

# A génexpresszió változásai és patogenetikai jelentőségük fibrosus dysplasiás és nem fibrosus dysplasiás nők csontszövetében

KISS JÁNOS DR.<sup>1</sup> ■ BALLA BERNADETT DR.<sup>2</sup>

KÓSA P. JÁNOS DR.<sup>2</sup> ■ BORSY ADRIENN<sup>3, 4</sup> ■ PODANI JÁNOS<sup>3, 4</sup>

TAKÁCS ISTVÁN DR.<sup>2</sup> ■ LAZÁRY ÁRON DR.<sup>2</sup> ■ NAGY ZSOLT DR.<sup>2</sup>

BÁCSI KRISZTIÁN DR.<sup>2</sup> ■ SZLÁVY ESZTER DR.<sup>1</sup> ■ SZENDRŐI MIKLÓS DR.<sup>1</sup>

SPEER GÁBOR DR.<sup>2</sup> ■ OROSZ LÁSZLÓ<sup>3, 4</sup> ■ LAKATOS PÉTER DR.<sup>2</sup>

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, <sup>1</sup>Ortopédiai Klinika, <sup>2</sup>I. Belgyógyászati Klinika, Budapest

<sup>3</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest

<sup>4</sup>Gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő

A fibrosus dysplasia a csontok benignus, tumorszerű elváltozása, amelyre az örvényes lefutású kötőszöveti nyálak és az érett-éretlen csontgerendák jellemzőek. A jelátvivő G-fehérje  $\alpha$ -alegységét kódoló GNAS1 gén pontmutációja okozta fejlődési zavarról, az osteoblastok kóros differenciálódásáról van szó, amelynek következtében az érett csontszövet helyét rostos kötőszövet foglalja el. A szerzők célja a fibrosus és a nem fibrosus szövetben eltérően kifejeződő egyedi gének meghatározása volt, és leírni a közöttük lévő összefüggéseket multiparaméteres statisztikai analízisek segítségével. *Módszer:* Hat fibrosus dysplasiás és hét nem fibrosus dysplasiás nőbeteg csontmintáit vizsgálták. A hat fibrosus dysplasiás nőbeteg mintája magából a fibrosus elváltozástól származott, míg a hét nem fibrosus dysplasiás kontrollcsontmintát csípőprotézis-beültetés során, a combnyakból vették. A 118 kiválasztott gén expressziós különbségeit TaqMan-próbaalapú kvantitatív valós idejű PCR-technikával mérték. *Eredmények:* A Mann-Whitney-féle U-teszt 27 gén esetében mutatott szignifikáns eltérő ( $p \leq 0,05$ ) expressziós különbséget a fibrosus dysplasiás és a nem fibrosus dysplasiás egyénekben. A fibrosus dysplasiás betegeknél kilenc gén kifejeződése szignifikánsan fokozott volt, további 18 gén esetén jelentős génkifejeződés-csökkenést mértek. Ezek a szignifikáns különbséggel szabályozódó gének elsősorban minor kollagén molekulákat, extracelluláris mátrixot bontó enzimeket, transzkripciós faktorokat, adhéziós molekulákat, növekedési faktorokat, gyulladást serkentő citokineket és lipidanyagcserehez kapcsolt faktorokat kódolnak. A diszkriminanciaanalízis megmutatta, hogy a fibrosus dysplasiás és a nem fibrosus dysplasiás csontszövet megkülönböztethető részben a G-proteinhez kapcsolt számos gén, a BMP-kaskád komponenseinek és az extracelluláris mátrixhoz kötődő molekulákat kódoló gének eltérő transzkripciós profilja alapján. *Következtetések:* A fibrosus dysplasiában szignifikánsan eltérő génkifejeződési mintázatok feltárása további segítséget adhat a csontszövet fibrosus átalakulásának és a kórfolyamat hátterének megismerésében. Orv. Hetil., 2010, 40, 1656–1665.

**Kulcsszavak:** fibrosus dysplasia, humán csontszövet, transzkripciós profil, diszkriminanciaanalízis

## Changes of gene expression and its role in pathogenesis in fibrous and non-fibrous dysplastic bone tissues in women

Fibrous dysplasia is an isolated skeletal disorder caused by a somatic activating mutation of GNAS1 gene with abnormal unmineralized matrix overproduction and extensive undifferentiated bone cell accumulation in fibro-osseous lesions. The aim of the investigation was to identify genes that are differently expressed in fibrous vs. non-fibrous human bone and to describe the relationships between these genes using multivariate data analysis. *Materials and Methods:* Six bone tissue samples from fibrous dysplastic female patients and 7 bone tissue samples from non-fibrous dysplastic women were examined. The 6 female fibrous samples were taken from the fibrous dysplastic lesion itself while the control samples of 7 non-fibrous dysplastic females were taken from the femoral neck during the hip replacement procedure. The expression differences of selected 118 genes were analyzed in TaqMan probe based quantitative real-time RT-PCR system. *Results:* The Mann-Whitney U test indicated significant differences in the expression of 27 genes of fibrous dysplastic and non fibrous dysplastic individuals ( $p \leq 0.05$ ). Nine genes were significantly up-regulated in fibrous dysplastic women compared to non fibrous dysplastic ones and eighteen genes showed a down-regulated pattern. These significantly altered genes coding for minor collagen molecules, extracellular matrix digesting enzymes, transcription factors, adhesion molecules, growth factors, pro-inflammatory cytokines and lipid metabolism-affected substrates. Canonical variety analysis demon-

strated that fibrous dysplastic and non fibrous dysplastic bone tissues can be distinguished by the multiple expression profile analysis of numerous genes controlled via a G-protein coupled pathway and BMP cascade as well as genes coding for extracellular matrix composing molecules. **Conclusions:** The significantly altered gene expression profile observed in the fibrous dysplastic human bone tissue may provide further insight into the pathogenetic process of fibrous degeneration of bone. *Orv. Hetil.*, 2010, 40, 1656–1665.

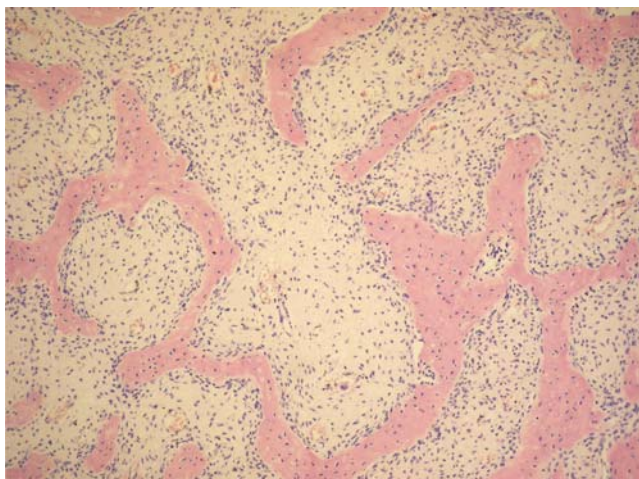
**Keywords:** fibrous dysplasia, human bone tissue, transcriptional profiling, canonical variety analysis

(Beérkezett: 2010. augusztus 1., elfogadva: 2010. augusztus 24.)

