

A csontanyagcsere többszintű molekuláris biológiai vizsgálata

Doktori tézisek

Balla Bernadett

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Takács István

Hivatalos bírálók:

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Cseh Károly tanszékvezető egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kiss Csaba főorvos

Dr. Szücs Nikolette egyetemi tanársegéd

**Budapest
2010.**

BEVEZETÉS

Az osteoporosis kialakulása és a menopausát követő csontanyagcsere mechanizmusok megváltozása multifaktoriális komplex folyamat. Az osteogenezisben és az osteoporotikus állapot kialakulásában számos környezeti tényező (pl.: fizikai aktivitás, dohányzás, alkoholfogyasztás, étrend) mellett erős genetikai hatás is érvényesül. Kimutatható továbbá, hogy a csontásványanyag-tartalom (BMD), a combnyak geometriája, a trabeculáris és corticális vastagság, a csontanyagcsere különböző biokémiai markerei nagy százalékban genetikai kontroll alatt állnak. Az osteoporosis és a postmenopausás csontvesztés patomechanizmusának genetikai háttere poligénes eredetű, amelynek hátterében álló genetikai variációk kimutatása bonyolult feladat. A rendszerbiológia segítségével azonban több szinten is gyűjthetünk információt a csontfogyás patogenetikai folyamataival kapcsolatban.

A csonttrikulással összefüggésben leginkább széles körben kutatott terület a *genomika* szintje, ahol a legtöbb adat az egyedi génpolimorfizmusok (SNP) és a BMD, illetve csonttörési kockázat kapcsolatából származik. A genomikai vizsgálatok segítségével számos jelölt gén elsődleges szerepére derült fény, amelyek befolyásolják a csúcs- valamint a csökkent csonttömeg kialakulását. Ezek a kalciotróp hormonok és receptorok génjei (parathormon-receptor, D-vitamin receptor, kalcitonin-receptor), a csont szerves mátrixának komponensei (I. típusú kollagén, osteonectin, osteopontin), és lokálisan ható citokineket kódoló gének (csont morfogenetikus proteinek, gyulladáscsökkentő citokinek, receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/RANKL, osteoprotegerin/OPG) voltak. *Proteomikai* elemzések során a szérumban a fehérje szintek és a BMD közötti asszociációkat térképezték fel. Elsősorban az osteoblastok és osteoclastok sejttanyagcsere termékeinek eltérő szérumban szintjét vizsgálták a csontdenzitás csökkenés függvényében. Összefüggést találtak a csontszöveti reszorpció (IL-6) és formáció (alkalikus foszfatáz, inzulinszerű növekedési faktor) markereinek szérumban szintjei és az osteoporosis között. A *metabolomika* eredményei az osteoporosis vonatkozásában a kollagén képződési és bomlási metabolitjai (PINP, PICP, kollagén kereszt kötők), amelyeket a mai klinikai diagnosztika rutinszerűen használ a csontanyagcsere laboratóriumi vizsgálatakor.

Néhány csontsejt specifikus kandidáns gén kifejeződésének megváltozása kimutatható ösztrogén hormonok jelenlétében *in vitro* és *in vivo* sejt kultúrákban. Ezek az expressziós változások az alkalikus foszfatáz, RANK, RANKL, gyulladáscsökkentő citokinek, D-vitamin receptor, katepszin B, D molekulákat kódoló géneket érintik elsősorban.

Azonban a *transzkriptomika* szintjén napjainkig nem vagy csak nagyon kevés vizsgálat történt. A humán csontszöveti génextpresszióról, illetve annak az osteoporosis során bekövetkező változásáról limitált adat áll rendelkezésre. Csontszöveti fehérje kifejeződési

analízis (csont-proteom meghatározás), illetve géntermék interakciók felderítése a humán csontrendszerben ezidáig nem történt.

Mára már közismert, hogy az immunrendszer és a csont molekuláris és sejt szinten is számos ponton funkcionális kapcsolatban áll egymással. A közös csontvelői mikro környezetben sejtalkotóik azonos progenitorokból fejlődnek, átfedő jelátviteli hálózatokat használnak és mindkét rendszer szabályozásában ugyanaz a citokin panel vesz részt. Az aktivált T sejtek képesek RANKL molekulát kifejezni, amely az osteoclastok RANK receptorán keresztül fokozza az osteoclastogenezist és stimulálja a csontbontást. Az osteoblastok sejtfelszíni MHCII és kostimulátor molekuláik expressziója révén az antigén prezentáció és a T-limfocita mediált immunválasz folyamatában játszanak fontos szerepet. A menopausát követő nemihormon hiány egyaránt befolyásolja a csontszövet és az immunrendszer homeosztatikus folyamatait, megváltoztatva ezzel komplex kölcsönhatásukat. Több tanulmány is bizonyította, hogy számos immunológiai betegség (pl.: gyulladásoos bélbetegségek, autoimmun cukorbetegség, allergia) társul csökkent csonttömeggel. A csontritkulás a vázrendszer szisztémás megbetegedése, amely nem elhanyagolható mértékben hatással bír a csontszövetben zajló lokális immunológiai reakciókra. Osteoporosisban megváltozik a $CD4^+$ / $CD8^+$ T sejtek aránya, valamint az NK T sejt szubpopuláció emelkedett rátát mutat a csökkent BMD-vel összefüggően. Postmenopausában magasabb interferon gamma szintet mutattak ki, amely kulcsfontosságú szerepet tölt be az aktivált TNF termelő T sejtek arányának kiterjedésében.

A metabolikus csontbetegségek korai, tünetekkel még nem járó felismerése és előre jelzése nem megoldott. A kialakult állapotot a mai gyógykezelés visszafordítani nem tudja, ezért a csontképzési zavar genetikai alapokon történő helyreállítása kulcsfontosságú lehet a betegségek gyógyításában. Ezen felül a csontritkulás rendkívül súlyos következményei a combnyaktörés, vagy a csigolya testek összeroppanása.

Célunk a csontanyagcserében és különböző alapvető immunológiai mechanizmusok szabályozásában nélkülözhetetlen szerepet játszó gének csontszöveti komplex mRNS expressziós profiljának összehasonlítása humán postmenopausás osteoporoticus és nem osteoporoticus nőkben. Továbbá a transzkriptomikai kutatások során vizsgált néhány, a jelölt génekben lokalizált új SNP-k feltérképezése magyar postmenopausás nők genetikai mintájában.

