az agancsképző periosteum és az agancshullás utáni, regenerálódó epitélium is magas szinten expresszálja mind a PTHrP-t, mind a PPR-t, úgy tűnik, az agancsképződés korai fázisaiban is fontos szerepük van. Az agancs progenitor sejtek egyfajta markere is lehet a PTHrP (Faucheux *et al.*, 2002).

Mind a vázfejlődés, mind a kétéltűek regenerációs folyamatainak szabályozásában szerepet játszanak a retinsav (RA) izoformai (Cash *et al.*, 1997,. Koyama *et al.*, 1999). Az agancsfejlődésben betöltött szerepüket Allen és mtsai. (2002) vizsgálták, és úgy találták, hogy alapvető szerepe lehet a sejtdifferenciációban. A RA receptorainak (RAR α , β , γ és RXR α , β , γ) agancsban és egér fejlődő végtagjában mutatott expressziós mintázatát hasonlították össze. A mintázatok bár hasonlóak voltak, azonban néhány lényeges különbség megfigyelhető. A legszembeötlőbb a RAR γ -receptor alacsony expressziója az agancsban. Egér végtag esetén ez a receptor ugyanis magas szinten kifejeződik (Dolle *et al.*, 1989, Koyama *et al.*, 1999). Lehetséges, hogy az agancsban RXR γ -receptor szabályozza a porcsejtek differenciációját, mivel expressziója növekszik az előporcsejtektől az érett porcsejtekig.

További eltérés, hogy a fejlődő végtag-kezdeményekben (Horton és Maden, 1995) és a regenerálódó kétéltű végtagokban *transz*-RA mutatható ki (Scadding és Maden, 1994), míg az agancs perichondriumban, mineralizált porcszövetben és csontban a 9-*cisz*-RA is. Ez az izoforma a fejlődő végtagban nem detektálható, ugyanakkor a kétéltűek regenerálódó végtagjában igen. Ez azt sugallja, hogy a RXR ligandjának speciális szerepe lehet a csont regenerációban.

Számos további molekula jelenlétét bizonyították a fejlődő agancsban (Mundy *et al.*, 2001), így a már korábban leírt BMP2-t (Feng *et al.*, 1997) és BMP4-et (Feng *et al.*, 1995), valamint FGF molekulákat, IGF-I és IGF-II-t. Francis és Suttie (1998) a *TGFβ1*, *TGFβ2*, *c-fos*, *c-myc* és *IGF*-ek mRNS-ét mutatták ki RT-PCR eljárással, valamint szubtraktív technikával a dermatopontint és foszfolipid hydroperoxid glutation peroxidázt (GPX4). Ez utóbbi jelentősége, hogy felnőtt szervezetben nem expresszálódik (Lord *et al.*, 2001).

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

A Wnt-szignál útvonal számos elemét (Msx-1, Msx-2, Runx2, osterix) detektálták az agancsszövetekben. Ennek az útvonalnak a jelentőségét növeli, hogy nemcsak a csont fejlődésében, hanem a csont fiziológiájában is fontos szerepet játszik (Gong *et al.*, 2001, Little *et al.*, 2002). Az Osterix (Ost) egy osteoblast specifikus transzkipciós faktor, amelynek hiányában egyáltalán nem fejlődik csontszövet (Nakashima *et al.*, 2002). A fejlődő agancsban az *osterix* kifejeződik csúcsi és oldalsó mezenchimában és a perivaszkuláris szövet sejtjeiben, ami arra utal, hogy ezek a sejtek elkötelezettek a csontfejlődés irányában (Gyurján, 2007). Ez a jelenség elsősorban a csúcsi mezenchimánál meglepő, amelynek sejtjeiből porcsejtek differenciálódnak. Az oldalsó mezenchima sejtek osteoblasttá való differenciálódása szükséges az agancs megfelelő átmérőjének eléréséhez. Az osterix expressziója a perivaszkuláris tér sejtjeiben azt sugallja, hogy ezek a sejtek képesek osteoblasttá alakulni, ezáltal biztosítani az agancs gyors elcsontosodását.

A vérérképződésért felelős VEGF és receptorának jelenlétét is kimutatták az agancs porcszövetében, azonban a növekedési porclemezzel ellentétben nemcsak a hipertróf porcsejtekben, hanem a barkában is megtalálható, mind a VEGF, mind az egyik receptora VEGFR-2 (Clark *et al.*, 2004, Lai *et al.*, 2007).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Anyagok

3.1.1 Felhasznált baktériumtörzsek és táptalajok

E.coli DH5α	supE44AlacU169 (ø80LacZAM15)
(Hanahan, 1983)	hsdR17 RecA1 gyrA96 thi-1 relA1
E.coli XL1-blue	endA1 gyrA96 hsdR17 lac— recA1 relA1 supE44 thi-1
(Wood <i>et al.</i> , 1985)	[F'lacIqZ DM15 proAB Tn10]
LB tápoldat (1 000 ml-be (pH 7,0)	n): 10g Bacto tripton 5g Bacto élesztő kivonat 10g NaCl
LB agar lemez: 12g ag	ar/1000ml LB tápoldat

LB top agar: 7g agar/1000 ml LB tápoldat

3.1.2. Standard oldatok

10xMAE	500 mM MOPS 100 mM EDTA
20xSSC	3M NaCl 0,3M nátrium-citrát
10xTBE	850 mM Tris bázis 850 mM bórsav 20 mM EDTA
10xlambda puffer:	1M NaCl 0,1M MgSO ₄ ·H ₂ O 0,35M Tris-HCl (pH 7,5)
1xlambda puffer:	10xlambda puffer 1:10 arányú hígítása desztillált vízzel és 0,01% zselatin hozzáadása
Random priming jelölő puffer:	500 mM Tris-HCl (pH 8) 50 mM MgCl ₂ 100 mM DTT dNTP mix (20 mM dCTP, dGTP, dTTP) 2 mM HEPES (pH 6,5)
Hibridizációs puffer (<i>in situ</i>)	50% formamid0 100 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1x Denhard's reagens 500 mM NaCl 10% dextrán-szulfát 0,05% SDS 1 mM EDTA
50x Denhardt's reagens:	1% ficoll

	1% polivinilpirrolidon 2% BSA
Detektáló puffer (<i>in situ</i>):	10% polivinil-alkohol 100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
10xPBS (pH 7,4):	1370 mM NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM KH ₂ PO ₄
10xTBS (pH 7,4):	1370 mM NaCl 27 mM KCl 250 mM Tris bázis

3.2. Mintagyűjtés

A munkánkhoz szükséges mintákat a Pannon Lovasakadémia bőszénfai szarvasfarmja biztosította. A gímszarvasbikák bársonyos-barkás agancsaiból május-június határán vettünk mintákat kísérleteinkhez. A kb. 80 napja fejlődő agancscsúcsok felső, mintegy 5 cm-es darabját távolítottuk el. Az RNS-ek degradációjának lassítása érdekében a mintákat azonnal jégre helyeztük, és a minták további szétdarabolását 30 percen belül elvégeztük. A bársonyos-barkás agancs általunk vizsgált szövettani rétegeinek (mezenchima, előporc és porc) elhelyezkedését Li és mtsai (2002) közlése alapján határoztuk meg. Bár az egyes szöveti zónák szemmel is jól elkülöníthetőek, a különböző zónák minden kétséget kizáró elválasztása érdekében a szövetek között kb. 0,5 cm-es átmeneti réteget hagytunk. Minden szövettípusból mRNS izolálás és szövettani vizsgálatok céljából is vettünk mintákat. Előbbi esetben a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a felhasználásig benne tároltuk. A szövettani vizsgálatokhoz a szétdarabolt agancscsúcsokat 4%-os 1x PBS-ben oldott paraformaldehidben fixáltuk 24 órán keresztül. Ezután a mintákat 70%-os etanolban tároltuk a paraffinba történő beágyazásig.

A szarvasmagzat mintákat december közepétől január közepéig gyűjtöttük a szarvasfarm állományának selejtezése ideje alatt. Kísérleteinkhez a három-négy hónapos szarvasmagzat növekedési porclemezére volt szükségünk. Eltávolítottuk a hosszú csöves csontok végeiről az ízületi porcot, illetve a csont középső területét. A magzati minták tartósítását az agancsmintákhoz hasonlóan végeztük.

Mind az agancs, mind a magzati mintákat több egyedből gyűjtöttük, hogy a lehetséges egyéni eltéréseket kiküszöbölhessük. Kísérleteink során a különböző példányokból származó mintákat keverten használtuk.

3.3. Szövettani vizsgálatok

Metszetkészítés. A 4%-os paraformaldehidben fixált mintákat növekvő töménységű etanol sorozatban dehidratáltuk, majd xilollal kezeltük, végül alacsony olvadáspontú paraffinba (Paraplast, Sigma) ágyaztuk. HM 335 E rotációs mikrotommal 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket (3-aminopropyl) triethoxy-silane –nal kezelt tárgylemezekre rögzítettünk.

A szövettani vizsgálatokhoz minden esetben szükséges volt, hogy a metszeteket deparaffináljuk és rehidratáljuk.

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

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

3.4. mRNS izolálás és cDNS szintézis

Az mRNS izolálását a PolyATtract®System 1000 (Promega) kittel végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált mRNS-t RNáz mentes vízben oldottuk fel, majd 3U DNáz I-gyel kezeltük 37 °C-on 30 percig. Az mRNS-ek minőségét és mennyiségét a minta 260 nm-es és 280 nm-es abszorbancia értékével ellenőriztük.

A cDNS előállításához a SMARTTM cDNA Library Construction Kit-et (Clontech) használtuk a protokoll előírásait követve. 1 µg mRNS-t írtunk át cDNS-sé SuperScript II RnaseHminus reverse transzkriptáz, CDSIII oligo (dT) primer és SMART IV oligo felhasználásával 20 µl térfogatban. A cDNS sokszorosításához ebből a reakcióelegyből használtunk 1 µl-t, valamint 1 µl dNTP mix-et (egyenként 10 mM), 5 µl 10X BD Advantage2 PCR puffert, 10 µM primert (CDS és 5'PCR) 1 µl 50X Advantage polymerase Mix-et és 1 µl (5U) KlenTaq LA DNA Polymerase Mix-et (Sigma). A PCR reakció 50 µl térfogatban történt a következő paraméterek mellett: kezdő denaturáció 94 °C-on 5 percig, majd 25 cikluson keresztül 1 perces denaturáció 94 °C-on és 7 perces lánchosszabbítás 68 °C-on. A PCR terméket elektroforézissel 1%-os agarose gélen ellenőriztük, aztán fenol-kloroformmal tisztítottuk, és etanollal kicsapattuk. Az így előállított dupla-szálú cDNS alkalmas volt mind az AFLP reakciókhoz, mind próbajelölésre, mind a cDNS-könyvtár előállításához.

3.5. AFLP Differential Display

A három agancsszövet és a magzati porc expressziós mintázatának összehasonlítását az AFLP Analysis System I (Gibco) kit segítségével végeztük, a gyártó leírásától csak kismértékben tértünk el. Kiindulási mintaként a négyféle szövetből eredeztethető cDNS szolgált. A pre- és a szelektív amplifikációs reakciók GeneAmp®PCR System 2700 (Applied Biosystems) típusú készülékben zajlottak le. A preamplifikáció termékeiből (hígítás nélkül) 5 µl mennyiséget használtunk a szelektív amplifikáció reakcióihoz. A szelektív amplifikáció során használt primerek jellegzetessége, hogy három szelektív nukleotidot tartalmaznak. A kit összesen 64 primerkombinációt biztosított (8-8 darab, három szelektív nukleotidot tartalmazó primer mindkét adapterhez), amelyeket 1. táblázat tartalmazza. A lehetséges primerkombinációkból 22-vel végeztük el az AFLP-t, amelyeket szintén az 1. táblázat mutat az expressziós különbségeket mutató cDNS-fragmentek számával együtt.