#### Rövidítések

AAOS = American Academy of Orthopaedic Surgeon; AP-1 = aktiváló fehérje 1; cAMP = ciklikus adenozin-3',5'-monofoszfát; CREB = cAMP-response element binding; CVA = (canonical variates analysis) diszkriminanciaanalízis; FD = fibrosus dysplasia; ECM = extracelluláris mátrix; IL-6 = interleukin-6; MAPK = mitogénaktivált proteinkináz; PDGFB = vérlemezke-eredetű növekedési faktor; PKA = proteinkináz-A

A fibrosus dysplasia (FD) a csontok tumorszerű elváltozása. Megjelenése formájában érintet egy csontot (monoostoticus forma) és több csontot (polyostoticus forma), főleg az utóbbi formánál jellemző a fájdalom, csontdeformitások, és patológiás törés is előfordul. Jellemző szövettani képét az 1. ábra mutatja. A dysplasiás csont a fokálisan képződő nagyobb mennyiségű fibrosus szövet miatt radiológiailag kiszélesedhet, a corticalis elvékonyodik és a velőüregben elhelyezkedő defektus osteolyticus vagy „tejüvegszerűen” opálos megjelenést ad (2. ábra) [1]. Nagyon jellemző – nagy kiterjedésű, progresszív vagy polyostoticus formáknál – a proximális femurvég pásztorbatszerű elgörbülése, varusba hajlása (3. ábra), a tibia kardhüvelyszerű deformitása, illetve



1. ábra

Az FD szövettani képére jellemző, hogy érett csontgerendák között éretlen, örvényes lefutásban rendeződő kötőszövetes nyálábokat látunk. Az éretlen csonttrabeculák kerek, vaskosak, alig mineralizált osteoid szegéllyel. Nem tartalmazzák a normális trabeculák cementvonalát, az osteocyták lagunái a mátrixban nagyobbak, mint normálisan, ezért a dysplasiás csont hasonlít a magzati csontra

craniofacialis deformitások a koponya- és arccsontokat érintő formánál.

Jól ismert tény, hogy a fibrosus dysplasia genetikai okra vezethető vissza, azonban nem öröklött, hanem szerzett betegség. A fibrosus dysplasiát egy, a sejtmembránhoz kötött jelátvivő molekula, a G-protein alfa-stimulációs alegységét ( $G_{\alpha}$ ) kódoló *GNAS1* gén aktiválta, szomatikus mutációja okozza. Ennek eredménye pedig a sejten belül tartósan megemelkedő ciklikus adenozin-3',5'-monofoszfát- (*cAMP*-) szint lesz. A folyamatot a *GNAS1* gén 201-es vagy 208-as pozíciójában létrejött pontmutáció okozza, amely a fehérjében arginin-hisztidin vagy arginin-cisztein aminosavcsere eredményez [2, 3]. A *cAMP* a sejtekben általánosan előforduló másodlagos hírvivő molekula, számos sejt-



2. ábra

| Jellemzően tejüvegszerű, opálos denzitás a tibia diaphysisén



3. ábra | A csont corticalisa elvékonyodik, a velőüreg „felfúvódik”, jellemző a femur nyakának pásztorbatszerű varusba hajlása

életteni folyamatot szabályoz, és szerepe van több kulcsfontosságú jelátviteli út működésében is. A cAMP a proteinkináz-A (PKA) molekula foszforilációján keresztül fejt ki a hatását, aktiválja a CREB (cAMP-response element binding) fehérjecsalád elemeit, amelyek döntő mediátorai a cAMP-függő génátíródsági folyamatoknak [4].

A mutáció következtében fokozott mennyiségben jönnek létre osteoblast-prekursorok, amelynek következtében rendezetlen fibrosusmátrix képződik a csontvelőben. A nem megfelelően differenciálódott csontsejtek és a mátrix felhalmozódása alakítja ki a minőségében abnormális csontszövetet FD-ben [1, 5]. Az aktivált *Gsa*-mutációt hordozó oszteoprogenitor sejtekben több gén aktivitásának megváltozását, illetve a jelátviteli út zavarát találták. Az osteoblast-prekursor sejtekben a *Gsa* protein emeli a *c-fos* és egyéb proto-onkogének kifejeződését. A *fos* és *jun* fehérjék összekapcsolódva a heterodimer komplex aktivátor fehérjét (AP-1) alakítják ki, amelynek kifejeződése szintén fokozott az osteoblastok érésének proliferatív fázisában [1, 6]. Ezek az abnormálisan érő osteoblastok a cAMP-rendszeren keresztül fokozott mértékben expresszálnak interleukin-6-ot (*IL-6*), vérlemezke-ere-

detű növekedési faktort (*PDGFB*) és nemi hormonreceptorokat, amelyek fontos szerepet játszanak az osteoclastok aktivációjában [1, 7]. A citoplazma emelkedett cAMP-szintje csökkenti az osteoblast-specifikus transzkripciós faktor (*RUNX2*) életidejét, hozzájárulva a nem megfelelő sejt differenciáció folyamatához.

A fentiekben említettekén túl azonban nincs további elérhető adat a humán FD-csontszövet mRNS-expressziós profiljáról. Jelen munka célja egyrészt, hogy vizsgálja a csontmetabolizmusban szerepet játszó gének komplex kifejeződési mintázatát a fibrosus dysplasia kórfolyamatában, másrészt, hogy kimutassa a fibrosus dysplasiás (FD) és a nem fibrosus dysplasiás (non FD) csontminták génkifejeződési különbségeit multiparaméteres statisztikai analízis felhasználásával.

## Anyag és módszerek

### Humán csontszöveti minták

Az FD-csoportban hat, egymást követő eset során felismert, egymással kapcsolatban nem lévő, monoostoticus formában megbetegedett nőbeteg csontmintáinak génexpressziós profilját vizsgáltuk. A betegséget és annak monoostoticus jellegét a panaszok alapján indított röntgenvizsgálatokkal és ennek során indikált biopsziás vizsgálattal igazoltuk. A csontminták a beteg előzetes felvilágosítása és beleegyezése után kerültek vizsgálatra. A beválogatásból kizártuk a McCune–Albright-szindrómás (FD mellett a bőrön café-au-lait foltok és/vagy pubertas praecox) és a Mazabraud-szindrómás betegeket (FD és intramuscularis myxoma együttes megjelenése).

A kontrollcsoportot hét, fibrosus dysplasiában nem szenvedő nőbeteg csontmintája alkotta. A csontmintákat a betegek előzetes felvilágosítása és beleegyezése után, csípőízületi endoprotézis beültetése során eltávolított combfejből, annak spongiosus állományából nyertük. A primer coxarthrosis állapota érdemben nem befolyásolja a combfejből kivett spongiosus csont kvalitatív és kvantitatív szerkezetét. A tervezett műtét előtt 1-2 nappal történt csontsűrűség-vizsgálat (oszteodenzitometria – ODM), amelynek alapján ezen betegeknél az osteoporosis is kizártuk. Az ODM-vizsgálatokat dual abszorpciometriás elven működő denzitométerrel végeztük (DPX-L, Lunar Corp. Madison, WI, Amerikai Egyesült Államok). A sebészi úton kinyert csontminták foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) történő átmosás után – tisztítás vértől és egyéb velőüregi elemektől – folyékony nitrogénbe kerültek.