CÉLKITŰZÉSEK

I. Különböző izolált humán csontszövet minták komplex transzkriptomikai profil meghatározása

Célunk a csontanyagcserében az osteogenezisben és a csont homeosztázisában nélkülözhetetlen szerepet játszó, irodalmi adatok (89 gén) és a szarvas eredmények validálása (31 gén) alapján előre kiválogatott kandidáns gének csontszöveti teljes mRNS expressziós mintázati rendszerének összehasonlítása különböző vizsgálati csoportokban ABI 7500 kvantitatív valós-idejű RT-PCR rendszerben TaqMan Assay felhasználásával.

- A humán csontszövet eltérő génkifejeződési mintázatának azonosítása postmenopausás osteoporosisban szenvedő és nem osteoporoticus nőbetegek csontmintáinak összehasonlító elemzésével.
- A menopausát követően fellépő csontszöveti génexpressziós változások komparatív meghatározása premenopausás és postmenopausás korú nem osteoporoticus nőkben.

A vizsgálat célja multiparáméteres statisztikai adatelemzések segítségével (*diszkriminancia analízis, főkomponens analízis*) a betegségek patomechanizmusában érintett funkcionális géncsoportok és szignalizációs jelpályák leválogatása. A transzkriptomikai információk alapján a patológiás és fiziológiás fenotípusok elkülönítése. Genetikai útvonal analízisek segítségével gén-gén interakciók, RNS szintű regulációs kapcsolatok valamint interaktomikai hálózatok felépítése.

II. A csontritkulás genomikai szintű elemzésének elvégzése

Célunk a transzkriptomikai kutatások során kapott új kandidáns gének (alkalikus foszfatáz/ALPL, zsírsav-kötő fehérje-3/FABP3, fibroblast növekedési faktor receptor-1/FGFR1, mátrix metalloproteináz-2/MMP2, mátrix metalloproteinázok szöveti inhibitora-2/TIMP2, osteoprotegerin/OPG, receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/RANKL) egy pontos nukleotid polimorfizmusainak feltérképezése 353 magyar postmenopausás nő genetikai mintájában a Semmelweis Egyetem SNP Core Facility keretein belül. Olyan egyedi markerek definiálása, amelyek erős statisztikai összefüggést mutatnak a csonttömeg csökkenésével és a csontritkulás kialakulásával.

III. A csontritkulás és a menopausa hatása a humán csontszövet *in vivo* transzkripció mintázatára - immunológiai szempontú megközelítés

Célunk további, a különböző immunológiai mechanizmusok szabályozásában szerepet játszó további 27 gén eltérő csontszöveti kifejeződésének azonosítása. Annak vizsgálata, hogy az osteoporoticus, illetve a menopausa következtében módosult csontszöveti mikrokörnyezetben a csontsejtek megváltozott génexpressziós aktivitása miként befolyásolhatja a lokális immunológiai homeosztázist.

MÓDSZEREK

1. Postmenopausás osteoporoticus és nem osteoporoticus nők vizsgálati csoportja

A génexpressziós vizsgálatokat postmenopausás osteoporoticus (OP), illetve postmenopausás nem osteoporoticus (NOP), független mintaválasztásból származó magyar nők csontmintáin végeztük. A kísérlethez beválogatott nők nem részesültek semmilyenfajta hormonpótló vagy szteroid terápiaiban. A postmenopausás állapot definiálása a jelenleg érvényes WHO kritériumok szerint történt. Az OP csoportban 7 csontszövet mintát értékeltünk, míg a kontroll NOP csoport 10 nő csontmintájából állt. Nem volt szignifikáns különbség a vizsgálatban szereplők átlag életkorában (OP csoport medián értéke 69.00 év és NOP csoport medián értéke 60.50 év), dohányzását illetően, bevitt kalcium mennyiségében, alkohol és kávé fogyasztásában, fizikai aktivitásában. Kifejezett különbségek figyelhetők meg elsősorban a teljes femuron és a lumbális csigolyákon mért T-score és BMD értékekben az OP és NOP egyének között.

2. Post- és premenopausás nem osteoporoticus nők vizsgálati csoportja

A postmenopausás nem osteoporoticus csoportban (POST csoport) 10 csontmintát elemeztünk, míg a kontrollként használt premenopausás nem osteoporoticus csoport (PRE csoport) 7 nő csontmintáját tartalmazta. Nem találtunk szignifikáns különbségeket a vizsgált csoportok átlag életkorában (POST medián értéke 55.00 év, PRE medián értéke 52.00 év), csontásványanyag-tartalmában, dohányzását illetően, bevitt kalcium mennyiségében, alkohol és kávé fogyasztásában, fizikai aktivitásában, illetve nem részesültek semmilyen biológiai terápiaiban. Azonban erőteljes szignifikáns eltéréseket észleltünk a szérum ösztadiol ($p = 0.0006$), az osteocalcin ($p = 0.002$), beta-crosslaps ($p = 0.01$) szintekben a két vizsgálati csoportot alkotó nők tekintetében.

3. Az SNP analízisek vizsgálati csoportja

A polimorfizmus vizsgálatokhoz 353 magyar, független mintaválasztásból származó postmenopausás nő vérmintáját gyűjtöttük össze. A vizsgálatból kizártuk azokat a résztvevőket, akiknél endokrinológiai vagy egyéb krónikus betegségek gyanúja merült fel, illetve akik hormonpótló terápiaiban vagy egyéb olyan gyógyszeres kezelésben részesültek, amely befolyásolhatja a csontanyagcserét.

4. Denzitometria

A transzkriptomikai vizsgálatokhoz beválogatott betegeken a csontsűrűség mérése a teljes femuron és a lumbális csigolyákon (L1-L4) kettős energiájú röntgensugár - abszorpciometria (DEXA) segítségével történt, néhány nappal az operációt megelőzően. Az SNP analízisekhez kiválasztott nőknél a SE I. sz. Belgyógyászati Klinikáján csontsűrűség mérés történt. A BMD értékeket a lumbális gerinc (L2-L4) és a teljes csípő vonatkozásában

Lunar Prodigy DXA készüléssel a radiust tekintve Norland pDEXA denzitométerrel határoztuk meg.