	M-CTT	M-CTG	M-CTC	M-CTA	M-CAT	M-CAG	M-CAA	M-CAC
E-AAC	-	1	-	1	-	1	1	-
E-AAG	-	-	-	1	-	-	1-	-
E-ACA	-	-	-	-	-	1	-	-
E-ACC	-	-	1	3	1	1	-	-
E-ACG	-	6	-	3	2	1	1	1
E-ACT	-	-	-	-	-	-	-	1
E-AGC	-	-	2	2	2	-	6	-
E-AGG	-	-	-	-	-	-	-	-
total:	40							

1. táblázat: Az AFLP Differential display során felhasznált primer kombinációk

Az egyes primerkombinációknál feltüntett számok jelzik, hogy az adott primerkombinációval elvégzett AFLP-vel mennyi expressziós különbséget mutató cDNS-fragmentumot sikerült azonosítanunk. A vastagon szedettek a további tesztelésen jónak bizonyult AFLP-fragmentek, a dőlten szedettek azok, amely a Southern hibridizáció során kiesettek.

A reakciókhoz az *EcoR*I primereket jelöltük [γ^{33} P] ATP-vel T4 kináz segítségével. A PCR reakciók a következő paraméterek mellett játszódtak le: 30 másodpercig tartó denaturálás 94 °C-on, majd primer kötődés 65 °C-on 30 másodpercig, végül 60 másodperces lánchosszabbítás 72 °C-on.

Az ezt követő 11 ciklusban a primer kötődési hőmérséklete ciklusonként 0,7 °C-kal csökkent, egészen 56 °C-ig, amely hőmérséklettel további 28 ciklus játszódott le.

A PCR termékeket 6%-os poliakrilamid gélen (20:1 akrilamis:bis; 7,5M urea; 1xTBE puffer) választottuk szét. A detektálás 16 órás exponálással történt Kodak filmre.

3.6. cDNS fragmentek klónozása és tesztelése

Az expessziós különbséget mutató AFLP fragmenteket a poliakrilamid gélből kivágtuk, megközelítőleg 1mm szélességben. A DNS fragmenteket a pBluescript[®] II KS (R_{amp})(Stratagene) vektor *Hinc*II klónozó helyére építettük be és *E.coli* DH5α kompetens sejtjeibe transzformáltuk. A kompetens sejtek készítése Mandel és Higa (1970) által leírt módszer szerint történt, és -70 °C-on tároltuk. A transzformálás első lépéseként a sejteket 10 percig jégen tartottuk, majd hozzákevertük a bejutandó DNS-t és újabb 30 percig hagytuk jégen. A 2 perces hősokkot 42 °C-on végeztük. Ezt követően a sejteket ismételten jégen tartottuk 10 percig, majd 37 °C-on antibiotikum-mentes LB tápfolyadékban regeneráltuk. Mintegy 1 óra regeneráció után a baktériumokat 100 μg/ml ampicillint tartalmazó LB táptalajra szélesztettük.

A kapott baktérium kolóniákból izolált rekombináns plazmidot a Southern hibridizáció során teszteltük, vajon a vektor által tartalmazott DNS fragment azonos-e azzal, amely az AFLP technika alapján expressziós különbséget mutatott. A Southern hibridizációhoz a fentiekben leírt módon előállított és az AFLP-hez is felhasznált cDNS populáció szolgáltatta a radioaktívan [α^{32} P]-ral jelölt próbát. A hibridizációt Sambrook *et al.* (1989) leírása alapján hajtottuk végre. Mindegyik AFLP fragment hibridizációs mintázatát szigorú mosási körülmények között ellenőriztük (2xSSC-től – 0,1xSSC-ig, hibridizációs hőmérsékleten: 68 °C-on).

3.7. Northern hibridizáció

A totál RNS-t 300-500 mg szövetmintából izoláltuk Chomczkynski, P. és Sacchi, N. (1987) módszere szerint. Mintáinkat 5M guanidium-tiocianátban homogenizáltuk, majd savas fenolkloroformmal tisztítottuk. Az RNS molekulákat izopropanollal csaptuk ki és 75%-os etanollal mostuk, a szárítást követően 50 µl RNáz-mentes vízben oldottuk fel. A totál RNS-ek minőségét és mennyiségét fotométerrel határoztuk meg, 260 nm-es és 280 nm-es abszorbancia értéknél. Az RNSek 10 µg-ját 1,2%-os formaldehid-agaróz gélen választottuk szét és Hybond N+ filterre (Amersham) vittük át kapilláris blottolási technikával (Sambrook *et al.*, 1989). A hibridizációhoz próbaként 50 ng AFLP fragmentet használtunk, amelyeket [α^{32} P]ATP-vel jelöltünk Pre-MC, Pre-T primerekkel "random priming" protokollal. Pre-MC: GCACGATGAGTCCTGAGTAAC, Pre-T: CGTAGACTGCGTAGGAATTCT. A hibridizációt 65 °C-on Perfecthyb TM Plus pufferben (Sigma) hajtottuk végre. Ezt követően a filtereket -továbbra is 65 °C-on- 2xSSC-0,1%SDS és 0,2xSSC-0,1%SDS elegyben mostuk. A radioaktív jeleket Storm Phosphorimager készülékkel (Molecular Dynamics) jelenítettük meg.

3.8. cDNS könyvtár készítése

3 μg dupla-szálú cDNS-t *Sfi*I endonukleázzal elhasítottunk, majd SizeSep400 (Pharmacia) kromatográfiás oszloppal méret szerint frakcionáltuk. Ezután a kicsapott cDNS-eket *Sfi*I enzimmel megemésztett, defoszforilált λ Triplex2 vektorba építettük. A ligálási reakciókból 1 μl-t használtunk fel az *in vitro* pakoláshoz (GigapackGold, Stratagene). 1-2 x 10⁶ rekombináns fágot *E.coli* XL1 Blue törzsében sokszorosítottunk 10⁹-10¹⁰ fág/ml koncentrációig. A könyvtárakat 1x Lambda pufferben 10% DMSO hozzáadásával -70 °C-on tároltuk.

A könyvtár szűrését a standard protokoll szerint végeztük el (Sambrook *et al.*, 1989). Megközelítőleg 2-3x 10⁴ fágot szélesztettünk ø180mm Petri csészékre és a plakkokat GeneScreen hibridizációs transzfer membránra vittük át. Próbaként az AFLP fragmenteket használtunk, amelyeket a Northern hibridizációnál ismertetett módon jelöltünk meg. A plakk-hibridizációt két körben végeztük. A pozitív fágokat izoláltuk és *E.coli* BM25.8 törzsében plazmiddá alakítottuk. A plazmid DNS-eket QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk, és bázissorrendjüket meghatároztuk (Perkin Elmer ABI prism 377 DNS szekvenáló készülék, MBK).

3.9. Valós-idejű mennyiségi RT-PCR

A génexpressziók mennyiségi analízisét LightCycler 3 készülékkel (Roche) végeztük. A reakciókat 20µl térfogatban az alábbi módon állítottuk össze: 1x BSA, 20 pmol TaqMan fluoreszcens próba (Bio-Science), 2x TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 20 pmol forward primer, 20 pmol reverse primer és 5 ng cDNS templát. A reakciókhoz felhasznált primerek és próbák szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza. A PCR-termékek az alábbi paraméterek mellett keletkeztek: kezdeti denaturáció 95 °C-on 5 percig, majd 50 cikluson keresztül 95 °C 15 másodpercig, 60 °C 10 másodpercig, 72 °C 20 másodpercig. Az mRNS-ek szintjét a β -aktin mRNS szintjéhez normalizáltuk, amely a vizsgált szövetekben nem változott. Minden mérésünk háromszoros ismétlésben szerepelt (mind az agancsminták mint "target", mind a magzati porc mint referencia esetében). A mért adatokat a Relative Quantification szoftver 4. verziójával (Roche) elemeztük.

Cánaly	Forward primer	Reverse primer				
Genek	5'-Fam TM / 3'TAMRA TM jelölt próba					
annexin II	CAAGGGCGACTACCAGAAAG	GACACAGTACTCGAGAGGCAAA				
	CGCATTACCTGGCTTTCCCGG					
lpha-tropomiozin	GCCATTTCCCAAATTGACAT	CCACAGTGGGACCTTTTGTT				
	TGCCAATGATGCATGACCAGGA					
apolipoprotein D	CATTCACTCCATGTTCCTTCT	TCAGACTCGCAAGGTAACAGAA				
aponpoprotein 2	CAAGGCAAGCTGGCCCAAAACAT					
<i>B</i> -aktin	GATCTGGCACCACACCTTCTA	CCCAGAGTCCATGACAATACC				
	ATGTGGCCATCCAGGCTGTGC					

2. táblázat: A valós idejű mennyiségi RT-PCR-hez felhasznált primerek és próbák.

3.10. In situ hibridizáció

A bársonyos-barkás agancs különböző zónáiból és a magzati porcból készült metszeteket deparaffináltuk, rehidratáltuk és 10 µg/ml Proteináz K-val előkezeltük. Az emésztés 37 °C-on végeztük, az agancsminták esetén 30, a magzati porcnál 20 perc hosszan. Az enzimes feltárást követően a metszeteket 4%-os paraformaldehiddel utófixáltuk és 0,25%-os ecetsav-anhidridben acetiláltuk. A RNS próbákat digoxigenin-UTP-vel (Roche) jelöltük *in vitro* transzkripció során. A hibridizációt megelőzően metszeteket a próbákkal együtt 3 percig 94 °C-on denaturáltuk, majd 55 °C-on 16-18 órán keresztül inkubáltuk. A hibridizáció után a metszeteket 2XSSC, 50% formamid oldatban mostuk 30 percig a hibridizációs hőmérsékleten, majd 20 µg/ml RNáz A enzimmel kezeltük 37 °C-on 30 percig. Végül 0,2XSSC-vel mostuk kétszer 30 percig. A digoxigeninnel jelölt RNS-t birka anti-digoxigenin alkalikus-foszfatáz antitesttel (Fab fragment, Roche) detektáltuk. A detektálás alkalikus-foszfatáz reakción alapult, amelyhez nitrotetrazolium blue kloridot és 5-bromo-4-kloro-3-indolyl foszfátot alkalmaztunk kromogén szubsztrátként. A metszeteket Kaiser-féle glicerin zselatinnal (Merck) fedtük le.

3.11. Western blot analízis

A szövetmintáinkat porrá őröltük, majd lízis pufferrel kezeltük és szonikáltuk. 1 μl nemredukált felülúszó SDS-PAGE elválasztását 10%-os NuPAGE Novex Bis-Tris gélen végeztük MOPS-SDS futtató pufferben. A fehérjéket Hybond-C Extra nitrocellulóz membránra vittük át (Amersham Biosciences) elektromos áram segítségével (30V). Az antigént a gímszarvas Annexin 2 fehérjéje ellen termeltetett poliklonális nyúl antitest (Sigma) segítségével azonosítottuk, amelyet 2000-szeres hígításban alkalmaztunk. Az antigén-antitest komplex detektálásához 30000-szeresére hígított, kecskében termeltetett anti-nyúl poliklonális antitestet használtunk, amelyhez alkalikus foszfatázt konjugáltattak. Az enzim reakcióhoz szubsztrátként nitrotetrazolium blue kloridot és 5-bromo-4-kloro-3-indolyl foszfátot használtunk.

3.12. Immunohisztokémia

Az Annexin 2 fehérje szöveti kimutatására a gímszarvas Annexin 2 fehérjéje ellen termeltetett poliklonális nyúl antitestet (Sigma) használtuk. A fehérje detektálását standard protokoll szerint végeztük peroxidázzal konjugáltatott kecske anti-nyúl IgG szérummal és 3-amino-9-etilkarbazollal (AEC) mint szubsztráttal. A metszeteket a deparaffinálást és rehidrálást követően 5 µg/ml Proteináz K-val lazítottuk 37 °C-on 20 percig. Az antitestek nem-specifikus kötődését 20%- os normál kecske szérumban való 2 órás inkubálással akadályoztuk meg. Az elsődleges antitestet 200-szoros hígításban használtuk, és egy éjszakán keresztül hagytuk kötődni 4 °C-on. A 100-szoros hígításban alkalmazott másodlagos antitestet szobahőmérsékleten egy óráig inkubáltuk. Az enzimreakció után a metszeteket Mayer-féle hematoxilinnel festettük.
4. EREDMÉNYEK

4.1. A vizsgált agancs minták szövettani ellenőrzése

Vizsgálódásaink során a bársonyos-barkás agancs három szöveti zónáját tanulmányoztuk: a csúcsi (ún. tartalék) mezenchima, az előporc és a porc rétegeket. A kísérletek megkezdése előtt mintáinkat szövettani festésekkel: hematoxilin-eozin, illetve alcian blue-alizarin red festéssel elemeztük (10.ábra).