A munka a Semmelweis Egyetem Tudományos Kutatási Etikai Bizottsága engedélyével zajlott (6392-1/2004-1018EKU). Minden beteg előzetes felvilágosítást kapott és aláírásával járult hozzá a csontminták feldolgozásához.

## Direkt messenger RNS szeparálása csontból

A humán csontmintákat (átlagosan 500 mg) folyékony nitrogén alatt elporítottuk freezer-mill 6750 készülék segítségével (SPEX Certiprep Inc., NJ, Amerikai Egyesült Államok). Az RNS-izolálást Dynabeads Oligo (dt)<sub>25</sub> kit (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norvégia) felhasználásával végeztük. Az elporított mintához 5 ml lysis/binding puffert adtunk, majd 9000 rpm-cel, 15 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A szeparálódott, nukleinsavakat tartalmazó középső réteget 1 ml oligo-dt-vel borított paramagnetikus partikulumokat tartalmazó oldathoz adtuk. Ez után az mRNS-t 2 µl DN-áz I. enzimmel (Promega, Madison, WI, Amerikai Egyesült Államok) kezeltük 20 percig, 37 °C-on 80 U RN-azin RN-áz inhibitor (Promega) jelenlétében. Az mRNS tisztítását a NucleoSpin RNA Clean-up kit-ben (Macherey-Nagel, Düren, Németország) található pufferezett segítségével a gyártók előírása szerint végeztük. A tisztított mRNS eluálásához 40 µl RN-áz-mentes vizet használtunk. A tiszta mRNS minőségét és mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE, Amerikai Egyesült Államok) ellenőriztük 260/280 nm hullámhossztartományon. 15 µl humán mRNS-t cDNS-re fordítottunk át a reverz transzkripció (RT-PCR) során, amelyhez 200 U SuperScriptIII RN-áz H reverz transzkriptázt (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok), 125 ng random primert (Promega) és 40 U RNaseOUT ribonukleáz inhibitor (Invitrogen Life Technologies) használtunk 30 µl végtérfogóban.

## A kvantitatív valós idejű RT-PCR és a két betegcsoport adatainak statisztikai összehasonlítása

A real-time RT-PCR technika alkalmazásával olyan géneket vizsgáltunk, amelyeknek feltételezetten szerepe van – változó kifejeződési aktivitással – az osteogenesisben és a csontmetabolizmusban. Az FD-s és nem FD-s csontszövetek génexpressziós mintázatának összehasonlítására irodalmi adatok alapján, on-line adatbázisok segítségével (www.pubmed.com, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>) választottunk ki 118 gént [8]. A vizsgáltak közül 21 gén a közös TGF- $\beta$ /BMP jelátviteli út szabályozója, 6 gén a Wingless (Wnt) kaszkádból ismert, 23 gén az extracelluláris mátrix (ECM) komponense, 8 gén az ECM degradációjában vesz részt, 12 gén növekedési faktorokat, 5 gén adhéziós molekulákat, 11 gén transzkripció faktorokat kódol. További 5 gén a lipidanyagcserében érintett, 12 gén az ösztrogén szabályozása alatt áll. Hat gén a csontsűrűség (bone mineral density – BMD) változásához kapcsolt, 9 gént

pedig saját megelőző microarray vizsgálataink alapján válogattunk ki.

Előre megtervezett és validált génspecifikus TaqMan-próbaalapú génexpressziós assay-t használtunk az Applied Biosystemstől (Applied Biosystems, Foster City, CA, Amerikai Egyesült Államok), ahol minden génspecifikus TaqMan szett tartalmazott egy 5' irányú és egy 3' irányú primert, valamint egy fluoreszcens jelölő molekulával ellátott próbát. A PCR-reakció 20 µl végtérfogóban zajlott, amelynek tartalma volt 1 µl cDNS, 10 µl TaqMan 2× Universal PCR Master Mix NoAmpErase UNG (Applied Biosystems), 1 µl validált génspecifikus TaqMan próba 20× (Applied Biosystems) és 8 µl víz. A kiválasztott 118 gén amplifikálásához ABI Prism 7500 valós idejű PCR (Applied Biosystems) rendszert használtunk. Minden gént 3-3 párhuzamos méréssel vizsgáltunk 96 lyukú lemezekben a következő protokoll szerint: első lépésként 10 perc denaturálás 95 °C-on, majd 70 cikluson keresztül 15 másodperc denaturálás 95 °C-on, 1 perc szintézis 60 °C-on. Általános „house-keeping” géneket (gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz-GAPDH, aktin-béta – ACTB) alkalmaztunk belső kontrollként. A további statisztikai analízisek során a GAPDH-szinteket használtuk a normalizált értékek megadásához, mert irodalmi adatok utalnak arra, hogy osteoblastsejtekben az ösztrogén befolyásolja az ACTB gén kifejeződését. A relatív kvantifikáció kiértékelése az összegyűjtött adatokból (küszöbciklusszámok, Ct) 7500 System SDS software 1.3 (Applied Biosystems) felhasználásával készült. A génspecifikus mRNS relatív mennyiségét (RQ) a gyártó előírása szerint (Applied Biosystems) az átlag  $\Delta$ Ct-értékekből (célgén Ct-értéke – endogén kontrollgén Ct-értéke) számítottuk mind a 118 gén esetén a vizsgált mintacsoportokban. A génexpressziós arányokat az egyes vizsgálati csoportokat alkotó személyek RQ-értékeiből kalkuláltuk (RQ FD/RQ non FD).

Az adatok analíziséhez Windows SPSS 13.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, Amerikai Egyesült Államok) programot használtunk. A statisztikai analízist egyparaméteres Mann-Whitney-féle U-teszt segítségével végeztük. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük azt, ahol a valószínűségi adatok:  $p \leq 0,05$ .

## Diszkriminanciaanalízis (CVA)

A diszkriminanciaelemzés (canonical variates analysis) segítségével egyes eleve megadott géncsoportok közötti elválások maximalizálhatók. Az elemzés eredményei a kanonikus értékek, amelyek koordinátaként használhatók a térbeli ábrázolás során. Két mintacsoport esetén nem rajzolható fel koordináta-rendszer, de a csoportok elválása a kanonikus változók alapján így is felmérhető. Ha a megfigyelések random mintavételezésből származnak, és teljesül a többváltozós normalitás feltétele, akkor a betegcsoportok elválásának szignifikanciája is értékelhető. Ha ezek a feltételek nem teljesül-

nek, a betegcsoportok szeparálódásának mértéke akkor is informatív az adatok szerkezetére vonatkozóan. A CVA igen értékes információt szolgáltat arról, hogy a vizsgálati csoportok egymástól való elkülönülését mely gének magyarázzák elsősorban. A módszer problémája azonban, hogy a változók (gének) száma nem haladhatja meg a vizsgált betegek számát. A kritérium alapján a géneket részhalmozokra osztottuk, és az egyes génszettek diszkriminációs erejét külön-külön vizsgáltuk.