5. Humán csontszövet minták izolálása

Az OP és NOP csontminták a diagnosztizált III. stádiumú primer osteoarthritis gyógyító műtétet szolgáló csípőizületi totál endoprotézis beépítésekor leforgácsolódott csontszövet darabok összegyűjtéséből származtak. A primer osteoarthritis minősítése a Kellgren-Lawrence-féle rendszer alapján történt. A betegség a combfejen a mintavételi helyként is szolgáló spongiózus csontállományt nem érintette. A gyűjtést követően a friss mintákat azonnal alaposan megtisztítottuk a csontvelőtől és egyéb vérszennyeződésektől PBS felhasználásával, majd folyékony nitrogénben tároltuk. A vizsgálat a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága által jóváhagyva készült (SOTE-TUKEB 6392-1/2004-1018EKU, SOTE-TUKEB 33/2008). Minden betegről írásos beleegyező nyilatkozatot is kértünk.

6. Direkt messengerRNS szeparálás csontból

A humán csontmintákat folyékony nitrogén alatt elporítottuk freezer-mill 6750 készülék segítségével. Az RNS izolálást Dynabeads Oligo (dt)₂₅ kit felhasználásával végeztük. Ezután az mRNS-t DN-áz I. enzimmel kezeltük. Az mRNS tisztítását a NucleoSpin RNA Clean-up kit-ben található puffer szett segítségével a gyártók előírása szerint végeztük. A tiszta mRNS minőségét és mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel ellenőriztük 260/280 nm-en. A humán mRNS-t cDNS-re fordítunk át reverz transzkripció (RT-PCR) során, reverz transzkriptáz és random primer felhasználása mellett.

7. DNS szeparálás perifériás vérből

A polimorfizmus meghatározásokhoz összegyűjtött résztvevők EDTA-s vérmintájából genomiális DNS-t izoláltunk High Pure PCR Template Purification kit felhasználásával. A tisztított DNS minőségét és mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg.

8. A vizsgált gének kiválasztása transzkriptomikai analízisekhez, kvantitatív valós idejű RT-PCR

Kvantitatív valós idejű RT-PCR módszer alkalmazásával olyan kandidáns géneket vizsgáltunk melyek eltérő génexpressziós aktivitása szerepet játszhat a menopausát követően megváltozott csontszöveti anyagcsere-folyamatok és az osteoporosis kialakulásában. Előzetes genetikai útvonal analízisek, irodalmi adatok és online adatbázisok alapján kiválasztottunk 147 gént a transzkripció vizsgálatokhoz. A kiválasztott gének amplifikálásához előre megtervezett és validált gén-specifikus TaqMan próba alapú génexpressziós Assayt használtunk ABI Prism 7500 valós idejű PCR rendszerben. Minden gént 3-3 párhuzamos méréssel vizsgáltunk. A relatív kvantifikáció kiértékelése az összegyűjtött adatokból (küszöb

ciklus számok, Ct) 7500 System SDS software 1.3 felhasználásával készült. A gén-specifikus mRNS relatív mennyiségét (RQ) a gyártó előírása szerint az átlag ΔC_t értékekből (cél gén C_t értéke - endogén kontroll gén C_t értéke) számítottuk.

9. Gének és SNP-k kiválasztása a genomikai analízisekhez, genotipizálás

Az SNP analízisekhez öt olyan, humán csontszövetben expresszálandó gént (ALPL, MMP2, TIMP2, FGFR1, FABP3) választottunk, amelyek esetén az *in vivo* transzkriptomikai vizsgálatok real-time PCR eredményei alapján elsőként mutattuk ki, hogy meghatározó szerepet tölthetnek be a csontanyagcserében. Két szelektált gén (RANKL, OPG) azonos szignalizációs rendszerhez tartozik és szerepük már jól ismert a csontátépülési folyamatok szabályozása kapcsán. Az NCBI dbSNP adatbázis segítségével optimális GC aránnyal (40-65%) rendelkező 26 SNP-t szelektáltunk. A robosztus genotipizálás a Semmelweis Egyetem SNP Core Facility keretein belül a nagy áteresztőképességű GenomeLab SNPstream Genotyping System rendszerben történt. Az automatizált genotipizáló rendszer multiplex PCR kapcsolt fluoreszcens jelölésen alapuló, array-rendszerű egybázisos primer extenzió elvén működik.

10. Többváltozós transzkriptomikai adatelemzések

Az univariáns Mann-Whitney U teszt a gének egyedi szerepét vizsgálja, ezért az expressziós adatokban rejlő számos információ több szempontból is észrevétlen maradhat. Többváltozós eljárások alkalmazásával (diszkriminancia analízis, főkomponens analízis, hierarchikus cluster analízis) további összefüggésekre is fény derülhet. Ezek a statisztikai módszerek lehetőséget nyújtanak nagyszámú adat egyidejű komplex elemzésére, illetve génexpressziós mintázatbeli különbségek meghatározására az egyedi varianciák figyelembe vételével. A betegségek kialakulásában funkcionálisan érintett több gén és géncsoport együttes hatásaira hívják fel a figyelmet. Mivel a csontanyagcsere folyamatok módosulása a környezeti tényezők mellett számos gén aktivitásában bekövetkező kismértékű additív változás következménye, ezért ezeknek a géneknek az azonosítása multiparaméteres adatelemzésekkel megvalósítható feladat. A számításokat a SYN-TAX 2000 programcsomag felhasználásával készítettük.