10. ábra: A fejlődő agancs szövettani felépítése:

A: barkás-bársonyos agancscsúcs hosszmetszete; B: alcian blue-alizarin red festés (az alcian blue kék színnel jelzi az extracelluláris mátrixban felhalmozódó glükózaminoglikánokat (GAG), az alizarin red pedig bíborlilával a lerakodó kalciumot); C: hematoxilin-eozin festés. Mérték: 0.1 mm

A fejlődő agancs szövettanáról részletes publikációk állnak rendelkezésünkre (Banks és Newbry, 1983; Li *et al.*, 2005; Korpos *et al.*, 2005). Mintáink szövettani vizsgálata azért volt szükséges, hogy ellenőrizzük, a megfelelő szöveti zónából származnak.

A legfontosabb jellemzők, amelyek eredményeinket érthetőbbé teszik a következők:

A mezenchima apró sejtekből és kevés sejtközötti állományból áll. A mezenchima az agancs apikális részén a legterjedelmesebb, de proximális irányban végig kísérhető mint a perichondrium, illetve periosteum belső sejtes rétege. Az itt elhelyezkedő sejtek nem olyan intenzíven osztódnak, mint a csúcsi részben, de proliferációjukkal biztosítják a periostális csontosodáshoz az osteoblastokat.

Az előporc egy rendkívül heterogén réteg, a különbözőbb differenciálódási stádiumban lévő prechondroblastokból és chondroblastokból épül el. (10/B ábra, a világoskék szín a glükózaminoglikánok (GAG) felszaporodását jelzi az ECM-ben). A porcsejtek közötti alapállományban jelentős ásványi anyag lerakódást mutattunk ki az alizarin red festéssel (10/B ábra, bíborlila szín jelzi a kalcium lerakódást), amely egyáltalán nem jellemző az egészséges testi porcszövetekre.

4.2. Expressziós különbségek kimutatása AFLP-vel

A fejlődő agancscsúcs három szövetének és a magzati növekedési porclemeznek a génexpresszióját hasonlítottuk össze. A különböző módszerek összekapcsolásával olyan kísérleti rendszert hoztunk létre, amely alkalmas az általunk vizsgált szövetek között az expressziós különbségeket mutató gének azonosítására (11.ábra).



11. ábra: A gének azonosítására alkalmas metodikai láncolat áttekintése

A négy szövet génexpresszióinak összevetését AFLP Differential Display technikával végeztük el. Mindegyik mintából két, független mRNS izolátumból szintetizált cDNS-poolt alkalmaztunk, és azokat a DNS-fragmentumokat kerestük, amelyek bármely agancsszövethez képest a magzati szövetben nem vagy nagyon gyengén fejeződtek ki. Lényeges kritériumként fogalmaztuk meg, hogy az expressziós differencia mindkét mintában megtalálható legyen, hogy ezzel is tovább csökkentsük az egyedi eltérésekből adódó különbségeket (12.ábra).



12. ábra: AFLP Differential Display

A piros nyíl egy expressziós különbséget mutató cDNS fragmentet mutat. A cDNS fragmentum a mezenchimában nem detektálható, viszont az előporcban közepesen, a porcban erősen expresszálódik, valamint a magzati porcban gyengén kifejeződik.

Az agancs növekedését módosult endochondrális csontosodásként írják le (Li és Suttie, 2000), ezért úgy gondoltuk, az agancsszövetek expressziós mintázatának összevetése a magzati porclemezével rámutathat azon génekre, amelyek (i) az agancs robosztus növekedéséhez hozzájárulhatnak, illetve azokra, amelyek (ii) a mezenchima-porc differenciációs útvonal kezdeti szakaszában szerepet játszanak, tekintve, hogy a magzati növekedési porclemezben nincs a fejlődő agancs csúcsi mezenchimájával és előporcával megfeleltethető szövettípus.

A megfigyelt expressziókat intenzitásuk szerint erősnek, közepesnek, gyengének vagy nem detektálhatónak minősítettük (12.ábra). 40 AFLP-fragmentum mutatott erősebb expressziót valamelyik agancsszövetben a magzatihoz képest. Ezeket a DNS-fragmenteket a gélből izoláltuk és PCR technikával sokszorosítottuk, hogy utána a pBluescript® II KS klónozó vektor *Hinc*II helyére beépítsük.

Az expresszió erősségének vizuális (ezért óhatatlanul is szubjektív) összehasonlítása megkívánta, hogy a mintázatokat ellenőrizzük. Ehhez Southern hibridizációs technikát alkalmaztunk. Négy párhuzamos hibridizációt végeztünk el, amelyeknél a megfelelő szövetből származó, radioaktívan jelölt cDNS-poolt használtuk próbaként. A 40 AFLP fragmentumból 36 esetén kaptunk az AFLP-vel megegyező mintázatot.

Ezt a 36 DNS fragmentet expressziójuk mintázata alapján hat csoportba soroltuk be (3. táblázat):

- (I) mezenchimában expresszálódik,
- (II) mezenchimában és előporcban expresszálódik,
- (III) mindhárom agancsszövetben expresszálódik,
- (IV) az előporcban expresszálódik,
- (V) az előporcban és a porcban expresszálódik,
- (VI) a porcban expresszálódik.

A 36 fragment szekvenciasorrendjét meghatároztuk és az NCBI adatbázisában BLAST keresést végeztünk (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (3. táblázat utolsó oszlopa). A kapott hasonlóságok alapján a géneknek két jelentősebb csoportját határoltuk körbe:

(i) a transzkripció és transzláció folyamataihoz szükséges gének: AF 08.09.14 és AF 11.24.21
(I), AF 09.05.10. (II), AF 08.09.01, AF 11.24.04 és AF 11.24.22 (III), AF 1.24.28 (VI); és

(ii) a daganatképződéssel kapcsolatba hozható/hozott gének csoportja: AF 08.09.09 (I), AF 09.05.07 (II). AF 08.09.00 és AF 07.08.05 (III), AF 01.28.10 (V).

Az első csoport tagjainak fokozott expressziója nem meglepő eredmény, hiszen a transzkripció és transzláció folyamataihoz szükséges gének aktivitása elengedhetetlen a robosztus agancsfejlődés magas metabolikus igényeihez. A második csoporthoz tartozó gének több lehetőséget rejtettek számunkra, mivel az agancs növekedését a sejtosztódás és –differenciáció nagy sebessége miatt párhuzamba állíthatjuk a sejtek rákos elfajulásával és a daganatképződéssel, ezért ezeknek a géneknek az expressziós profilját vizsgáltuk a továbbiakban.

A 24, egyik csoportba sem sorolt AFLP fragmentek egy része nem mutatott ismert szekvenciával homológiát, illetve különböző eredetű klónokkal és EST szekvenciával adtak azonosságot. A napról-napra egyre bővülő adatbázisokban az újabb és újabb keresések egyes fragmenteknél már adtak eredményeket, pl.: az AF 01.28.03 fragmentumról a későbbi BLAST keresések alapján kiderült, hogy valószínűleg a gímszarvas bradikinin receptor B1-jével azonos.

3. táblázat: Az AFLP fragmentek expresziós mintázata

AFLP fragmentek	FLP fragmentek Szelektív nukleotidok		AFLP	Szövetek ^{b,e}				BLAST ^d
pKS-ben (bp)	<i>Eco</i> RI primer	<i>Mse</i> I primer	mintázat osztálya ^a	FC	RM	PC	С	-
AF 08.09.09 (446)	E-AGC	M-CAA	Ι	n	e	n	n	a-tropomiosin (H. sapiens: AJ001055,
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·								m.musculus:NM024427)
AF 09.10.07 (118)	E-ACG	M-CAT	Ι	n	e	n	n	Huntington interacting protein B 1-es izoformához hasonló (C.lupus: XM859025)
AF 08.09.07 (104)	E-AGC	M-CAT	I	n	e	n	n	Ismeretlen
AF 08.09.08 (257)	E-AGC	M-CTA	I	n	e	n	n	BAC klón (H.sapiens: AC078920)
AF 08.09.14 (52)	E-AGC	M-CTA	Ι	n	e	n	n	L12-es riboszómalis fehérje (B.taurus: BC090393)
AF 08.09.12 (219)	E-AGC	M-CAT	I	n	e	n	n	EST (B.taurus: BM480450)
AF 11.24.21 (101)	E-ACC	M-CTA	Ι	gy	е	gy	gy	S12-es riboszómalis fehérje (B.taurus: AY528251; O.aries: DQ223559)
AF 09.12.09 (224)	E-ACC	M-CTC	Ι	n	k	n	n	Px19-szerű protein (B.taurus: BC110001)
AF 09.05.17 (216)	E-ACG	M-CTA	1	n	k	gy	n	ismeretlen
AF 09.05.07 (198)	E-ACG	M-CTA	п	gy	e	k	gy	Transgelin (B.taurus: BC105336))
AF 09.05.10 (205)	E-ACG	M-CAC	II	n	k	е	gy	Eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4A, 1-es izoforma (EIF4A1) (B.taurus: BC103130)
AF 09.05.03 (151)	E-ACG	M-CAC	II	n	k	e	n	Transgelin (C.lupus: XM856022)
AF 08.09.00. (161)	E-AGC	M-CAA	Ш	n	e	e	e	Annexin 2 (B.taurus: BC102516)
AF 01.28.03 (353)	E-AGC	M-CTC	III	n	e	e	e	Bradikinin receptor B1 (<i>H.sapiens</i> : AY275464, <i>B.taurus</i> : DQ0994995)
AF 08.09.06 (206)	E-AGC	M-CAA	III	n	e	e	e	Annexin 2 (S.scrofa: ÁY706386, H.sapiens: BC013843)
AF 07.08.05 (261)	E-ACC	M-CAG	ш	gy	e	e	k	Foszfatidiletanolamint kötő protein (<i>B.taurus</i> : BC102389)
AF 08.09.01 (225)	E-AGC	M-CAA	III	gv	е	е	е	45S pre-riboszómális RNS (M.musculus: X82564)
AF 12.05.01 (184)	E-AAC	M-CTA	III	gy	e	e	e	klón (M.musculus: BC034457))
AF 11.24.04 (101)	E-ACC	M-CAT	III	gy	e	e	k	Leucil-tRNS szintetáz (M.musculus: NM153168)
AF 11.24.22 (207)	E-ACC	M-CTA	III	п	k	k	е	S28-as riboszómális fehérje (B.taurus: NM001025316)
AF 12.05.17 (89)	E-AAC	M-CTG	IV	n	n	e	gy	HLA-B-hez kapcsolt transzkriptum 2 (B.taurus: XM868350)
AF 09.28.08 (251)	E-ACT	M-CAC	IV	n	n	k	n	Klón (AC096884)
AF 08.09.02 (165)	E-AGC	M-CAA	IV	n	n	k	n	EST (B.taurus: DY124248)
AF 09.10.10 (107)	E-ACG	M-CAT	IV	n	n	e	n	Ismeretlen
AF 12.05.23 (123)	E-AAC	M-CAG	1V	n	n	e	n	Ismeretlen
AF 08.09.04 (120)	E-AGC	M-CAA M-CTG	IV	gy	n	10	gy	Alfo kind agydol (B.taurus Toetus: A V 591208)
AF 10.09.02 (273)	E-ACC	M CTC	V	n 5	n n	R.	gy	AnalipoproteinD (H saniaus: NM001647
AF 01.28.10 (166)	E-AUC	M-CIC	v	11	11	¢	e	B taurus: BC109863)
AF 01.17.05 (216)	E-ACA	M-CAG	V	n	k	e	e	Ismeretlen
AF 10.09.08 (131)	E-ACG	M-CTG	V	n	n	e	c	Ismeretlen
AF 09.05.11 (124)	E-ACG	M-CTA	V	gy	gy	k	e	RAD23 homológ B (B.taurus: BC114133)
AF 10.09.03 (217)	E-ACG	M-CTG	VI	n	n	gy	e	EST (B.taurus: CX737099)
AF 10.09.04 (193)	E-ACG	M-CTG	VI	n	n	gy	e	RasGEF domén család, 1A tag (<i>B.taurus</i> : BC103407)
AF 10.09.05 (169)	E-ACG	M-CTG	VI	gy	n	gy	e	Ismeretlen
AF 10.09.06 (164)	E-ACG	M-CTG	VI	n	n	gy	e	Ismeretlen
AF 11.24.28 (218)	E-ACC	M-CTA	VI	gy	gy	gy	е	TAF7-szerű RNS polimeráz II (B.taurus: BC105412