Kilenc géncsoportot definiáltunk különböző osztályozási feltételek alapján. Három génhalmaz kiválasztása, nevezetesen G-protein/csontmarkerek (8 gén) [9, 10, 11], G-protein/ECM (9 gén) [12, 13, 14] és G-protein (növekedési faktorok) (6 gén) [15, 16, 17] azon alapult, hogy ezen gének mindegyike a G-proteinhez kapcsolt jeltovábbító rendszer szabályozása alatt áll. A gének közül 2 halmazt a WNT-hálózat (6 gén) [18] és a BMP-kaszád (8 gén) [19] jelátviteli utak kategorizálásával alakítottunk ki. Két géncsoport eltérő típusú, a csont extracelluláris mátrixát formáló komponens: kollagénfehérjéket (12 gén) és nem kollagénmolekulákat (8 gén) kódol. A membránprotein-csoport 8 génje sejtmembránhoz kötött receptorokat, ioncsatornákat és adhéziós molekulákat kódoló géneket tartalmazott és a Mann-Whitney-féle U-tesztel szignifikánsan eltérő mRNS-expressziót mutatott ( $p \leq 0,05$ ). A fennmaradó csoport 7 olyan gént tartalmazott, amelyek a zsírmétabolizmusban érintettek. A CVA szerinti statisztikai számítások a SYNTAX 2000 programcsomag segítségével készültek [20].

## Eredmények

### A vizsgált betegek

Az FD-s betegek átlagéletkora  $42,8 \pm 13,2$  év, a kontrollcsoport átlagéletkora  $48,0 \pm 3,3$  év volt. Az FD-s és kontrollbetegek klinikai és laboratóriumi adatainak összefoglalását az 1. táblázat mutatja. A két csoportot alkotó

1. táblázat | Az FD-s és a kontroll, nem FD-s betegek klinikai adatainak összehasonlítása. Statisztika: Mann-Whitney-féle U-teszt,  $p \leq 0,05$

	Szórás±SD		p-érték
	FD (n = 6)	Nem FD (n = 7)	
Kor (év)	42,83±13,24	48,00±3,27	0,06
Súly (kg)	66,33±8,91	64,14±11,45	0,43
Magasság (cm)	166,00±4,56	159,14±4,18	0,01
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,06±2,94	25,24±6,12	0,57
Beta-CrossLaps (pg/ml)	279,30±192,81	218,20±55,12	0,89
Oszteokalcin (ng/ml)	21,62±6,16	11,93±2,21	0,006
Parathormon (pg/ml)	28,70±18,38	32,40±12,83	0,32
TSH (μIU/l)	2,09±0,56	2,02±1,13	0,32

személyek között nem volt szignifikáns eltérés az életkor, a dohányzás, a napi kalciumbevitel, az alkoholfogyasztás, a napi koffeinadag, a fizikai aktivitás és a menopauzás állapot tekintetében. A beválogatott betegek nem kaptak szteroidot vagy egyéb biológiai terápiát. Szintén nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a hormonstátusukban sem: szérumszérum-PTH, szérumszérum-TSH. A csontanyagcsere egyik fő markere, a szérumszérumszerteokalcin szintje viszont szignifikánsan ( $p = 0,006$ ) nagyobb volt az FD-s, mint a kontrollcsoportban.

### Az FD-s és a kontrollcsoportba tartozó betegek génexpressziójának összehasonlítása Mann-Whitney-féle U-tesztel

A 2. és 3. táblázat foglalja össze azt a 27 gént, amelyek expressziója szignifikánsan ( $p \leq 0,05$ ) különbözött a vizsgált 13 nőbetegben. Kilenc gén esetében szignifikánsan fokozott kifejeződést figyeltünk meg az FD-s csoportban. Három gén (*COL3A1*, *COL11A1*, *COL12A1*) ECM molekulákat, egy gén pedig (*MMP2*) ECM-et emésztő molekulát kódol. Két génnek (*APOD*, *LRP4*) szerepe van a zsíryanagycsereben. Egy gén (*ACVRI*) a közös TGFB/BMP jelátvivő hálózat tagja, míg egy gén (*TWIST1*) az osteoblast-differenciációban nélkülözhetetlen, és további egy gén (*ATP2A2*) pedig ioncsatorna.

Tizennyolc gén kifejeződése szignifikánsan csökkent az FD-s csoportban. Négy gén (*APOE*, *CD36*, *LRP5*, *FABP4*) a lipidhomeosztázisban szerepel, két gén (*WIF1*, *EIF3S4*) a wingless (WNT) jelúthoz kötődik, négy gén (*IGF1*, *IGF1R*, *PDGFA*, *VEGF*) a MAPK útvonalon szabályozódó növekedési faktorokat kódol. További két gén (*TNF-α*, *IL-1B*) osteoclast-stimulációs citokineket szabályoz, két gén (*ICAM1*, *VCAM1*) adhéziós molekulákat kódol, illetve további kettő az ösztrogénreceptorok mindkét típusát (*ESR1*, *ESR2*) kódoló gének. Az *ENO1/BMP1* gén kifejeződése szintén csökken, míg a mátrixmetalloproteináz-8 (*MMP8*) gén specifikus mRNS teljesen hiányzik az FD-s személyekben.

### Diszkriminanciaanalízis

Diszkriminancia-adatelemzést alkalmaztunk, hogy az FD- és nem FD-csoportokat multidimenzionális térben különítsük el csontszöveti génexpressziós adataik alapján, illetve hogy a vizsgált 118 génből meghatározzuk azokat a géncsoportokat, amelyek a legnagyobb diszkriminációs képességgel rendelkeznek.

Kilenc génhalmazt vizsgáltunk a CVA statisztikai módszerrel (4. ábra). Öt génhalmaz elemei hasonló biológiai funkcióval és hasonló regulációs úttal rendelkeznek, két génhalmaz elemei ECM-et formáló molekulákat kódolnak, egy géncsoport a lipidanyagcsereben szerepel és egy génhalmaz pedig a Mann-Whitney-féle

2. táblázat | Fibrosus dysplasiás csontszövetből származó, a kvantitatív real-time RT-PCR vizsgálattal szignifikánsan fokozott expressziót mutató ( $p \leq 0,05$ ) 9 gén adatainak összefoglalása