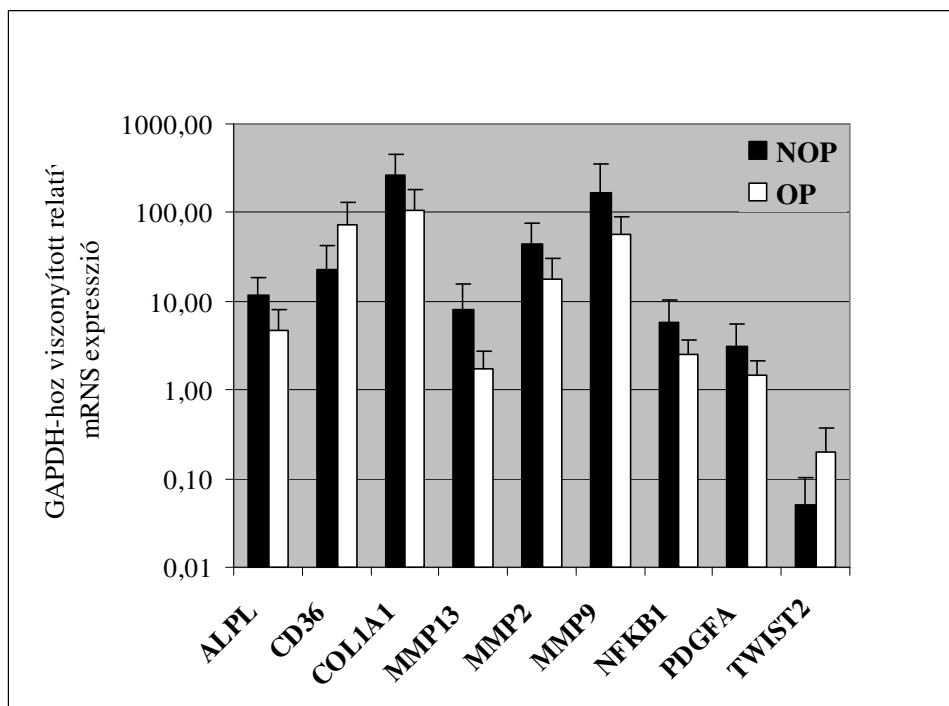
11. A genomikai vizsgálatokhoz felhasznált statisztikai módszerek

Az adatbázisban a hiányzó genotípusokat a „10-legközelebbi szomszéd módszer” (10-nearest neighbour method) segítségével determináltuk a genotipizálási hibákból eredő fals eredmények elkerülése érdekében. A „Haploview 3.0” szoftver segítségével végeztük a genotipizálás leíró elemzését. A humán genetikai asszociációs vizsgálatokat a „PedGenie” szoftver felhasználásával végeztük. Az individuális SNP-analízis statisztikai erejét (power of the study) a Quanto szoftver 1.1 verziójával számoltuk ki.

EREDMÉNYEK

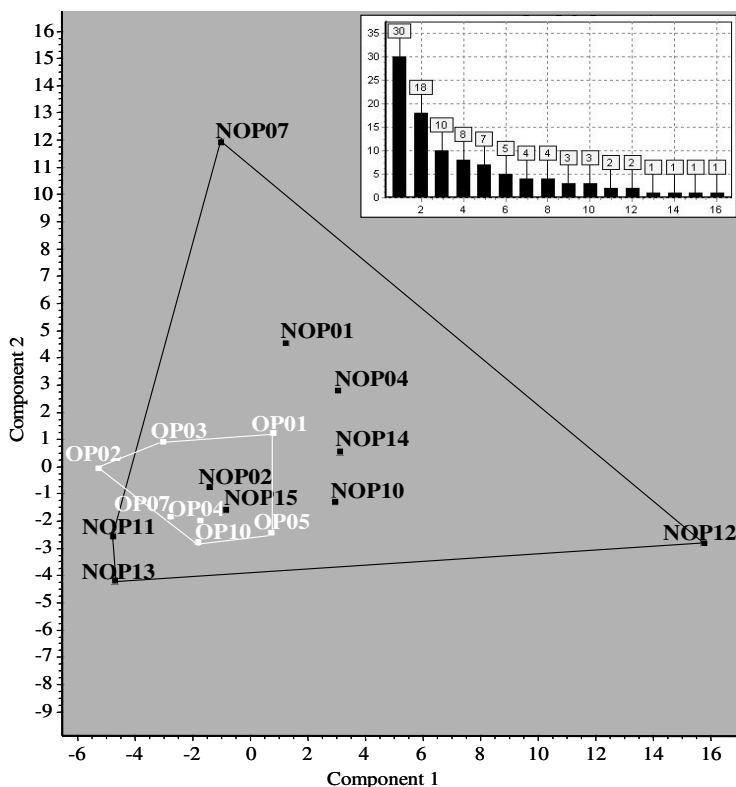
1. Postmenopausás osteoporoticus és nem osteoporoticus nők csontszöveti génextpressziós mintázatának komplex vizsgálata

A Mann-Whitney U teszt 9 gén tekintetében mutatott szignifikáns ($p \leq 0.05$) expressziós különbséget a két minatcsoportban, név szerint: alkalikus foszfatáz (ALPL), I. típusú kollagén alfa 1 lánc (COL1A1), mátrix metalloproteináz 2 (MMP2), mátrix metalloproteináz 13 (MMP13), mátrix metalloproteináz 9 (MMP9), trombocitákból származó növekedési faktor alfa polipeptid (PDGFA), nukleáris faktor kappa könnyű lánc (NFKB1), thrombospondin receptor (CD36) és twist homolog 2 (TWIST2). Ebből 7 gén kifejeződése represszálódott osteoporoticus nőkben. Az expressziós változás mértéke az osteoporoticus csontban a nem osteoporoticus csontszövethez viszonyítva az ALPL esetén 0.41-szoros, a COL1A1 esetén 0.39-szoros, az MMP2 esetén 0.40-szoros, az MMP13 esetén 0.21-szoros, az MMP9 esetén 0.34-szoros, a PDGFA esetén 0.47-szoros és az NFKB1 esetén 0.44-szoros volt (1. ábra). Ezzel ellentétben 2 gén kifejeződése szignifikánsan megnövekedett az osteoporoticus betegekben. A megfigyelt transzkripció aktivitás fokozódása 4.00-szoros volt a TWIST2 gén tekintetében és a CD36 gén relatív expressziója 3.22-szor magasabbnak bizonyult osteoporoticus csontban (1. ábra).



1. ábra. Szignifikánsan megváltozott expressziós mintázatot mutató 9 gén mRNS-ének relatív mennyisége 7 osteoporoticus (fehér oszlop) vs. 10 nem osteoporoticus (fekete oszlop) nő csontszövetében Lg skálán feltüntetve.

A főkomponens (PCA) vizsgálat során a csontanyagcserében és a csontvesztésben szerepet játszó, szelektált gének expressziós adatait egyszerre elemeztük. A standardizált PCA első két komponense 30.4% és 28.4%-át képviseli a teljes variációnak. A további komponenseket (9.8%-tól kezdődően) kizártuk az értékelésből, mert a scree teszt eredményei alapján ezek csak a véletlenszerű változásokért felelősek (2. ábra). Az osteoporoticus nők mérsékelt génextpressziós aktivitással jellemezhetők, ezért egy relatív kompakt csoportot képeznek közel az origóhoz. A nem osteoporoticus személyek ettől pozitív irányban helyezkednek el a fokozottabb csontszöveti génműködésük következtében (2. ábra).