^a I: mezenchimában expresszálódik; II: mezenchimában és előporcban expresszálódik; III: mindhárom agancsszövetben expresszálódik; IV:

az előporcban expresszálódik; V: az előporcban és a porcban expresszálódik; VI: a porcban expresszálódik

^b FC: magzati porc; RM: tartalék mezenchima; PC: előporc; C: porc
 ^e e erős, k közepes, gy gyenge, n nem detektálható expressziók
 ^d vastagon szedett: tumorbiológiához kapcsolt gének; dőlten szedett: fokozott metabolikus igénnyel összefüggő gének

4.3. A gímszarvas ortológ gének azonosítása

Az eredmények alátámasztásához az AFLP fragmenteknél (100-400 bp) hosszabb cDNS szekvenciákra volt szükségünk. A teljes cDNS meghatározáshoz a három cDNS-könyvtárunkat használtuk fel, amelyek a megfelelő agancsszövetből izolált cDNS-poolból készítettünk el. Az AFLP-fragmenteket itt is próbaként használva hibridizációs technikával határoztuk meg a leghosszabb inzertet. Ezek szekvenciáját meghatároztuk, és a BLAST keresés megerősítette korábbi eredményeinket. A gímszarvas szekvenciák 83-94%-os hasonlóságot mutattak egér és 84-95%-os hasonlóságot humán génekkel. A szarvasmarha ortológokkal a hasonlóság elérte a 95-98%-ot (4. táblázat).

4. táblázat: Gímszarvas cDNS szekvenciák ortológjai

cDNS ^a	Ember (Homo sapiens)	Egér (<i>Mus musculu</i> s)	Szarvasmarha (Bos taurus)
α-tropomiozin (1747)	903 / 945 (95%)	552 / 586 (94%)	557 / 564 (98%)
transgelin (1307)	497 /533 (93%)	473 / 533 (88%)	523 / 533 (98%)
annexin 2 (1407)	954 / 1040 (91%)	917 / 1077 (89%)	1325 / 1369 (96%)
phosphatidylethanolamine binding protein (1438)	500 / 565 (88%)	451 / 546 (82%)	782 / 815 (95%)
apolipoprotein D (904)	546 / 634 (86%)	372 / 444 (83%)	879/906 (97%)

^a Zárójelben: a cDNS hossza bázispárban

Az új, teljes gímszarvas mRNS szekvenciákat beküldtük a GeneBank-ba:

α-tropomiozin (tpm1)	GeneBank accession number: DQ239919
transgelin (tagln)	GeneBank accession number: DQ412697
annexin 2 (anxa2)	GeneBank accession number: DQ239920
foszfatidiletanolamint kötő fehérje (pebp)	GeneBank accession number: DQ412698
apolipoprotein D (apoD)	GeneBank accession number: DQ239921

4.4. Az mRNS expressziók mintázatának megerősítése

Az azonosított gímszarvas gének expresszióját az agancscsúcs szöveteiben és - természetesen - a magzati porcban Northern hibridizációs technikával bizonyítottuk, illetve ellenőriztük expressziós mintázatukat. Az agancs mezenchimális, előporc és porcszövetéből, valamint a magzati porcból tisztított totál RNS-ből mutattuk ki mind az öt gén mRNS-ének jelenlétét. A hibridizáció során a teljes hosszúságú cDNS-t használtuk próbaként. Valamennyi próba egyértelmű hibridizációs jelet adott (13. ábra).



13. ábra: Northern blot analízis

FC: magzati porc, RM: (tartalék v csúcsi) mezenchima, PC: előporc, C: porc.

Az α -tropomiozint kódoló gén expresszióját eddig csak a mezenchimában mutattuk ki, azonban a Northern hibridizáció alapján ez a gén a bársonyos-barkás agancs előporc és porcszövetében is kifejeződik. Ezekben a szövetekben az expressziója gyenge intenzítású, ami azt bizonyítja, hogy a Northern hibridizációs technika érzékenyebb módszer, mint az eddig használt metodikák. A *transgelin* gén expressziós mintázata tökéletesen megegyezett előző eredményeinkkel: a mezenchimában erős, az előporcban közepes, a porcban gyenge expressziót detektáltunk. Mind a *transgelin*, mind az α -tropomiozin esetén a magzati porcban az expresszió nem volt detektálható. Ellentétben az *annexin 2* génnel, ahol a magzati növekedési porclemezben nagyon gyenge expressziót mutatott ki a Northern hibridizáció. Az *annexin 2* gén mindhárom agancsszövetben kifejeződik, azonban a legerőteljesebb expressziót a fejlődő agancs csúcsi mezenchimájában mutatja. A porcfejlődés előrehaladtával expressziójának erőssége fokozatosan csökken. Ehhez hasonló mintázatot mutatott a *pebp* gén. Annyi különbség felfedezhető, hogy a *pebp* gén esetén erősebb hibridizációs jel keletkezett a magzati mintában, aminek következtében ezt a gént – egyenlőre – nem vizsgáltuk a továbbiakban.

Az utolsó vizsgált gén az *apolipoprotein D*, amely a korábbi kísérletekben az agancs előporc és porcszövetében mutatott erőteljes expressziót. A Northern hibridizáció ezt teljes mértékben alátámasztotta, tovább finomítva a gén expressziós mintázatát. E szerint az *apolipoprotein D* expressziója a porcdifferenciálódás előrehaladtával jelentősen növekszik.

4.5. A génexpressziók mennyiségi analízise

A Northern hibridizáció eredményei ugyan sokat finomítottak az expressziós mintázatokon, szükségesnek láttuk az expressziós különbségek mennyiségi analízisét. Ezt valós idejű RT-PCR technika segítségével valósítottuk meg a három általunk kiválasztott gén esetén. A kapott értékeket a β -aktin gén expressziójához normalizáltuk (14.ábra).



14. ábra: Kvantitatív valós-idejű PCR eredményei

Fekete oszlopok: relatív mRNS szint a mezenchimában; szürke oszlopok: relatív mRNS szint az előporcban; fehér oszlopok: relatív mRNS szint a porcban.

Az α -tropomiozin mRNS szintje 2,5-szeres a mezenchimában és csökken az előporc (0,51), porc (0,47) felé. Az annexin 2 gén mRNS-szintje fokozatosan csökken az agancs mezenchimális régiója felől a porcos szövetekig: a mezenchimában 1,4-szeres, az előporcban 1,1-szeres, a porcban 0,33-szoros értéket mértünk. Az apolipoprotein D esetén a mezenchimában mért, minimális (0,03) expresszió drasztikusan megnövekszik az előporc zónájában (25,63), és a várakozásunknak megfelelően tovább növekszik az agancs porcszövetében (65,26).

4.6. A génexpressziók térbeli lokalizálása in situ hibridizációval

A bársonyos-barkás agancs szöveti zónái heterogén összetételűek, több sejttípust is megtalálhatunk az egyes rétegekben. Ennek egyik oka a csúcstól proximális irányban történő rendkívül fokozatos differenciáció, másrészt feltűnő vaszkularizáltság. A gének expressziós mintázatának további finomításához meg kívántuk határozni azokat a sejttípusokat, amelyek kifejezik az adott gént. Ehhez az *in situ* hibridizációt hívtuk segítségül. Az α -tropomiozin, annexin 2 és az apolipoprotein D gének esetén készítettük el az antiszensz RNS próbákat, amelyekkel hosszszelvényi metszetekre hibridizáltunk.

Az *in situ* hibridizációnál is szépen kirajzolódott az α -tropomiozin gén eddig ismert expressziós mintázata: a csúcsi mezenchimában megfigyelhető erős expresszió a differenciáció előrehaladtával lecseng (15/A-D ábra). Az előporc (pre)chondroblastjai még határozott hibridizációs jelet adnak (15/H ábra), azonban a porcsejteknek csak némelyikében tapasztalhatunk nagyon gyenge szignált (15/J ábra). Az előző kísérletekben a porcszövetben kimutatott expressziót inkább a vérek körüli perivaszkuláris térben található fibroblast-szerű sejtekhez köthetjük (15/I ábra piros nyíl). Az α -tropomiozin erős expresszióját érzékeljük a bőrben futó vérerek esetén is (15/E ábra piros nyíl). Az *in situ* hibridizáció feltárta az α -tropomiozin gén expressziójának egyik jellegzetességét, amit eddig nem észlelhetünk, miszerint a csúcsi mezenchimába koncentrálódó expressziója nem terjed ki az oldalsó mezenchimára (15/F-G ábra).



15. ábra: Az α-tropomiozin gén in situ lokalizációja

A fejlődő agancs barkájából (A, E), mezenchimájából (B, F, G) előporc szövetéből (C, H) és porcszövetéből (D, I, J) készített 8µm vastagságú metszetek. Mérték: 0,25 mm (A-D); 0,1 mm (E-I); 0,0006 mm (J).

Az annexin 2 gén mindegyik agancs szövetben kifejeződik. Az expresszió a mezenchimában volt a legerősebb és egyre gyengült az előporc, porcszövetben (16/A-D ábra). Nagyobb nagyítás mellett megfigyelhetjük, hogy az előporcban megjelennek olyan sejtek, amelyekben a hibridizációs jel gyengébb intenzitású vagy egyáltalán nem detektálható, az ilyen sejtek száma a porcban tovább növekszik (16/G-H ábra, piros nyílfej). Az annexin 2 expresszióját a bőrben is kimutattuk, itt a vérerek falára korlátozódik a gén kifejeződése (16/E ábra).



16. ábra: Az annexin 2 in situ hibridizáció

Az *anxa2* expressziójának változása a fejlődő agancsban a mezenchimától a porcig (A és F: csúcsi mezenchima, B-C és G: előporc, D: porc); a chondrogenezis folyamán egyre több olyan sejt jelenik meg, amely kisebb intenzitással expresszálja az *anxa2* gént (G: előporc, H: porc); az anxa2 a bőrben is kifejeződik, de expressziója a vérerek falára korlátozódik (E). Mérték: 0,25 mm (A-D); 0,1 mm (E); 0,006 (F-G). További magyarázat a szövegben.

Az annexin 2 nemcsak a bőrben lévő erek falában expresszálódik, hanem az alatta elhelyezkedő szöveteket sűrűn behálózó véredények falában is, az érkezdemény megjelenésétől expresszálódik. Szintén sikerült kimutatnunk a gén expresszióját az oldalsó mezenchimában, azonban a csúcsi mezenchimához képest nem olyan látványos az expresszió csökkenése, mint az α -tropomiozinnál.

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



17. ábra Az *apolipoprotein D* gén mRNS-ének kimutatása agancs szövetmetszeteken.
A: csúcsi mezenchima; B és b: előporc; C: porc.Mérték: 0,1 A-C; 0,006 b. Az apoD mRNS-t az agancs porcsejtjei expresszálják (C), a mezenchimában nem detektálható hibridizációs jel (A), az előporcban gyenge jel mutatkozik (b).