ABI Assay azonosítási számok <sup>a</sup>	Génszim-bólum <sup>b</sup>	Génnév <sup>b</sup>	Expressziós arányok <sup>c</sup>	$p$ -érték <sup>d</sup>	Biológiai funkció <sup>e</sup>
Hs00153836_m1	ACVR1	Activin A receptor, I. típus	4,66	0,022	A TGF- $\beta$ család tagja; érintett a fehérjemetabolizmusban, fehérjemodifikációban, -foszforilációban, sejt felszíni receptor mediálta jelátviteli folyamatokban
Hs00155794_m1	APOD	Apolipoprotein D	4,13	0,035	Szállító fehérje, szerepe van a lipid-, zsírsav- és szteroidmetabolizmusban
Hs00155939_m1	ATP2A2	ATP-áz, Ca <sup>2+</sup> -transzporter, szívizom, lassú twitch 2	181,71	0,014	ioncsatorna-működtetés, kationtranszporter, Ca <sup>2+</sup> -homeosztázis, Ca <sup>2+</sup> -t szállít a citoszolból az endoplazmás reticulum lumenébe
Hs00266273_m1	COL11A1	Kollagén XI. típus, alfa-1	18,16	0,008	ECM szerkezeti fehérje, szabályozza a sejtstruktúrát, a sejt motilitást és a sejtadhéziót
Hs00189184_m1	COL12A1	Kollagén XII. típus, alfa-1	15,52	0,005	ECM szerkezeti fehérje, szerepe van a sejt-kommunikációban, a mesoderma és a csontszövet fejlődésében, az I. típusú kollagénmolekulák és a környező mátrix interakciójában
Hs00164103_m1	COL3A1	Kollagén III. típus, alfa-1	2,17	0,051	ECM szerkezeti fehérje, gyakran kapcsolódik I. típusú kollagénhez
Hs00391006_m1	LRP4	Alacsony denzitású lipoproteinreceptor-kapcsolt fehérje-4	4,75	0,014	A Wnt- és BMP-kaszkádkhoz kötött szignálutak szabályozója, szerepe van az embrionális végtagfejlődésben
Hs00234422_m1	MMP2	Mátrixmetalloproteináz-2 (gelatináz-A)	10,74	0,022	Szerepet játszik a normális szöveti ECM átépülésében és a mesoderma kifejlődésének folyamatában
Hs00361186_m1	TWIST1	Twist homológ-1	44,84	0,014	Helix-loop-helix típusú transzkripciósfaktor, a sejtéresi vonalak meghatározásában és a sejt differenciációban van szerepe

<sup>a</sup> A gének általánosan elfogadott és használt szimbólumai, illetve nevei a standard "GeneCards" alapján (www.genecards.org).

<sup>b</sup> A real time RT-PCR reakciók során használt gén-specifikus TaqMan alapú expressziós kitek gyártási/azonosítási számai.

<sup>c</sup> Relatív génexpressziós arányok FD vs. non FD csontszövetben.

<sup>d</sup> Mann-Whitney-féle U-teszt szignifikanciaértékei.

<sup>e</sup> A csont metabolizmusában és az osteogenesisben szerepet játszó gének funkcionális és élettani hatásának leírása.

U-teszt eredménye alapján állítottunk össze (lásd a Módszer fejezetet!). A G-proteinhez kapcsolt szignálúton szabályozott extracelluláris mátrixot kódoló gén-halmaznak (G-protein/ECM halmaz), valamint a BMP-kaszkádkhoz tartozó géneknek volt a legerősebb elkülönítő hatása az FD- és kontrollbetegcsoportra (4. ábra). A lipidanyagcseréhez kötődő, valamint a szignifikáns expressziós különbséget mutató membránfehérjéket kódoló gének is erős korrelációt mutattak a kanonikus változóval, ami alapján élesen elkülöníthető a vizsgált két betegcsoport. A másik két, G-proteinhez kapcsolt génhalmaz (G-protein/növekedési faktorok és G-protein/csontmarkerek) csakúgy, mint a WNT-hálózat génjei, már kevésbé erős elkülönítő hatással bírnak (4. ábra).

## Megbeszélés

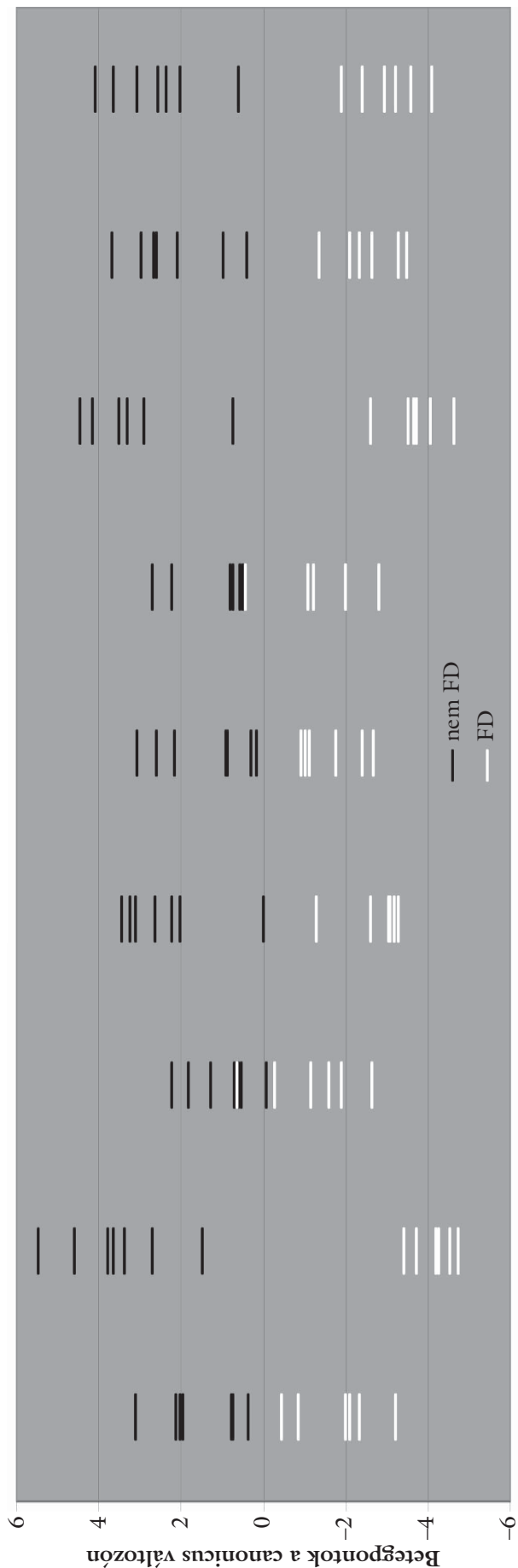
Jelen munkában a nemzetközi irodalomban is első alkalommal mutattuk ki a fibrosus dysplasiás és nem fibrosus dysplasiás csontszövet génexpressziós mintázatának különbségeit. Sikertült élesen elválasztani a két

fenotípust a genetikai információk alapján. Meghatároztunk olyan, jelentősen eltérően kifejeződő új géneket (*ATP2A2*, *ENO1*, *TWIST1*), amelyek eddig nem voltak a betegséggel kapcsolatba hozhatók.