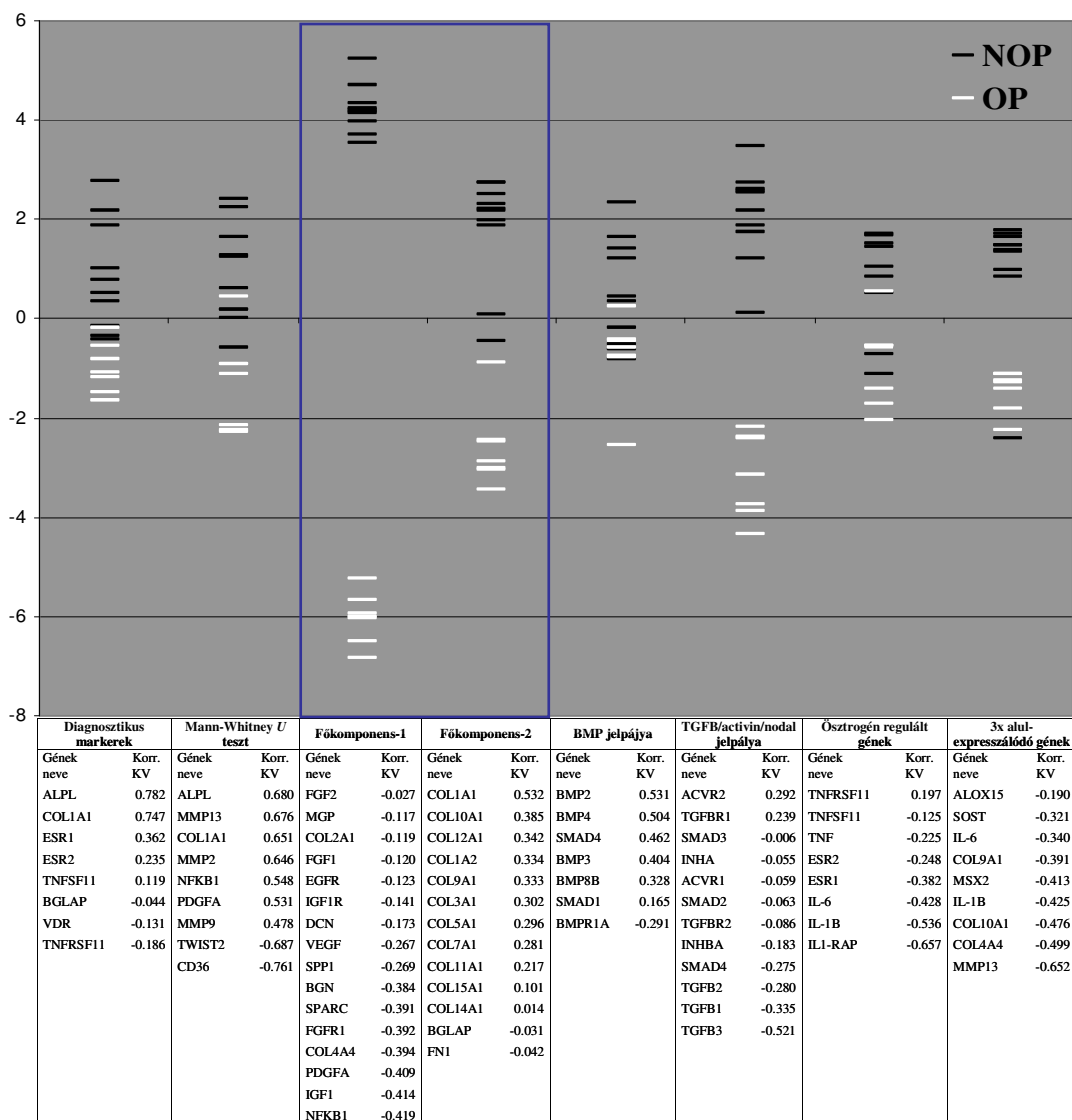


2. ábra. A PCA diagramon a 17 vizsgált nő pozíciója látható a két főkomponens mentén.

A csontszöveti komplex génextpressziós mintázat alapján a postmenopausás osteoporoticus és nem osteoporoticus fenotípusok elkülönülnek egymástól. A nagyon hasonló transzkripciós aktivitással rendelkező osteoporoticus nők (fehér OP) egy diszkrét csoportot képezve elválnak a nem osteoporoticus (fekete NOP) nőket magában foglaló halmaztól.

Diszkriminancia adatelemzést (DFA) alkalmaztunk, hogy az osteoporoticus és nem osteoporoticus csoportokat elkülönítsük a csontszöveti génextpressziós adataik alapján, illetve, hogy a vizsgált 147 génből meghatározzuk azokat a géncsoportokat, amelyek a legnagyobb diszkriminációs képességgel rendelkeznek. Nyolc génhalmazt jellemeztünk különböző csoportosítási szempontok alapján (3. ábra).

Az 1-es főkomponenst (PC1) alkotó, elsősorban növekedési faktorokat és receptoraikat, illetve nem kollagén típusú ECM molekulákat kódoló gének rendelkeztek a legnagyobb megkülönböztető erővel, amely egyértelműen szétválasztotta a postmenopausás osteoporoticus és nem osteoporoticus csoportokat. A TGFB/activin/nodal szabályozási útvonalhoz kapcsolódó gének és az osteoporoticus személyek csontszövetében 3-szor, illetve annál nagyobb mértékben csökkent transzkripciót mutató gének szintén erős korrelációt mutattak a kanonikus változóval, és a vizsgált OP és NOP nők két csoportjának határozott szétválasztását tették lehetővé (3. ábra).



3. ábra. Hét postmenopausás osteoporoticus (OP, fehér vonal) és tíz postmenopausás nem osteoporoticus (NOP, fekete vonal) nő csontszöveti génexpressziós mintázatának diszkriminancia analízise.

A legtekélyesebb szétválás a PC1 génhalmaz esetén állapítható meg. Szintén nagyon éles különbség tapasztalható a PC2 géncsoport és a kanonikus TGFB/activin/nodal szignalizációs jelpálya esetén is.