Az eddigi eredményeink alapján hibridizációs jelet vártunk a bársonyos-barkás agancs előporc szövetében is. Hosszabb expozíciós időt adva az előporc proximális rétegeiben is kifejlődik szignál, azonban ekkor már az endogén alkalikus-foszfatáz okozta háttér zaj is megjelenik (17/b ábra).

4.7. A gímszarvas Annexin 2 immunlokalizációja

Az annexin 2 (anxa2) egy nagy géncsalád tagja, amelybe Ca²⁺-kötő fehérjék tartoznak. Az annexinek sokrétű biológiai funkciót látnak el (pl.: membrántranszport és exocitózis szabályozása, a citoszkeleton és a sejtmembrán közötti közvetítés). Minden annexin rendelkezik egy core doménnel, amely 4-szer vagy 8-szor ismétlődő konzervált aminosav szekvenciából áll, ugyanakkor az amino terminális doménjük egyedi. Az egyes annexineknek ez a nagyfokú hasonlósága megnehezíti egyedi detektálásukat mRNS-szintjen, mivel az antiszensz próba az annexin család több tagjának mRNS-ével is képezhet stabil duplexet. Ez a tény arra késztetett minket, hogy elvégezzük az Annexin 2 (Anxa2) immunlokalizációját, még pedig a gímszarvas Annexin 2 (Anxa2) fehérje N-terminálisa ellen termeltetett antitesttel.

Miután Western blot megerősítette, hogy az antitest specifikusan reagál a gímszarvas Annexin 2-vel, lokalizáltuk a fehérjét a bársonyos-barkás agancs csúcsi mezenchimájában, előporcában és porcszövetében (18. ábra).



18. ábra: Az Annexin 2 immunlokalizációja fejlődő agancscsúcsban.

Az Annexin 2 kimutatható mind a csúcsi mezenchima sejtekben (A), mind a porcképzősejtekben (B), mind a porcsejtekben (C). Az immunhisztokémiai jel a sejtek szélén látható (D, immunfestés hematoxilinos utófestés nélkül, porcszövet), valamint a véredények körüli szövet sejtközötti állományában (D, csillag).

Az Annexin 2 fehérje mindhárom szövettípusban megtalálható és elsősorban a sejtek szélén figyelhető meg, a sejthártyához asszociálva (18.E ábra). Az irodalmi adatok alapján (Kirsch et al., 2000) az extracelluláris mátrixban vártuk a megjelenését, azonban a sejtközötti anyagban csak a perivaszkuláris térben észlelhetjük a fehérje lerakódását (18.D ábra, csillag). Ennek oka lehet, hogy az Annexin 2 a mátrixban részt vesz a makromolekula komplexek kialakításában és ehhez az amino-terminális doménjét használja aktív felszínként. Ekként az epitopot az antiszérum nem érheti el.

4.8. Új tudományos eredmények

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

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

5. KÖVETKEZETETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Expressziós mintázatok értelmezése a fejlődő agancsban

A gímszarvas bársonyos-barkás agancsa kivételes lehetőséget nyújt az emlősök csontfejlődésének jobb megismeréséhez, megértéséhez. Ennek oka egyrészt a csúcsban fellelhető embrionális jellegű mezenchima, amelynek a multipotens sejtjei a porc-, illetve csontszövet irányába történő differenciáció legkorábbi génexpressziós eseményeibe enged bepillantást. Másrészt az előporc és porc hosszanti elkülönülése a fejlődő agancscsúcsban lehetővé teszi a differenciáció apró lépéseiben bekövetkező génexpresszióbeli különbségek pontos feltérképezését.

A porc- és csontfejlődésen túl a fejlődő agancs biológiai modellként további értékekkel bír. Az agancs éves ciklusa gyakorlatilag egy szerv teljes regenerációját takarja, amely példa nélküli az emlősök körében. Ez a komplett szervregeneráció – többek között – intenzív vaszkularizációt és idegregenerációt is magába foglal. A nagyon-nagyon gyors, robosztus növekedése – az emlősök körében maradva – a tumornövekedéssel állítható párhuzamba, bár az agancs növekedése során a proliferáció mindvégig szigorú ellenőrzés alatt áll.

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

Az AFLP Differential Display módszer egyik előnye, hogy előzetes szekvencia ismeret nélkül nyújt információt a minták közötti génexpressziós különbségekről. Ennek folytán az expressziós mintázatok kontrollja után megmaradt 36 AFLP fragmentum szekvenciáját meg kellett határoznunk. A BLAST eredmények alapján több ismeretlen szekvencia is szerepelt a 36 fragmentum között. Az ismert szekvenciákkal hasonlóságot mutató AFLP fragmenteknek két nagyobb csoportja rajzolódott ki. Az első csoportot 6 gén alkotja, mindegyik riboszómális komponens vagy transzkripciós faktor, amelyek megemelkedett expresszióját a robosztus növekedéshez szükséges magas metabolikus igény magyarázza. Ezt a jelenséget korábban már leírták élesztőgombáknál (Kressler *et al.*, 1999). A másik csoportot olyan gének képezik, amelyeknél expresszió-változást mutattak ki tumorok esetén (α-*tropomiozin, transzgelin, annexin 2, foszfatidiletanolamint kötő fehérje* és *apolipoprotein D*).

5.2. Intenzív sejtosztódás a fejlődő agancscsúcsban

Az *tpm1, tagln, anxa2, pebp* és *apoD* gének fejlődő agancscsúcsban mutatott expressziós profiljai meglehetősen eltérnek egymástól, ennek ellenére egy közös jellegzetességgel rendelkeznek: mindegyikük expressziója csökken rosszindulatú daganat kialakulásakor. A *tpm1*, *anxa2* és *pebp* esetén kimutatták, hogy túltermeltetésük képes csökkenteni a tumor agresszivitását (Mahadev *et al.*, 2002, Gillette *et al.*, 2004b, Fu *et al.*, 2003, Keller *et al.*, 2005).

A tagln expressziójának megszűnését vastagbél- és tüdőrákban mutatták ki. A transzgelin expressziója a tumoros elfajulás nagyon korai szakaszában tűnik el, ezért a daganatképződés egy korai szignálját látják benne (Shapland et al., 1993, Shields et al., 2002). Eredetileg csirke zúzógyomor simaizomzatából izolálták és azonosították mint SM22-alpha (Lees-Miller et al., 1987, Nishida et al., 1991). Shapland és munkatársai (1988) egy rákos elfajulásra érzékeny polipeptid párt azonosítottak, amelynek nagyobb relatív molekula tömegű tagjáról kimutatták, hogy mezenchimális sejtek DNS vagy RNS vírus okozta elfajulásánál downregulált. A későbbiekben sikerült kitisztítaniuk ezt az izoformát birka aortából is. Ezt, a transzformációra és sejt alakra érzékeny izoformát, amely nagy homológiát mutatott az SM22-vel, transgelinnek nevezték el. A fibroblast transgelin és a simaizom SM22-alpha közötti rokonságot Lawson és társai (1997) tisztázták. Kimutatták, hogy a transzgelin expressziója nem korlátozódik a simaizomsejtekre, megtalálható normál mezenchima sejtekben, valamint másodlagos egér és patkány embrionális fibroblast kultúrában, azonban sok normál fibroblast sejtkultúrában nincs jelen (Lowson et al., 1997). A Transgelin fehérje szerepe nem tisztázott, de downregulációja egy korai és érzékeny markere az elfajulás kezdetének. Ezzel ellentétes a fejlődő agancscsúcsban megfigyelt expresszió dinamikája, ahol az intenzív proliferációs zónában, a csúcsi mezenchimában a legerősebb az expressziója. Ezért vélelmezhetjük a tumor kialakulásával szembeni egyfajta szupresszív hatását, hasonlóan az α tropomiozinhoz, amely egy tumor-szupresszor gén (Zhu et al., 2007).

A *tpm1* gén az erősen konzerválódott tropomiozin család tagja. A tropomiozinek 35-45 kD, mindenütt előforduló aktin-kötő fehérjék. Mind az izomsejtek kontraktilis redszerében, mind a nemizomsejtek sejtvázában alapvető szerepük van. A gerincesekben 4 ismert tropomiozin gén található, amelyekről alternatív splicinggal jönnek létre a szövetspecifikus izoformák (Goodwin *et al.*, 1991). Az izoformák mérete, aktin-kötő képessége, sejten belüli elhelyezkedése és más fehérjékkel való kapcsolata sokban különbözik egymástól, ami eltérő biológiai szerepükkel magyarázható (Lees-Miller és Helfman, 1991).

A *tpm1* a fibroblastokban és az epitéliás sejtekben expresszálódik, és úgy tűnik, hogy expressziójának megszűnése a különféle emlős karcinogenezis egy közös biokémiai jelensége. A transzformált sejtekben expressziója gyorsan és még azelőtt szűnik meg, hogy a növekedési

faktorokkal indukált elfajulásnak bármilyen morfológiai jele lenne (Warren, 1997, Pawlak és Helfman, 2001). A sejtek rákos elfajulásában betöltött lényeges szerepét támasztja alá az a tény is, hogy az onkogén által transzformált és a mellrák sejtek rosszindulatú fenotípusa visszaszorítható az expressziójának visszaállításával (Prasad *et al.*, 1993). A gén túlműködtetése ugyanakkor gátolni képes a rákos sejtek áttétképződési hajlamát (Zhu *et al.*, 2007).

Mindezek összhangban állnak a növekvő agancsban kimutatott expressziós mintázatával, hiszen expressziója kiugróan magas a csúcsi mezenchimában, ahol a sejtosztódás rendkívül élénk, ugyanakkor a mezenchimális sejteket tartalmazó, de intenzív proliferációval már kevésbé jellemezhető oldalsó mezenchimában, illetve a vérerek környeztében megtalálható, osztódásra szintén képes fibroblasztszerű sejtekben expressziója visszaesik. A differenciált porcsejtekben a gén kifejeződése nem detektálható.

A *tpm1* expressziója a fejlődő agancsban a csúcsi mezenchimára korlátozódik, és tumorszupresszor hatásuknál fogva a sejtosztódás-szabályozásában játszhatnak szerepet.

5.3. Sejtdifferenciáció az agancscsúcsban

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

Az annexin 2 egy konzeválódott ismétlődő domént tartalmazó fehérjecsalád tagja, amelynek közös jellemzője, hogy képesek a negatív töltésű foszfolipideket Ca^{2+} jelenlétében kötni. Az annexinek szerepe sokrétű és még nem teljesen tisztázott. Számos folyamatban résztvevőjeként írták már le ezeket a fehérjéket, mint például endo- és exocitózis, membránfúzió, plazmamembráncitoszkeleton interakciók, feszültség-függő kalcium-csatornák kialakítása (Creutz, 1992; Drust és Creutz, 1988; Faure *et al.*, 2002; Harder *et al.*, 1997). Az annexin2-t ECM molekulák, mint például a tenascin C és a szöveti plazminogén aktivátor, sejtfelszín-receptoraként jellemezték (Chung és Erickson, 1994; Fitzpatrick *et al.*, 2000; Mai *et al.*, 2000). Ezenkívül befolyással bír a sejthártya mikrodomén szerveződésére és dinamikájára az aktinhoz és a lipidekhez való kötődése révén (Gerke és Moss, 2002). Az annexin 5 és az annexin 6 mellett az annexin 2-nek is fontos szerep jut a mineralizációs folyamatok elindításában (Kirsch *et al.*, 2000a), amelyet alátámaszt az a tény, hogy az annexin 2 sejtkultúrában képes indukálni a porcsejtek mineralizációját (Wang és Kirsch, 2002).