Kimutattuk az *ATP2A2* gén szignifikáns túlexpresszióját az FD-s szövetben. Ez egy sarco(endo)plazmás reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATP-áz (SERCA) fehérjemolekula, amelyik Ca<sup>2+</sup>-t pumpál a sejt inozitol-1,4,5-trifoszfát-érzékeny "raktárába" és ezzel szerepet játszik az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-homeosztázis fenntartásában csakúgy, mint a G-proteinhez kapcsolt jelátviteli eseményekben [21]. Ismert, hogy a *GNAS1* gén aktivált szomatikus mutációja áll az FD-s sejt megemelkedett cAMP-szintjének hátterében. A jelen eredmények alapján úgy tűnik, hogy egy másik G-protein jelátviteli út, a foszfolipáz-C  $\beta$ -dependens intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-szint befolyásolása is szerepet játszik az FD kifejlődésében.

A *TWIST1* gén expressziós szintje jelentősen magasabb volt az FD-s mintákban. Ez a helix-loop-helix típusú transzkripciósfaktor a legfőbb negatív szabályozója az osteoblast-differenciációnak és gátolja az osteoblast-éresi vonal beindulását [22, 23]. Az emelke-

Canonical varianciaanalízis



G-protein/ esontmarkerek		G-protein/ECM		G-protein/ növekedési faktorok		kollagénmolekulák		nem kollagén ECM-molekulák		WNT útvonal		BMP-kaszád		zsírmetabolizmus		membránfehérjék ( $p \leq 0,05$ )	
Génnév	Korr. KV	Génnév	Korr. KV	Génnév	Korr. KV	Génnév	Korr. KV	Génnév	Korr. KV	Génnév	Korr. KV	Génnév	Korr. KV	Génnév	Korr. KV	Génnév	Korr. KV
RUNX2	0,538	BGN	0,104	VEGF	0,667	COL4A4	0,466	BGN	0,117	LRP4	0,808	BMP4	0,330	APOE	0,738	ACVR1	0,697
ALPL	0,472	FNI	-0,001	FGFR1	0,563	COL14A1	0,377	FNI	-0,001	TCF7L2	0,329	BMP2	0,300	CD36	0,630	LRP4	0,678
BMP4	0,362	MGP	-0,031	IGF1	0,409	COL2A1	0,363	TNC	-0,051	CTNND1	-0,105	BMP1A	0,263	LRP5	0,452	ATP2A2	0,636
RANKL	0,187	COL10A1	-0,314	EGFR	0,192	COL3A1	-0,303	MGP	-0,356	NLK	-0,365	SMAD4	0,147	FABP4	0,122	ICAMI	-0,436
VDR	-0,311	MMP13	-0,371	TGFB2	-0,342	COL10A1	-0,336	SPP1	-0,368	LRP5	-0,529	BMP3	-0,107	FABP3	-0,186	LRP5	-0,443
ESR1	-0,515	TIMP2	-0,375	TGFB3	-0,533	COL7A1	-0,338	BGLAP	-0,443	WIF1	-0,545	BMP2	-0,367	APOD	-0,686	IGFIR	-0,590
IL6	-0,581	BGLAP	-0,391			COL5A2	-0,359	DCN	-0,478			BMP8B	-0,402	LRP4	-0,691	CD36	-0,617
TNF	-0,682	MMP2	-0,401			COL5A1	-0,432	SPARC	-0,526			SMAD1	-0,403			VCAMI	-0,739
		DCN	-0,422			COL1A1	-0,446										
						COL1A2	-0,452										
						COL11A1	-0,459										
						COL12A1	-0,763										

4. ábra

Hat FD-s (főhér vonal) és hét nem FD-s (főkeres vonal) nőbetegből származó csontszövet génekszűrés mintájának diszkriminanciaanalízise. A kilenc részalumba rendezett humán génnek szimbolikus jelölése és elnevezése a „Gene Cards” alapján történt ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

3. táblázat | Fibrosus dysplasiás csontszövetből származó, a kvantitatív real-time RT-PCR vizsgálattal szignifikánsan csökkent expressziót mutató ( $p \leq 0,05$ ) 18 gén adatainak összefoglalása

ABI Assay azonosítási számok <sup>a</sup>	Génszim-bólum <sup>b</sup>	Génnév <sup>b</sup>	Expressziós arányok <sup>c</sup>	p-érték <sup>d</sup>	Biológiai funkció <sup>e</sup>
Hs00171168_m1	APOE	Apolipoprotein-E	0,10	0,002	A kilomikron fő apoproteinje, transzfer- és szállítófehérje, érintett a lipid- és zsírsavtranszportban
Hs00169627_m1	CD36	CD36 antigén (kollagén I. típus receptor, thrombospondinreceptor)	0,11	0,005	Kollagén-, thrombospondin-, foszfolipid-, oxidált LDL-, hosszú láncú zsírsavkötő molekula, szerepe van a különböző adhéziós folyamatokban és a zsírsavtranszport szabályozásában
Hs00186772_m1	EIF3S4	Eukaryotatranszlációt kezdő faktor 3-4 delta-alegység, 44 kDa	0,45	0,051	Fehérjemetabolizmus, -modifikáció, -bioszintézis
Hs00361415_m1	ENO1/MBP1	Enoláz-1 (alfa)/C-myc promóterkötő fehérje-1	0,41	0,035	A c-myc protoonkogén promóteréhez kötődik, transzkripciót és növekedést gátol, szerepe van a MAP-kináz jelútban is
Hs00174860_m1	ESR1	Ösztrogénreceptor-1 (alfa)	0,05	0,014	Transzkripció faktor, sejtmagi hormonreceptor, szabályozza a csontsejt-differenciációt, ennek aktivitását és a génexpressziót
Hs00230957_m1	ESR2	Ösztrogénreceptor-2 (béta)	0,01	0,014	Transzkripció faktor, sejtmagi hormonreceptor, szabályozza a csontsejt-differenciációt, ennek aktivitását és a génexpressziót
Hs00609791_m1	FABP4	Zsírsavkötő fehérje-4, adipocyta	0,76	0,051	Hosszú láncú zsírsavak és egyéb hidrofób ligandok kötése, zsírsavfelvétel, -transzport és -metabolizmus
Hs00164932_m1	ICAM1	Intercelluláris adhéziós molekula-1 (CD54)	0,01	0,001	Részt vesz a sejtadhézió közvetítette jelátvitelben, integrin- (LFA1-) kötésben, serkenti az osteoclastogenesisist
Hs00153126_m1	IGF1	Inzulinszerű növekedési faktor-1 (szomatomedin-C)	0,06	0,022	A csontsejtekre általános anabolikus hatású citokin, kulcsszerepe van a csontrendszer növekedésében, egyaránt serkentő hatású az osteoblast és osteoclast érésében, illetve a csontremodellációban
Hs00181385_m1	IGF1R	Inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor	0,20	0,022	Az IGF tirozinkináz típusú receptora, erősíti a sejt túlélést
Hs00174097_m1	IL-1B	Interleukin-1, béta	0,03	0,014	Szerepe van a sejtproliferációban, -differenciációban és az apoptózisban, fokozza a csontbontást és az osteoclast-aktivitást
Hs00182031_m1	LRP5	Alacsony denzitású lipoproteinreceptor kapcsolt fehérje-5	0,21	0,051	Központi szerepe van a csonttömeg szabályozásában, fontos genetikai meghatározója a csontsűrűségnek. A Wnt-szignál szabályozása
Hs00233972_m1	MMP8	Mátrixmetalloproteináz-8 (neutrofil kollagenáz)	0,00	0,001	ECM-bontó és csontfejlődést gátló szerep, részvétel az I., II. és III. típusú kollagén degradációjában
Hs00234994_m1	PDGFA	Vérlemezkere-eredetű növekedési faktor-alfa polipeptid	0,14	0,051	ECM-bontó és csontfejlődést gátló szerep, részvétel az I., II. és III. típusú kollagén degradációjában
Hs00174128_m1	TNF	Tumornekrozis-faktor-alfa (TNF-szupercsalád, 2. tag)	0,02	0,014	Többfunkciós gyulladáshoz vezető citokin, részt vesz a sejtproliferációban, -differenciációban, apoptózisban, a zsírmétabolizmusban és az osteoclast-differenciáció szabályozásában
Hs00174239_m1	VCAM1	Vascularis sejtadhéziós molekula-1	0,04	0,001	Részt vesz a sejtadhézió közvetítette jelátvitelben, integrin- (VLA4-) kötésben, serkenti az osteoclastogenesisist
Hs00173626_m1	VEGF	Vascularis endothelialis növekedési faktor	0,05	0,002	Az osteoclastok által közvetített csontbontás támogatása, stimulálja az osteoblastok kemotaktikus migrációját, fontos szerepe van a csontképződésben és a csontgyógyulásban
Hs00183662_m1	WIF1	WNT-gátló faktor-1	0,25	0,035	Gátolja a Wnt-szignál út vonalat, részt vesz a mesoderma szegmentációjában