2. Post- és premenopausás nem osteoporoticus nők csontszöveti génexpressziós mintázatának vizsgálata

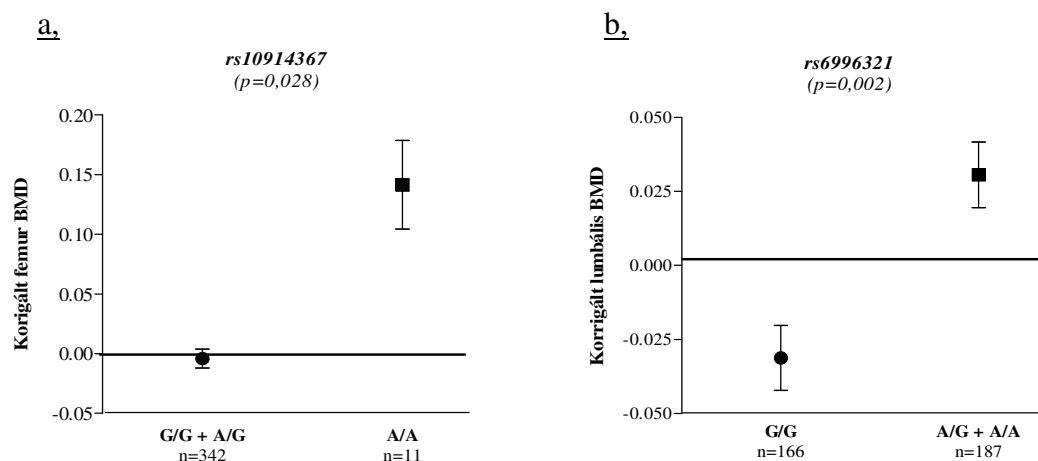
A Mann-Whitney teszt alapján 29 szignifikánsan eltérő módon expresszálandó gént találtunk (1. táblázat). Funkcionális osztályozást követően ezek a gének a következők voltak: Hét kollagén molekula (COL2A1, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COL9A1, COL12A1, COL15A1), három nem-kollagén típusú extracelluláris mátrix protein (MGP, BGLAP, FN1) és két szerves mátrix bontó enzim (MMP13, BMP1) génkifejeződési mintázata szignifikánsan nagyobb volt a POST nem osteoporoticus csontban. Postmenopausás nőkben a közös TGFB/BMP jelátviteli hálózatba tartozó öt gén (BMP1A, TGFB2, TGFB3, TGFBR2, SMAD4) nagyobb transzkripció aktivitását észleltük. Ugyanebben a csoportban két osteoblast specifikus transzkripció faktor (RUNX2, SP7) és újabb kettő, amely a Wingless útvonalban (TCF7L2), illetve a porcsejtekérésében (SOX9) játszik szerepet, megnövekedett génexpressziós szintet mutatott. Két MAPK (mitogénaktivált protein kináz) kaszkád által szabályozott növekedési faktor génje (PDGFA, FGFR1), valamint két osteoclast stimuláló faktor (TNFSF11/RANKL, IL6) és egy, a differenciálódott osteoblastokat jelző molekula (ALPL) génátíródása is felerősödött a POST csoportban. Az IGSF4 és a TRIB2 gének kifejeződését elsőként detektáltuk nem osteoporoticus humán csontszövetben. Azt találtuk, hogy ezek a gének nagymértékben expresszálandók a POST csoportban. Az ENO1/MBP1 esetén szignifikánsan csökkent géntranszkripció szintet figyeltünk meg.

Gén szimbólumok	Expressziós arányok	p értékek	Gén szimbólumok	Expressziós arányok	p értékek
COL2A1	8.07	0.02	BMP1A	6.16	0.01
COL3A1	5.62	0.02	TGFB2	3.42	0.04
COL5A1	9.60	0.03	TGFB3	3.70	0.002
COL5A2	4.82	0.02	TGFBR2	3.26	0.03
COL9A1	5.63	0.04	SMAD4	2.59	0.002
COL12A1	5.30	0.02			
COL15A1	6.59	0.01	ENO1 / MBP1	0.53	0.005
MGP	3.28	0.02	RUNX2	2.76	0.01
BGLAP	5.52	0.01	SOX9	9.35	0.04
FN1	4.02	0.01	SP7	5.65	0.04
MMP13	3.70	0.02	TCF7L2	3.02	0.01
BMP1	3.12	0.04			
			TNFSF11	21.57	0.01
PDGFA	2.81	0.04	ALPL	2.48	0.02
FGFR1	3.85	0.005	IL6	7.28	0.02
			IGSF4	3.94	0.02
			TRIB2	2.10	0.02

1. táblázat. Táblázatban foglaltuk össze a génekhez tartozó relatív génexpressziós arányokat (RQ POST / RQ PRE) és a Mann-Witney U teszt szignifikancia értékeit.

3. Új génpolimorfizmusok összefüggése a postmenopausás csonttömeggel

Az FGFR1-ben található *rs6996321* SNP szignifikáns kapcsolatot mutatott a lumbális BMD-vel (az átlag BMD±S.E.M. 0.858 ± 0.013 ; 0.912 ± 0.015 és 0.916 ± 0.029 a 'G/G', 'A/G' és 'A/A' genotípusok esetén). A korrigált BMD értékek szignifikáns különbséget mutattak a domináns genetikai modellben (a korrigált BMD különbségek -0.031 ± 0.011 és 0.031 ± 0.011 g/cm² voltak a 'G/G' és az 'A/G'+ 'A/A' csoportok esetén. $p=0.002$) (4. ábra). A FABP3-ban található *rs10914367* polimorfizmus homozigóta recesszív genotípusa szignifikánsan magasabb BMD-t eredményezett a teljes csípő tekintetében (az átlag BMD±S.E.M. 0.783 ± 0.009 ; 0.776 ± 0.028 és 0.945 ± 0.029 volt a 'G/G', 'A/G' és 'A/A' genotípusokban, míg a korrigált BMD különbségek a recesszív modellben -0.004 ± 0.008 és 0.143 ± 0.037 voltak a 'G/G'+ 'A/G' és az 'A/A' csoportokban. $p=0.028$) (4. ábra).



4. ábra. Egyedi a, FGFR1 és b, FABP3 SNP-k összefüggése a csontdenzitással.