Az annexin 2 az osteoblastok mineralizációs folyamataiban is szerepet játszik: elősegíti az ásványi anyagok lerakódását és növeli az alkalikus-foszfatáz aktivitását a lipid raftokban (Gillette és Nielsen-Preiss, 2004). Mind a raftok szétbomlása, mind az anxa2 expressziójának gyengülése a mineralizáció csökkenéséhez vezet. Mindezek után nem meglepő, hogy annexin 2 upregulált a

patológiás ásványanyag berakódással járó betegségeknél, mint például a reumatoid arthritis és az (osteo)arthritis (Justen *et al.*, 2000; Kirsch *et al.*, 2000b).

Az annexin 2 mineralizációban betöltött szerepe megmagyarázza fokozott expresszióját az agancs porcszövetében, azonban a mezenchimában és az előporcban nem. Az annexin 2 a sejtmotilitást, -adhéziót vagy -proliferációt befolyásoló hatásait nem nagyon vizsgálták, ugyanakkor egyértelműen bebizonyították, hogy az annexin 2 túltermeltetése képes csökkenteni a daganat- vagy az áttétképzési hajlamot (Gillette *et al.*, 2004). A mineralizáció beindítása és a tumor agresszivitásának csökkentése arra mutat, hogy az annexin 2-nek szerepe lehet a sejtek differenciáltabb állapotba való elmozdításának. A proliferáció és a differenciáció közötti egyensúly fenntartása alapvető fontossággal bír. Az egyensúly eltolódását a sejtosztódás irányába a rák fémjelének tekintik. A differenciáció megtörése, például az *anxa2* expressziójának megszűnése miatt, előnyhöz juttatja a proliferációs folyamatokat, amely daganat kialakulásához vezethet vagy – az agancsfejlődés esetében – a differenciáltatlan mezenchima sejttömeg felszaporodásához.

Az annexin 2-höz hasonló expressziós mintázattal bír a pebp molekula (a magzati porcszövethez képest fokozott expresszió az agancsszövetekben, ahol az expresszió a mezenchima felől csökken a differenciáció előrehaladásával). Szerepe is hasonló lehet az annexin 2-höz. Erről a génről is feltételezik, hogy szerepet játszhat a differenciációban, és ezenkívül a növekedésben és a sejtek rákos elfajulásában (Yeung *et al.*, 1999). A pebp befolyásolja a protein kináz C (PKC) szignált a Raf-1 és a G protein szignalizáción keresztül, így rengeteg folyamatra hatást gyakorol (Yeung *et al.*, 2000, Kroslak *et al.*, 2001). Kimutatták azt is, hogy a *pebp* egy lehetséges metasztázis szupresszor gén, amelynek expressziója lecsökken prosztata rák áttétnél. Az expressziójának visszaállítása ugyanakkor a metasztázis visszahúzódását okozza prosztata rák sejtvonalban (Fu *et al.*, 2003).

A sejtdifferenciáció és a növekedés megállásának egy lehetséges markereként tartják számon az *apolipoprotein D* expresszióját (Provost *et al.*, 1991a, Simard *et al.*, 1990), amelynek indukálása a növekedés lefékezésével és differenciációval jár együtt humán mellrák sejtekben (López-Boado *et al.*, 1994, Sanchez *et al.*, 1992a, Sanchez *et al.*, 1992b) Az apoD egy kisméretű, kb. 30 kDa glükoprotein, amelyet a humán plazma magas denzitású lipoprotein frakciójából izoláltak (McConathy és Alaupovic, 1973). A lipid metabolizmusban betöltött pontos szerepe nem teljesen tisztázott, általában multifunkcionális és többféle ligandot is kötni képes fehérjeként jellemzik, kiemelve hidrofób jellegét. Az *apoD* mRNS többféle szövetben is kifejeződik, de expressziójának helye fajonként változik (Seguin *et al.*, 1995). Emberben és nyúlban például elsősorban a kisagyban, a mellékvesében és a lépben nyilvánul meg (Navarro *et al.*, 1991), míg az egérben főként a központi idegrendszerre (CNS) korlátozódik az expressziója (Rassart *et al.*, 2000). Az apoD magas expresszióját mutatták ki szöveti fibroblasztokban (Provost *et al.*, 1991b, Boyles *et*

al., 1990a) és felhalmozódását a perifériás idegek regenerációjánál és remielinációjánál (Boyles *et al.*, 1990b). Az *apoD* transzkripciója specifikusan nyugalomban lévő vagy öregedő fibroblasztkultúrákban történik (Provost *et al.*, 1991a). Ezeknek közös jellemzője, hogy a sejtek nem osztódnak. Mindezekkel jól egybe vág az a tény is, hogy az *apoD* a kevésbé differenciált daganatokban alacsonyabban expresszálódik (Díez-Itza *et al.*, 1994).

Az apolipoprotein D erős expressziójának kimutatása porcsejtekben új felfedezés. Mindezidáig az *apoD* mRNS-t a vázfejlődéssel kapcsolatosan a Meckel porc előporcos kondenzációjában, a nyakszirtcsont kezdeményében és a csigolyatestek szklerotomális kondenzációban írtak le (Sanchez *et al.* 2002). A fejlődő agancscsúcsban mutatott expressziós mintázata összecseng differenciációs marker jellegével. A differenciált sejtek számának növekedésével az *apoD* expressziója is egyre erősebb lesz, ugyanakkor a kevésbé differenciált perivaszkuláris sejtekben nem fejeződik ki.

5.4. A proliferáció és a differenciáció szabályozása a fejlődő agancsban

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

Az elképesztően gyors fejlődés során még hatalmasabb jelentőséggel bír az intenzív proliferáció szigorú kontrollja, amely egy erős gátló mechanizmuson keresztül valósul meg. Ennek a mechanizmusnak a része a *tpm1* és a *tagln*, amelyek fokozott expressziója a csúcsi mezenchimában a fékevesztett sejtosztódásnak szab gátat. Eközben downstream az *anxa2* és a *pebp* a differenciálódás felé vezeti a sejteket, támogatva a chondrogenesis folyamatait. A specializálódási út végén megjelenik az *apoD* expressziója mintegy leintő zászlójául a differenciálódásnak.

5.5. Javaslatok

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

53

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

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

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

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

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

7. A *tpm1* és a *tagln* tumorszupresszor hatását érdemes volna megfigyelni különböző eredetű rákos sejtvonalban, illetve az agancs csúcsi mezenchimájából származó sejtvonalakon vizsgálni, milyen hatást vált ki expressziójuk gátlása. Az *anxa2*, *pebp* és az *apoD* inaktiválása

54

ezekben a sejtkultúrákban rámutathat a sejtek differenciált állapotba való elmozdításában játszott pontosabb szerepükre.

8. Az agancsfejlődés pontos megismeréséhez fontosnak tartom a folyamatban szerepet játszó gének szabályozó régióinak feltérképezését, különösen a cisz elemek megismerését, mert elsősorban ezek allélikus variáció lehetnek felelősek az agancs robosztus fejlődésért.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A csontfejlődés és a végtag-regeneráció molekuláris mechanizmusának megismerése alapvető probléma a fejlődésbiológiában. A gímszarvas évenként lehullatott és újranövesztett agancsa egyedülálló és látványos példája egy szerv teljes regenerálásának az emlősök körében. Egy gímszarvas bika 100-120 nap alatt rakja fel hatalmas fejdíszét, amely folyamán porc, csont, bőr, kötőszövet és idegképződés is történik. Az ágvégenkénti napi 1-2 cm-es növekedés hátterében gyors szövetgyarapodás és sejt-differenciáció áll. Az agancs fejlődése nagyon hasonló folyamat az endochondrális csontosodáshoz, amellyel a csöves csontok is kialakulnak. A szarvasagancs a homlokcsont agancsképző csonthártyájából (=antlerogenic periosteum, AP) eredeztethető. Az AP valószínűleg postnatálisan megmaradt embrionális szövet, amelynek differenciációs képessége szembeötlő. Az agancsfejlődés genetikai hátterében álló molekuláris mechanizmusok megismerése a csontfejlődés már ismert faktoraival kezdődött.

Munkánk célja egyrészt a mezenchima—porc differenciációs útvonal génexpressziós mintázatának tanulmányozása, másrészt az agancs robosztus fejlődésében szerepet játszó gének azonosítása. Ennek eléréséhez összevetettük az agancs különböző szöveteinek (csúcsi mezenchima, előporc, porc) és a magzati növekedési porclemez génexpressziós mintázatát AFLP Differential Display technikával. 36 olyan gént azonosítottunk, amelynek expressziója erőteljesebbnek bizonyult a fejlődő agancs valamely zónájában a magzati növekedési porclemezzel szemben. A szekvencia-sorrend meghatározása után a kapott hasonlóságok alapján a géneknek két jelentősebb csoportja definiálható: a transzkripció és transzláció folyamataihoz szükséges gének (6 db), valamint a daganatképződéssel kapcsolatba hozható/hozott gének csoportja (5 db: α -tropomiozin (tpm1), transgelin (tagln), annexin 2 (anxa2), foszfatidiletanolamint kötő fehérje (pebp), apolipoprotein D (apoD)). Utóbbi csoportba tartozó géneknek az expressziós profilját Northern hibridizációval is megerősítettük, valamint három esetén (α -tropomiozin, annexin 2, apolipoprotein D) az expressziós különbségeket QRT-PCR technika segítségével validáltuk. A gének expressziós mintázatának további finomításához *in situ* hibridizációval meghatároztuk azokat a sejttípusokat, amelyek kifejezik az adott gént, illetve az anxa2 esetén a fehérje térbeli lokalizációját is elvégeztük.

Az általunk összeállított metodikai koreográfia alkalmas az agancs egyes szöveti régióinak génexpressziós profiljának biztos megállapításához. Az α -tropomiozin esetén bebizonyítottuk, hogy erőteljes expressziója a csúcsi mezenchimára korlátozódik, az oldalsó mezenchimában jóval gyengébben fejeződik ki. Az apolipoprotein D agancs porcszövetben mért magas expresszióját sikerült

in situ hibridizációval a porcsejtekhez kötni. Az *anxa2* mRNS-t az agancs mezenchima, előporc és porcszövetén kívül a véredények falában is detektáltuk, a fehérjét pedig a sejtek szélén figyeltük meg, a sejthártyához asszociálva.

Az *tpm1, tagln, anxa2, pebp* és *apoD* gének közös sajátossága, expressziójuk csökken rosszindulatú daganat kialakulásakor. Az *tpm1, anxa2* és *apoD* túltermeltetése csökkenti a tumorok agresszivitását. A csúcsi mezenchimában erőteljesen expresszálódó *tpm1* és a *tagln* a fokozott sejtosztódás kontroll alatt tartásában jelentősek. Ettől downstream az *anxa2* és a *pebp* a chondrogenesis felé "lökik" a sejteket. A sor legvégén a differenciációs marker, az *apoD* áll, amely expressziójának kimutatása a porcsejtekben új felfedezés.

A munka folytatásaként hasznos lenne az agancs különböző szöveteiből szövetkultúrák létrehozása a gének funkcióinak tanulmányozásához, valamint a gének szabályozó régióinak feltárása.

6. SUMMARY

Understanding of molecular mechanism of bone development and limb regeneration is an essential problem in development biology. The annually cast and re-grown antler of red deer is a unique and spectacular example of complete organ regeneration in mammals. A red deer stag grows gigantic a head-dress in 100-120 day. Robust antler growth involves cartilage, bone, skin, connective tissue, and nerve development. The daily 1-2 cm longitudinal growth per antler branches is based on rapid tissue development and cellular differentiation. The development of antler is very similar to endochondral ossification. Antlers rise from antlerogenic periosteum (AP) of frontal bone. The AP is presumably a postnatally retained embryonic tissue, with considerable differentiating ability. Exploration of the molecular mechanisms standing in the background of antler development begun with examinations of known factors of bone development.