<sup>a</sup> A gének általánosan elfogadott és használt szimbólumai, illetve nevei a standard "GeneCards" alapján ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

<sup>b</sup> A real time RT-PCR reakciók során használt génspecifikus TaqMan alapú expressziós kitek gyártási/azonosítási számai.

<sup>c</sup> Relatív génexpressziós arányok FD vs. non FD csontszövetben.

<sup>d</sup> Mann-Whitney-féle U-teszt szignifikanciaértékei.

<sup>e</sup> A csont metabolizmusában és az osteogenesisben szerepet játszó gének funkcionális és élettani hatásának leírása.



dett TWIST1-transzkripció megmagyarázhatja a fibrosus displasiás szövetben jelen lévő nagy mennyiségű nem differenciált és éretlen osteoblast, valamint mesenchymalis prekursor sejt jelenlétét. Néhány kis molekulásúlyú keresztkötő kollagénfehérje (*COL1A1*, *COL12A1*, *COL3A1*) jelentősen emelkedett mennyiségben fejeződött ki az FD-s mintákban a nem FD-hez viszonyítva. Ezek a minor kollagénmolekulák szervezik a mátrixszerkezetet, periodikusan kapcsolódnak a csont szerves állományában nagy tömegben jelen lévő fő kollagénfibrillumok (*COL1*, *COL2*) felszínéhez [24]. Ezen minor kollagénmolekulák szignifikáns mértékű felszaporodása azt eredményezheti, hogy rendezetlenné válik a csont szerves állománya, ami FD-ben jól ismert.

A mátrixmetalloproteináz-8 (*MMP8*) mRNS-képződése és ezáltal a gén aktivitása teljesen hiányzik, ezzel szemben az *MMP2* túlexpresszáldott az FD-s szövetben. Az *MMP8* gén működése fontos szerepet játszik a kollagénmátrix kialakításában [25]. *Filanti és mtsai* [26] leírták, hogy az *MMP2*-szekréció az érési folyamat elején jelentős a kevésbé differenciálódott fenotípusú osteoblastokban. Az *MMP8*-génprodukciónak hiánya és az *MMP2* kifejeződésének változása magyarázatot adhat az FD-ben észlelt oszteoidtermelés elégtelenségére.

Az ösztrogénreceptor (*ESR1* és *ESR2*) gének átírásához szükséges mRNS szintjének csökkenését észleltük a munka során. Az ösztrogén tudottan erősen pozitív hatással van a csont homeosztázisára, ellenőrzi a csontátépülést, illetve lassítja a csontanyagcsere ütemét [27, 28]. Ezek az ösztrogénszignálok a sejtet a két fő ösztrogénreceptoron át érik el. A megszűnő ösztrogénszignál pedig csökkenti az ösztrogén csontvédő hatását FD-ben. Összhangban ezen megfigyeléssel, *Corsi és mtsai* a fibrosus displasiát úgy határozták meg, mint egy gyors anyagcsereütemű csontbetegséget.

Ezen kimutatott génexpressziós változások hatására differenciálódnak rosszul, maradnak éretlenek az osteoblastok (transzkripciós faktorok: *TWIST1* és *ENO1/MBP1*; növekedési faktorok: *VEGF*, *PDGFA*, *IGFI*) és változnak meg kórosan az ECM-komponensek (minor kollagénmolekulák és mátrixmetalloproteinázok), amik így együtt alakítják ki az FD-re jellemző fenotípus-eltéréseket.

Az univariáns Mann–Whitney-féle U-teszt a gének egyedi szerepét vizsgálja, ezért az expressziós adatokban rejlő számos információ több szempontból is észrevétlen maradhat. Többváltozós eljárások alkalmazásával további összefüggésekre is fény derülhet. Ezek a statisztikai módszerek lehetőséget nyújtanak nagyszámú adat egyidejű komplex elemzésére, illetve génexpressziós mintázatbeli különbségek meghatározására az egyedi varianciák figyelembevételével. A canonicus varianciaanalízis kiemelt egy fontos génhalmazt, amely G-protein jelátvitelhez kötött ECM-molekulákat kódoló géneket tartalmazott (G-protetin/ECM) és ami élesen szétválasztotta az FD-s és a kontrollcsoportot. Szintén tökéletes különbség volt látható az ECM kol-

lagén és nem kollagén molekulái esetében. Ezenkívül a két csoport mintáinak nagyon éles elkülönítése figyelhető meg a BMP-kaszád génei által, azok különleges fontosságát hangsúlyozva a csontérés és az osteogenesis indukciójában. (FD-ben ezek szignifikánsan alulszabályozódnak, és nincs megfelelő csontérés sem.) A zsírmetabolizmus elemeit kódoló gének is határozott erővel különítik el a vizsgált két csoportot. A kiértékelés alapján a lipidhomeosztázis számos komponense (szállító molekulák, receptorok, transzporterek) változott FD-ben. Ugyanakkor a lipidanyagcserében és -szállításban szerepet játszó több molekula (*APOE*, *LRP-k*, *LDL*, *VLDL*) működése G-proteinhez kapcsolt szignálúton szabályozódik [29, 30]. Továbbá, az FD-s szövetben kórosnak tűnik a sejt-ECM és sejt-sejt kapcsolatok minősége is, amit a szignifikánsan alulszabályozódó sejtadhéziós molekulák (*ICAM1*, *VCAM1*) jelezhetnek, és amelyeknek tudottan fontos szerepük van a sejtérés, a csontlerakódás és a remodelláció (turnover) folyamatában.