Az OPG polimorfizmusok összefüggést mutattak a lumbális gerinc és a csípő BMD értékekkel. Az *rs1564858* SNP 'A' allélját hordozóknak mind a gerincen, mind a combnyakon kisebb volt a BMD-je (a korrigált BMD különbségek 0.040 ± 0.133 g/cm² volt az 'A/A+A/G' és 0.013 ± 0.155 g/cm² volt a 'G/G' genotípusok esetén a csípőn, $p=0.0001$). A RANKL gén mindkét vizsgált polimorfizmusának hatása volt a gerinc BMD-re (a korrigált gerinc BMD különbségek 0.010 ± 0.163 és 0.040 ± 0.154 voltak a 'C/C+C/T' és 'T/T' csoportokban a két szorosan kapcsolt *rs9533156* és *rs9525641* SNP esetén).

4. Immunológiailag releváns gének expressziós változásainak vizsgálata humán csontszövetben

A természetes immunitás részét képező biológiai mechanizmusokban (mint pl.: a fagocitózis, az akut fázis reakció és a patogénnel asszociált molekuláris mintázatok, mikrobiális struktúrák felismerése) fontos szerepet játszó három gén (FCGR2A/CD32, NFKB1, SCARA3) kétszeres illetve annál nagyobb mértékben csökkent expressziós mintázattal rendelkezik az osteoporoticus csontban. A diszkriminancia analízis szerint az OP és NOP csoportok legerőteljesebb elválása a T-limfociták működésében, és annak szabályozásában szerepet játszó gének esetén volt azonosítható. Emellett a veleszületett immunitásban (antigén bemutatás és fagocitózis) kulcsfontosságú szerepet betöltő gének expressziós mintázata is megváltozik az osteoporoticus csontban, mely a két csoport határozott elkülönülését tette lehetővé.

A menopausa hatását vizsgálva a különböző immunmoduláns gének a csontszöveti kifejeződésére két csoportot tudunk elkülöníteni postmenopausás vs, premenopausás nőkben. Az egyik csoport a komplementrendszer komponenseit kódoló géneket tartalmazza (C3, ITGAM/CD11b), míg a másik csoportba az endogén antigén prezentációs rendszer szabályozásában és a CD8⁺ T sejtek aktiválásában szerepet játszó gének tartoznak (CD86, HLA-A/MHCI, IL-6, RANKL).

KÖVETKEZTETÉSEK

Az osteoporosis kialakulását és a postmenopausás csontanyagcserét befolyásoló genetikai faktorok és a genetikai tényezők egymással való kapcsolata jórészt nem ismert. Az egyes gének, génváltozatok egyedi hatása csekélynek bizonyult a korábbi vizsgálatokban. Az osteoporosis és a menopausát követő multifaktoriális metabolikus változások hátterében poligénes hatás és az egyes gének, géncsoportok egymással való interakciója valószínűsíthető. Vizsgálatunkban először alkalmaztunk rendszerbiológia megközelítést a metabolikus csontbetegségek kutatásában. Több molekuláris szinten (transzkriptomika, genomika, interaktomika) elvégzett vizsgálat segítségével számos adatot gyűjtöttünk a csontszövet megváltozott metabolikus folyamataival kapcsolatban, amely genetikai információk (kvantitatív mRNS expresszió, SNP) nagyban hozzájárulhatnak a csont anyagcsere-betegségeinek megismeréséhez.

- Vizsgálatunkban a postmenopausás osteoporoticus és nem osteoporoticus nők csontszövetében szignifikánsan eltérő génexpressziós mintázatot mutattunk ki. A genetikai adatelemzésben elsőként alkalmaztunk új megközelítési módokat, ill. statisztikai rendszereket (DFA, PCA), amelyek lehetővé tették számos új, az osteoporosisal és a csontmetabolizmussal eddig még összefüggésbe nem hozott gén, illetve géncsoport azonosítását. A transzkripció hálózatban megfigyelt változások tovább segíthetik az osteoporosis során módosult csontanyagcsere folyamatok és ezáltal a betegség patogenezisének megértését.
- Munkánkban vizsgáltuk először az osteoporosis, mint a csontrendszer egészét érintő megbetegedés hatását a csontszövetben zajló lokális gyulladásos és immunreakciókra, továbbá a differenciálódási és érési folyamatokra. Megállapítottuk, hogy az immunrendszerhez szorosan kapcsolódó, elsősorban a veleszületett immunitás részeként megismert gének eltérő expressziós mintázata része lehet a csont-homeosztázis felborulásának.
- Megvizsgáltuk humán post- illetve premenopausás nőkből származó csontszövetek multigénes transzkripció profilját és kimutattunk szignifikáns expressziós különbségeket a két állapot között. A vizsgálatainkkal nyert transzkriptomikai adatok lehetővé tették a postmenopausás és premenopausás csontszöveti fenotípus elkülönítését.
- Kimutattuk a postmenopausás csont immunológiai szempontból meghatározó transzkriptomikai eltéréseit és a genetikai adatok alapján egyértelműen megkülönböztettük a csont menopausás státuszait. Azonosítottunk olyan, az immunrendszer működéséhez szorosan kapcsolt géneket, amelyek markánsan

megváltozott kifejeződése eddig nem volt ismert a postmenopausás csontvesztés vonatkozásában.

- Kutatómunkánk során néhány gén – ALPL, FABP3, FGFR1, MMP2, TIMP2, RANKL, OPG – polimorfizmusainak összefüggését vizsgáltuk a postmenopausás csontvesztéssel. A hét gén új kandidánként szerepelhet a további humán vizsgálatokban, mivel az ortológ-modell, a szarvas-agancsképzés kapcsán kerültek először látóterünkbe és génexpressziós változásaikat humán csontszövetben is leírtuk.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Kumulatív impakt faktor (IF): **42,500**

Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó saját közlemények jegyzéke:

Balla B, Kósa JP, Kiss J, Borsy A, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Nagy Zs, Bácsi K, Speer G, Orosz L, Lakatos P: Different gene expression patterns in bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women. *Calcif Tissue Int* 2008; **82**(1):12-26. **IF:2,435**

Balla B, Kósa JP, Takács I, Kiss J, Podani J, Borsy A, Lazáry Á, Bácsi K, Nagy Zs, Speer G, Orosz L, Lakatos P: Menopauza hatása a csontszöveti génkifejeződésre posztmenopauzás és premenopauzás korú nem oszteoprotikus nőkben. *Magy Belorv Arch* 2008; **61**(3):208-219.