Our aims were (i) to study the gene expression pattern of the mesenchyme→cartilage differentiation pathway; (ii) to identify genes involved in the robust development of antler. In this investigations we performed AFLP assay to compare gene expression in the consecutive antler tissues (mesenchyme, precartilage, cartilage) and foetal growth plate. We have identified 36 genes that were dominant expressed in any of the differentiation zones of the tip section of the developing antler vs. foetal growth plate. The 36 fragments were sequenced and two groups of genes emerged: (i) genes that can be linked to transcriptional and translational machinery (6), and (ii) genes related to tumor biology (5: *a-tropomyosin, transgelin, annexin 2, phosphatidylethanolamine-binding protein, apolipoprotein D*). The expression pattern of these genes were confirmed with Northern hybridization, and in case of three genes (: *α-tropomyosin, annexin 2, apolipoprotein D*) the expression differences were validated with QRT-PCR. For better gene expression patterns the cell types expressing genes were determined by using *in situ* hybridization. Tissue distribution of the Annexin 2 protein was visualized by using immunolocalization.

We compiled a methodological choreography suitable for studying gene expression patterns of antler tissues. Expression of α -tropomyosin gene was concentrated to the apical mesenchyme cells, and became weak in the lateral mesenchyme. The high expression of the *apolipoprotein D* in the cartilage of antler was localizated in the chondrocytes. The *annexin* 2 mRNA was detected in the mesenchyme, precartilage, and cartilage tissues of developing antler. In addition, the walls of blood vessels also gave a positive signal. The Annexin 2 protein was observed on the periphery of the cells, where associated with cell membrane.

All the α -tropomyosin, transgelin, annexin 2, phosphatidylethanolamine-binding protein, and apolipoprotein D share a common feature: their expression decrease in the formation of malignant tumors. Their overexpression lessens the aggressiveness of malignant tumors. In the apical mesenchyme, the α -tropomyosin and transgelin is important in the control of intensive cell proliferation. Downstream of the pathway, the annexin 2 and phosphatidylethanolamine-binding protein "push" the cells toward chondrogenesis. In the end, the apolipoprotein D is a differentiational marker. Expression of apolipoprotein D in the chondrocytes is a new finding.

We propose functional investigations of genes in tissue cultures derived from different tissues of developing antler, and the exploration of regulatory regions of genes.

Irodalomjegyzék

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.

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

Banks W.J., Newbrey J.W. (1983): Light microscopic studies of the ossification process in developing antlers. 231-260 p. in: Brown R.D.(szerk.): *Antler Development in Cervidae*. Kingsville: Caesar Kleburg Wildlife Research Institute

Barendse W., Armitage SM., Kossareck LM., Shalom A., Kirkpatrick BW *et al.*(1994): A genetic linkage map of the bovine genome *Nature Genet*. 6:227-235.

Bartŏs L, Schams D, Kierdorf U, Fischer K, Bubenik GA, Siler J, Losos S, Tománek M, Lastovková J. (2000): Cyproterone acetate reduced antler growth in surgically castrated fallow deer. J Endocrinol. 164(1):87-95.

Beier F., Ali Z., Mok D., Taylor A.C., Leask T., Albanese C., Pestell R.G., LuValle P. (2001): TGFβ and PTHrP control chondrocyte proliferation by activating cyclin D1 expression. Molecular Biology of the Cell, 12:3852-3863.

Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS (1997): SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. Nat. Genet. 16:174-178.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrugghe B. (1999): Sox9 is required for cartilage formation. Nat. Genet. 22: 85-89

Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J., Chapman VN., Moriwaki K. (1984): Biochemical diversity and evolution in genus *Mus. Biochem. Genet* 22:257-303.

Borsy A., Podani J, Stéger V, Balla B., Horváth A., Kósa JP., Gyurján Jr. I., Molnár A., Szabolcsi Z., Szabó L, Jakó E., Zomborszky Z., Nagy J, Semsey S., Vellai T, Lakatos P., Orosz L. (2008):

Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (submitted)

Boyles JK, Notterpek LM, Wardell MR, Rall SC Jr. (1990b): Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat. *J Lipid Res*. (12):2243-56.

Boyles JK, Notterpek LM, Anderson LJ. (1990a): Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem.* 265(29):17805-15.

Brehm A. (2003): Az állatok világa. 15. fejezet: Gímszarvasok (Cervus L.) http://mek.oszk.hu/03400/03408/html/200.html

Bridgewater LC, Lefebvre V, de Combrugghe B (1998): Chondrocyte-specific enhancer elements int he Coll1a2 gene resemble the Coll2a1 tissue-specific enhancer. *J. Biol. Chem.* 273: 14998-15006.

Britto, J.A., Evans, R.D., Hayward, R.D., and Jones, B.M. (2001): From genotype to phenotype: The differential expression of FGF, FGFR, and TGF genes characterizes human cranioskeletal development and reflects clinical presentation in FGFR syndromes. *Plast. Reconstr. Surg.* **108**: 2026–2046.

Brockes JP. (1998): Regeneration and cancer. Biochim. Biophys. Acta 1377:M1-11

Brown RD, Cowan RL, Kavanaugh JF. (1978): Effect of pinealectomy on seasonal androgen titers, antler growth and feed intake in white-tailed deer. *J Anim Sci.* 47(2):435-40.

Bubenik G. (1983): The endocrine regulation of the antler cycle. . in: Brown R.D.(szerk.): *Antler Development in Cervidae*. Kingsville: Caesar Kleburg Wildlife Research Institute

Bubenik G.A. (1990): Neuroendocrine regulation of the antler cycle. In: Horns, Pronghorns and Antlers. (Bubenik, G. A., A. B. Bubenik, szerk.). Springer Verlag, New York, USA, pp. 261-293.

Bubenik GA, Miller KV, Lister AL, Osborn DA, Bartos L, van der Kraak GJ. (2005): Testosterone and estradiol concentrations in serum, velvet skin, and growing antler bone of male white-tailed deer. *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol.* 303(3):186-92.

Bubenik, GA. (2006): Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle *Vet. arhiv* 76, S275-S285.

Cash DE., Bock CB., Schugart K., Linney E. & Underhill TM. (1997): Retinoic acid receptor α function in vertebrate limb skeletogenesis: a modulator of chondrogenesis. *J. Cell Biol.* 136:445–457.

Chapman DL. (1975): Antlers – bones of contention. Mammal. Rev. 5:121-172.

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

Chung, C. és Erickson, H. (1994). Cell surface annexin II is high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J. Cell Biol.* 126, No. 2, 539-548.

Clark D, Haines SR, Lord EA, Wang W, Suttie JM (2004): Antler and angiogenesis. In *Antler Science and Product Technology* 2 Suttie JM (ed).

Cohen, Jr., M.M. (2000): Fibroblast growth factor receptor mutations. In *Craniosynostosis, diagnosis, evaluation, and management* (eds. M.M. Cohen, Jr. and R.E. MacLean), pp. 77–94. Oxford University Press, New York.

Creutz, C. E. (1992): The annexins and exocytosis. Science 258, 924-931.

de Gortari MJ., et al. (1998): A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mamm. Genome* 9:204-209.

Delezoide, A.L., Benoistlasselin, C., Legeaimallet, L., Lemerrer, M., Munnich, A., Vekemans, M., and Bonaventure, J. (1998): Spatio-temporal expression of Fgfr 1, 2 and 3genes during human embryo-fetal ossification. *Mech. Dev.* **77:** 19–30.

Díez-Itza I, Vizoso F, Merino AM, Sánchez LM, Tolivia J, Fernández J, Ruibal A, López-Otín C. (1994): Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am J Pathol*. 144(2):310-20.

Dolle P., Ruberte E., Kastner P., Petkovich M., Stoner CM., Gudas LJ. és Chambon P. (1989): Differential expression of genes encoding α , β and γ retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature* 342, 702–704.

Drust DS. & Creutz CE. (1988): Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 331, 88-91.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): OSF2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:1–20

Faucheux C. és Price JS. (1999): Parathyroid hormone-related peptide may play a role in deer antler regeneration. In *Calcium metabolism: comparative endocrinology* (ed. J. Danks, C. Dacke, G. Flik & C. Gay), pp. 131–138. Bristol: BioScientifica Ltd

Faucheux C., Nesbitt SA., Horton MA. & Price JS. (2001): Cells in regenerating deer antler cartilage provide a microenvironment that supports osteoclast differentiation. *J. Exp. Biol.* 204:443–455.

Faucheux C., Horton MA. & Price JS. (2002): Nuclear localisation of type I PTH/PTHrP receptors in deer antler osteoclasts: evidence for PTHrP and RANKL-dependent effects on osteoclast formation in regenerating mammalian bone. *J. Bone Miner. Res.* 17:455–464.

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.

Faure, A., Migne, C., Devilliers, G. and Ayala-Sanmartin, J. (2002): Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: Possible mechanisms of annexin release. *Exp. Cell Res.* 276, 79-89.

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

Feng JQ., Chen D., Ghosh-Choudhury N., Esparza J., Mundy GR. És Harris S E. (1997): Bone morphogenetic protein 2 transcripts in rapidly developing deer antler tissue contain an extended 5_ non-coding region arising from a distal promoter. *Biochim. Biophys. Acta* 1350:47–52.

Fitzpatrick, S., Kassam, G., Choi, K., Kang, H., Fogg, D. and Waisman, D. (2000): Regulation of plasmin activity by annexin II tetramer. *Biochemistry* 39, 1021-1028.

Francis SM. és 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.

Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, Keller ET (2003): Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 95:878–889

Gerke V. és Moss S. (2002): Annexins: from structure and function. Physiol. Rev. 82:331-371

Gillette J.M., és Nielsen-Preiss S.M. (2004): The role of annexin 2 in osteoblastic mineralization. *J. Cell Sci.* 117:441-449

Gillette JM, Chan DC, Nielsen-Preiss SM (2004): Annexin 2 expression is reduced in human osteosarcoma metastases. J Cell Biochem 92:820–832

Gong Y. et al. (2001): LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513–523.

Goodwin L.O., Lees-Miller J.P. Leonard M.A., Cheley S.B. and Helfman D.M. (1991): Four fibroblast tropomyosin isoforms are expressed from the rat α -tropomyosin gene via alternative mRNA splicing and the use of two promoters. *J. Bio. Chem* 266:8408-8415

Goss RJ.(1983): Deer Antler: Regeneration, Evolution and Function. New York: Academic Press

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

van de Graaf, S., Hoenderop, J., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B., Bindels, R. et al. (2003). Functional expression of the epithelial Ca+2 channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* 22, 1478-1487.

Gu L., Mo E., Yang Z., Zhu X., Fang Z., Sun B., Wang C., Bao J., Sung C. (2007): Expression and localization of insulin-like growth factor-I in four parts of the red deer antler. *Growth Factor* 25(4):264-279.

Gyurján I. (2007): A mezenchimális sejt-differenciáció tanulmányozása gímszarvas (*Cervus elaphus*) agancsán. Doktori (PhD) értekezés, Gödöllő

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

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

Harder, T., Kellner, R., Parton, R. and Gruenber, J. (1997): Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol. Cell. Biol.* 8, 533-545.

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

Horton C. és Maden M. (1995): Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in the mouse embryo. *Devl Dynam.* 202:312–323.

Hung IH, Yu K, Lavine KJ, Ornitz DM. (2007): FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Dev Biol.* 15;307(2):300-13

Ionescu AM, Schwarz EM, Vinson C, Puzas JE, Rosier R, Reynolds PR és O'Keefe RJ (2001): PTHrP Modulates Chondrocyte Differentiation through AP-1 and CREB Signaling *J. Biol. Chem.* 276:11639–11647

Jiang XB., Iseki S., Maxson RE., Sucov HM:, Morriss-Kay GM. (2002): Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. Dev. Biol. 241:106-116.

Justen, H., Grunewald, E., Totzke, G., Gouni-Berthold, I., Sachinidis, A., Wessinghage, D., Vetter, H., Schulze-Ostoff, K. and Ko, Y. (2000): Differential gene expression in synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Mol. Cell. Biol. Res. Comm.* 3, 165-172.

Karsenty G. (2001): Chondrogenesis just ain't what it used to be. J. Clin. Invest. 107:405-407.

Keller ET, Fu Z, Brennen M (2005): The biology of prostate cancer metastasis suppressor protein: Raf kinase inhibitor protein. *J Cell Biochem* 94:273–278

Kierdorf U., Stoffels E., Stoffels D., Kierdorf H., Szuwart T. és Clemen G. (2003): Histological studies of bone formation during pedicle restoration and early antler regeneration in roe deer and fallow deer. *Anat Rec.* A **273**, 741–751.