Összefoglalva, szignifikánsan eltérő génexpressziós profilt találtunk az FD-s és normális csontszövetben, továbbá több olyan gént is leírtunk, amelyeket eddig még nem hoztak összefüggésbe a fibrosus dysplasia betegségével. Ebben a génátírási „hálózatban” észlelt szignifikáns eltérések elősegítették a csont fibrosus degenerációs folyamatának jobb megértését.

## Irodalom

- [1] *Chapurlat, R. D., Meunier, P. J.*: Fibrous dysplasia of bone. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2000, 14, 385–398.
- [2] *Cohen, M. M. Jr.*: The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am. J. Med. Genet.*, 2006, 140, 2646–2706.
- [3] *DiCaprio, M. R., Enneking, W. F.*: Fibrous dysplasia. Pathophysiology, evaluation, and treatment. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2005, 87, 1848–1864.
- [4] *Sands, W. A., Palmer, T. M.*: Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal.*, 2008, 20, 460–466.
- [5] *Marie, P. J.*: Cellular and molecular basis of fibrous dysplasia. *Histol. Histopathol.*, 2001, 16, 981–988.
- [6] *Kaplan, F. S., Fallon, M. D., Boden, S. D. és mtsai*: Estrogen receptors in bone in a patient with polyostotic fibrous dysplasia (McCune–Albright syndrome). *N. Engl. J. Med.*, 1988, 319, 421–425.
- [7] *Marie, P. J., de Pollak, C., Chanson, P. és mtsai*: Increased proliferation of osteoblastic cells expressing the activating Gs alpha mutation in monostotic and polyostotic fibrous dysplasia. *Am. J. Pathol.*, 1997, 150, 1059–1069.
- [8] *Balla, B., Kiss, J., Borsy, A. és mtsai*: Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women. *Calcif. Tissue Int.*, 2008, 82, 12–26.
- [9] *Motomura, T., Kasayama, S., Takagi, M. és mtsai*: Increased interleukin-6 production in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells expressing activating mutant of the stimulatory G protein. *J. Bone Miner. Res.*, 1998, 13, 1084–1091.
- [10] *Tsai, H. W., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S. és mtsai*: Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the

- receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology*, 2004, *145*, 2730–2738.
- [11] *Csiszar, A., Labinsky, N., Smith, K. E. és mtsai*: Downregulation of bone morphogenetic protein 4 expression in coronary arterial endothelial cells: role of shear stress and the cAMP/protein kinase A pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007, *27*, 776–782.
- [12] *Boudreaux, J. M., Towler, D. A.*: Synergistic induction of osteocalcin gene expression: identification of a bipartite element conferring fibroblast growth factor 2 and cyclic AMP responsiveness in the rat osteocalcin promoter. *J. Biol. Chem.*, 1996, *271*, 7508–7515.
- [13] *Boguslawski, G., Hale, L. V., Yu, X. P. és mtsai*: Activation of osteocalcin transcription involves interaction of protein kinase A- and protein kinase C-dependent pathways. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275*, 999–1006.
- [14] *Winchester, S. K., Bloch, S. R., Fiacco, G. J. és mtsa*: Regulation of expression of collagenase-3 in normal, differentiating rat osteoblasts. *J. Cell Physiol.*, 1999, *181*, 479–488.
- [15] *Bayatti, N., Engle, J.*: Cyclic AMP differentially regulates the expression of fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors in cultured cortical astroglia. *Neuroscience*, 2002, *114*, 81–89.
- [16] *McCarthy, T. L., Thomas, M. J., Centrella, M. és mtsa*: Regulation of insulin-like growth factor I transcription by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) in fetal rat bone cells through an element within exon 1: protein kinase A-dependent control without a consensus AMP response element. *Endocrinology*, 1995, *136*, 3901–3908.
- [17] *Liu, G., Ding, W., Neiman, J. és mtsa*: Requirement of Smad3 and CREB-1 in mediating transforming growth factor-beta (TGF beta) induction of TGF beta 3 secretion. *J. Biol. Chem.*, 2006, *281*, 29479–29490.
- [18] *Reya, T., Clevers, H.*: Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 2005, *434*, 843–850.
- [19] *Termaat, M. F., Den Boer, F. C., Bakker, F. C. és mtsai*: Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2005, *87*, 1367–1378.
- [20] *Podani, J.*: SYN-TAX 2000. User's Manual. Scientia, Budapest, 2001.
- [21] *Shull, G. E.*: Gene knockout studies of Ca<sup>2+</sup>-transporting ATPases. *Eur. J. Biochem.* 2000, *267*, 5284–5290.
- [22] *Komaki, M., Karakida, T., Abe, M. és mtsai*: Twist negatively regulates osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J. Cell Biochem.*, 2007, *100*, 303–314.
- [23] *Bialek, P., Kern, B., Yang, X. és mtsai*: A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev. Cell*, 2004, *6*, 423–435.
- [24] *Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T.*: Collagens – structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2000, *55*, 1531–1546.
- [25] *Sasano, Y., Zhu, J. X., Tsubota, M. és mtsai*: Gene expression of MMP8 and MMP13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. *J. Histochem. Cytochem.*, 2002, *50*, 325–332.
- [26] *Filanti, C., Dickson, G. R., Di Martino, D. és mtsai*: The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. *J. Bone Miner. Res.*, 2000, *15*, 2154–2168.
- [27] *Turner, R. T., Riggs, B. L., Spelsberg, T. C.*: Skeletal effects of estrogen. *Endocr. Rev.*, 1994, *15*, 275–300.
- [28] *Syed, F., Khosla, S.*: Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, *328*, 688–696.
- [29] *Goretzki, L., Mueller, B. M.*: Low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) interacts with a GTP-binding protein. *Biochem. J.*, 1998, *336*, 381–386.
- [30] *Azhar, S., Medicherla, S., Shen, W. J. és mtsai*: LDL and cAMP cooperate to regulate the functional expression of the LRP in rat ovarian granulosa cells. *J. Lipid Res.*, 2006, *47*, 2538–2550.

(Kiss János dr.,  
Budapest, Karolina út 27., 1113  
e-mail: dysplasia.drkiss61@googlemail.com)

## Tisztelt Olvasónk!

Kórházak, egészségügyi intézmények,  
tudományos társaságok  
**szakmai és továbbképző programjait,**  
az egészségüggyel, az orvostudománnyal  
kapcsolatos **pályázatok felhívásait,**  
**ösztöndíj-felhívásait** és  
a kórházak, az egészségügyi intézmények  
**pályázati hirdetményeit**  
kedvezményes áron tudjuk közölni lapunkban.

**Szódíj: 25 Ft + áfa**  
**Előfizetőink hirdetéseit**  
**70 szó terjedelemben térítésmentesen**  
**jelentetjük meg.**

A hirdetés megrendelhető e-mailen,  
a [Budai.Edit@akkr.hu](mailto:Budai.Edit@akkr.hu) címen.

A számla kiegyenlítése átutalással vagy  
a kiadó által küldött csekk befizetésével lehetséges.