Kim IS., Otto F, Zabel B., Mundlos S (1999): Regulation of chondrocyte differentiation by *Cbfa*. *Mechanisms of Development* 80:159–170

Kirsch T, Harrison G, Golub EE, Nah HD (2000a): 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.

Kirsch, T., Swoboda, B. and Nah, H. D. (2000b): Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 294-302.

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.

Koyama E., Golden EB., Kirsch T., Adams SL., Chandraratna RAS., Michaille J.-J. és Pacifici M. (1999): Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis. *Devl Biol.* 208:375–391.

Kressler D, Linder P, Cruz J (1999): Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:7897–7912

Kroslak T, Koch T, Kahl E, Hollt V. (2001): Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J Biol Chem* ;276(43):39772–8.

Kundu M, Javed A, Jeon JP, et al. (2002): Cbfbeta interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nat. Genet.* 32: 639–644.

Lai AK., Hou WL., Verdon DJ., Nicholson LF., Barling PM. (2007): The distribution of the growth factors FGF-2 and VEGF, and their receptors, in growing red deer antler. *Tissue Cell* (1):35-46.

Langub MC., Monier-Faugere MC., Qi Q., Geng Z., Koszewski NJ. & Malluche HH. (2001): Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide type 1 receptor in human bone. *J. Bone Miner. Res.* 16:448–456.

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.

Lawson, D.; Harrison, M.; Shapland, C. (1997): Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22alpha are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38: 250-257.

Lees-Miller, J. P.; Heeley, D. H.; Smillie, L. B.; Kay, C. M. (1987): Isolation and characterization of an abundant and novel 22-kDa protein (SM22) from chicken gizzard smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 262: 2988-2993.

Lees-Miller, J. P.; Helfman, D. M. (1991): The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *BioEssays* 13: 429-437.

Lewis LK, Barrell GK. (1994): Regional distribution of estradiol receptors in growing antlers. *Steroids*. 59(8):490-2.

Li C, Suttie JM. (1994): Light microscopic studies of pedicle and early first antler development in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat Rec.* 239(2):198-215.

Li C. és Suttie JM. (2000): Histological studies of pedicle skin formation and its transformation to antler velvet in red deer (*Cervus elaphus*) Anat.Rec. 260:62–71

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

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

Li C., Suttie JM., Clark DE. (2005): Histological examination of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat Rec* 282A:163-174

Lincoln, GA. (1973): Appearance of antler pedicles in early foetal life in red deer. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **29**, 431–437.

Little RD. et al. (2002): A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am. J. Hum. Genet.* 70:11–19.

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

Long F,Chung UI., Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP. (2004): Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131 (2004) 1309–1318

López-Boado YS, Tolivia J, López-Otín C. (1994): Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 269(43):26871-8.

Lord EA., Stanton J.-AL., Martin SK., Li C., Clark DE. & Suttie JM. (2001): Characterisation of genes expressed in the growing velvet antler tip of red deer (*Cervus elaphus*). In *Antler science and product technology* (ed. J. S. Sim, H. H. Sunwoo, R. J. Hudson & B. T. Jeon), pp. 189–199.

Lowson D, Harrison M, Shapland C (1997): Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22-alpha are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines. *Cell Motil Cytoskeleton* 38:250–257

Mahadev K, Ravel G, Bharadwaj S, Willingham MC, Lange EM, Vonderhaar B, Salomon D, Prasad GL (2002): Suppression of the transformed phenotype of breast cancer by tropomyosin-1. Exp Cell Res 279:40–51

Mai, J., Waisman, D. és Sloane, B. (2000): Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 215-230.

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

McConathy WJ és Alaupovic P (1973): Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett* 37:178–182

Minina, E., Wenzel, H.M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A.P., and Vortkamp, A. (2001): BMP and Ihh/PTHrP signaling to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development 128*: 4523–4534.

Minina E, Kreschel C, Naski MC,Ornitz DM, és Vortkamp1 A. (2002): Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Developmental Cell*, 3:439–449,
Morris JM. És Bubenik, GA (1982): The effect of androgens on the development of antler bone. In: Antler development in Cervidae. (Brown, R. D., szerk.). Caesar Kleberg Wildl. Res. Inst., Kingsville, TX, USA, pp. 123-141.

Muenke, M. és Schell, U. (1995): Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends. Genet.* **11**: 308–313.

Mundlos S. (1994): Expression patterns of matrix genes during human skeletal development. *Prog Histochem Cytochem.* 28(3):1-47.

Mundy GR., Gutierrez G., Gallwitz W., Feng J., Chen D., Garrett R. & Harris S. (2001): Antlerderived bone growth factors and their potential for use in osteoporosis. In *Antler science and product technology* (ed. J. S. Sim, H. H. Sunwoo, R. J. Hudson & B. T. Jeon), pp. 171–187. Edmonton, Canada: Antler Science and Production Technology Research Centre.

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 M., Nakayama T., Ohtsuru A., Fukada E., Niino D., Yamazumi K., Naito S., Ito M. & Sekine I. (2003): Expression of parathyroid hormone (PTH)-related peptide (PthrP) and PTH/PTHrP receptor in osteoclast-like giant cells. *Pathol. Res. Pract.* 199:85–92.

Navarro A, Del Valle E, Tolivia J (2004): Differential expression of apolipoprotein D in human astroglial and oligodendroglial cells. *Histochem Cytochem*. 52(8):1031-1036.

Nishida, W.; Kitami, Y.; Abe, M.; Hiwada, K. (1991): Gene cloning and nucleotide sequence of SM22-alpha from the chicken gizzard smooth muscle. *Biochem. Int.* 23: 663-668.

Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y (1993): PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *drosophila* runt gene and the human *AML1* gene. *Proc Natl Acad Sci* 90:6859–6863

Ornitz, D.M. és Marie, P.J. (2002): FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease.*Genes Dev.* 16(12):1446-65.

Ornitz, D.M., J. Xu, J.S. Colvin, D.G. McEwen, C.A. MacArthur, F., Coulier, G. Gao, and M. Goldfarb. (1996): Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* **271**: 15292–15297.

Pawlak G., Helfman DM. (2001): Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 41-47.

Prasad GL, Fuldner RA, Cooper HL.(1993): Expression of transduced tropomyosin 1 cDNA suppresses neoplastic growth of cells transformed by the ras oncogene. *Proc Natl Acad Sci* 90(15):7039-43.

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-I. *J Endocrinol* 143:R9–R16.

Price JS., Oyajobi BO., Nalin AM., Frazer A., Russell RGG. and 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 hybridisation and immunocytochemistry. *Dev. Dynamics* 203, 332–347.

Price J., Allen S. (2004): Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 359:809-822

Price JS, Allen S, Faucheux C, Althnaian T, Mount JG. (2005): Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals? *Journal of Anatomy* 207(5):603-18.

Provost PR, Marcel YL, Milne RW, Weech PK, Rassart E. (1991a): Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Lett*. 23;290(1-2):139-41.

Provost PR, Weech PK, Tremblay NM, Marcel YL, Rassart E. (1991b): Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J Lipid Res.* 31(11):2057-65.

Provot S., Schipani E. (2005): Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328:658–665 Putman R. (1989): The Natural History of Deer. In: The Natural History of Mammals (Helm C. szerk.) London, Cornell University Press.

Rapraeger A.C. (1995): In the clutches of proteoglycans: How does heparan sulfate regulate FGF binding? *Chem. Biol.***2:** 645–649.

Rassart E., Bedirian A., Carmo S.D., Guinard O., Sirois J., Terrisse L., Milne R. (2000): Apolipoprotein D. *Biochim. Biophys.* Acta 1482:185-198

Reiter RJ. (1991): Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. Endocrinol. Rev. 12, 151-180.

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 tissueand developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene. *Biochem. J.* 389: 705-716.

Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeal-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J.-M., Maroteaux, P., Le Merrer, M., and Munnich, A. (1994): Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* **371:** 252–254.

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.

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 E.F., Maniatis T. (1989): Methods of Screening. In Nolan C. (szerk.): Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanchez D, Ganforinina MD, Martinez S (2002): Expression pattern of the lipocalin apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 110:225–229

Sanchez LM, Diez-Itza I, Vizoso F, Lopez-Otin C (1992a): Cholesterol and apolipoprotein D in gross cystic disease of the breast. *Clin Chem* 38:695–698

Sanchez LM, Vizoso F, Diez-Itza I, Lopez-Otin C (1992b): Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast cancer diseases. *Cancer Res* 52:95–100

Scadding SR. és Maden M. (1994): Retinoic acid gradients: during limb regeneration. *Devl Biol.* 162:608–617.

Seguin D, Desforges M, Rassart E (1995): Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Brain Res Mol Brain Res* 30:242–250

Sekiya I, Tsuji K, Koopman P., Sekiya I, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M (2000): Sox9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is upregulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line TC6. *J. Biol. Chem.* 275: 10738-10744.

Shapland, C.; Lowings, P.; Lawson, D. (1988): Identification of new actin-associated polypeptides that are modified by viral transformation and changes in cell shape. *J. Cell Biol.* 107: 153-161.

Shapland, C.; Hsuan, J. J.; Totty, N. F.; Lawson, D. (1993): Purification and properties of transgelin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein. *J. Cell Biol.* 121: 1065-1073.

Shields JM, Rogers-Graham K, Der CJ (2002): Loss of transgelin in breast and colon tumors and in RIE-1 cells by Ras deregulation of gene expression through Raf-independent pathways. *J Biol Chem* 277:9790–9799

Simard J, Dauvois S, Haagensen DE, Lévesque C, Mérand Y, Labrie F. (1990): Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDFP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer. *Endocrinology*. 126(6):3223-31.

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 Crombrugghe B, Lefebvre V. (2001): The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. Dev. Cell 1:277-290.

St. Jacques B., Hammerschmidt M. and McMahon AP. (1999): Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13, 2072-2086.

Szentágothai J és Réthelyi M. (1985): Funkcionális anatómia. Medicina Könyvkiadó, 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.

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.

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 Z. (1988): Karyotypes of deer. New scientific, Peking, Kína

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

Warren RH.(1997): TGF-alpha-induced breakdown of stress fibers and degradation of tropomyosin in NRK cells is blocked by a proteasome inhibitor. Exp Cell Res. 236(1):294-303.

Weech PK, Provost P, Tremblay NM, Camato RN, Milne RW, Marcel YL, Rassart E. (1991): Apolipoprotein D--an atypical apolipoprotein. *Prog Lipid Res.*;30(2-3):259-66.

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.

Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W.(1999): Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401(6749):173-7.

Yeung K, Janosch P, McFerran B, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W. (2000): Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signalregulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* ;20(9):3079–85.

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.

Zelzer E., Glotzer DJ., Hartmann C., Thomas D., Fukai N., Soker S., Olsen BR (2001): Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2., *Mech. Dev.* 106:97–106

Zhu, S.; Si, M.-L.; Wu, H.; Mo, Y.-Y. (2007): MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J. Biol. Chem.* 282: 14328-14336.

Saját közlemények

Lektorált, idegen nyelvű cikk

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

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

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

Konferencia kiadvány:

Nemzetközi konferencia:

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

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

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

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

Hazai konferencia:

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

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

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

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

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

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

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Orosz László Tanár Úrnak a szakmai irányításért, a sokrétű képzésemért és a munka anyagi hátterének a biztosításáért.

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

Köszönet illeti munkatársaimat Stéger Viktort, Gyurján Istvánt, Borsy Adriennt és Ferenczi Szilamért a felvetődött problémák megoldásában nyújtott segítségeküért.

Külön köszönöm Dr. Deák Ferencnek, Dr. Korpos Évának, Dr. Kiss Ibolyának és Dr Péceli Péternek a szövettani technikák elsajátításában nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Dr. Zomborszky Zoltánnak és Dr. Nagy Jánosnak a mintagyűjtésben nyújtott segítségüket.

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