Lazáry Á, Kósa JP, Tóbiás B, Lazáry J, **Balla B**, Bácsi K, Takács I, Nagy Zs, Mező T, Speer G, Lakatos P: Single nucleotide polymorphisms in new candidate genes are associated with bone mineral density and fracture risk. *Eur J Endocrinol* 2008; **159**(2):187-196. **IF:3,239**

Balla B, Kósa JP, Kiss J, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Nagy Zs, Bácsi K, Speer G, Lakatos P: Transcriptional profiling of immune system-related genes in postmenopausal osteoporotic versus non-osteoporotic human bone tissue. *Clin Immunol* 2009; **131**(2):354-9. **IF:3,551**

Kósa JP¹, **Balla B**¹, Speer G, Kiss J, Borsy A, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Nagy Zs, Bácsi K, Orosz L, Lakatos P: Effect of menopause on gene expression pattern in bone tissue of nonosteoporotic women. *Menopause* 2009; **16**(2):367-77. **IF:3,672**

¹, megosztott első szerzőség

Borsy A, Podani J, Stéger V, **Balla B**, Horváth A, Kósa J, Gyurján I Jr., Molnár A, Szabolcsi Z, Szabó L, Jako E, Zomborszky Z, Nagy J, Semsey Sz, Vellai T, Lakatos P, Orosz L: Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. *Mol Genet Genomics* 2009; **281**(3):301-13. **IF:2,978**

Kósa JP¹, **Balla B**¹, Kiss J, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Nagy Zs, Bácsi K, Karsai A, Speer G, Lakatos P: Postmenopausal expression changes of immune system-related genes in human bone tissue. *J Clin Immunol* 2009; **29**(6):761-8. **IF:3,248**

¹, megosztott első szerzőség

Balla B, Kósa JP, Kiss J, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Bácsi K, Nagy Zs, Speer G, Lakatos P: Az immunrendszerben szerepet játszó gének expressziós változásainak vizsgálata osteoporoticus humán csontszövetben. *Immunológiai szemle* 2009; **1**(1-2):13-21.

Takács I, Lazáry Á, Kósa JP, Kiss J, **Balla B**, Nagy Zs, Bácsi K, Speer G, Lakatos P: Allelic variations of RANKL/OPG signaling system is related to bone mineral density and in vivo gene expression. *Eur J Endocrinol* 2010;**162**(2):423-31. **IF:3,791**

Balla B, Kósa J, Takács I, Kiss J, Podani J, Lazáry Á, Bácsi K, Nagy Zs, Speer G, Lakatos P: Rendszerbiológiai szemlélet a primer csontvesztés molekuláris biológiai kutatásában és az osteoporosis immunológiai vonatkozásai. *Orvosképzés* 2009; **84**(S5).

Balla B, Kósa JP, Kiss J, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Bácsi K, Nagy Zs, Speer G, Lakatos P: Menopausa hatása az immunrendszer működését szabályozó gének transzkriptomikai változásaira humán csontszövetben. *LAM – közlésre elfogadva*

Takács I, Lazáry Á, Kósa J, Kiss J, **Balla B**, Nagy Zs, Bácsi K, Speer G, Lakatos P: A RANKL/OPG jelátviteli rendszer allélikus variációinak összefüggése a csonttömeggel és az *in vivo* génextpresszióval. *Magy Belorv Arch – közlésre elküldve*

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:

Kiss J¹, **Balla B**¹, Kósa JP, Borsy A, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Nagy Zs, Bácsi K, Szilágyi E, Szendrői M, Speer G, Orosz L, Lakatos P: Gene expression patterns in the bone tissue of women with fibrous dysplasia. *Am J Med Genet A – közlésre elfogadva*
¹, megosztott első szerzőség

Bácsi K, Kósa J, **Balla B**, Lazáry Á, Takács I, Nagy Zs, Speer G, Lakatos P: A kalciummetabolizmus jelentősége a csonttritkulás és a colorectalis daganat patogenezisében. *Orvosképzés* 2009; **84**(S2):101-10.

Bácsi K, Hitre E, Kósa JP, Horváth H, Lazáry Á, Lakatos LP, **Balla B**, Budai B, Nagy Zs, Lakatos P, Speer G: Effects of the lactase 13910 C/T and calcium-sensor receptor A986S G/T polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer in Hungarian population. *BMC Cancer* 2008; **8**(1):317. **IF:2,709**

Bácsi K, Kósa JP, Lazáry Á, **Balla B**, Horváth H, Kis A, Nagy Zs, Takács I, Lakatos P, Speer G: LCT 13910 C/T polymorphism, serum calcium, and bone mineral density in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2009; **20**(4):639-45. **IF:3,893**

Lazáry Á, Speer G, Varga PP, **Balla B**, Bácsi K, Kósa JP, Nagy Zs, Takács I, Lakatos P: Effect of vertebroplasty filler materials on viability and gene expression of human nucleus pulposus cells. *J Orthop Res* 2008; **26**(5):601-607. **IF:2,437**

Lazáry Á, **Balla B**, Kósa JP, Bácsi K, Nagy Zs, Takács I, Varga PP, Speer G, Lakatos P: A szintetikus csontpótló graftok alkalmazásának összefoglalása. A gipsz szerepe a csontpótlásban: molekuláris biológiai megközelítéssel, saját eredményeink alapján. *Orv Hetil* 2007; **148**(51):2427-2433.

Kósa JP, Kis A, Bácsi K, Nagy Zs, **Balla B**, Lazáry Á, Takács I, Speer G, Lakatos P: Új, a glükokortikoidok csontsejtekre gyakorolt hatásának közvetítésében szerepet játszó gének azonosítása izolált és immortalizált egér osteoblastsejteken. *Magy Belorv Arch* 2007; **60**:435-441.

Bácsi K, Kósa J, Lazáry Á, **Balla B**, Horváth H, Takács I, Nagy Zs, Speer G, Lakatos P: A CYP3A7*1C polimorfizmus hatása a csont ásványanyag-tartalmára posztmenopauzás nőkben. *Orv Hetil* 2007; **148**(27):1273-1280.

Bácsi K, Kósa J, Lazáry Á, Horváth H, **Balla B**, Lakatos P, Speer G: A dehidroepiandroszteron és dehidroepiandroszteron szulfát jelentősége a különböző kórállapotokban. *Orv Hetil* 2007; **148**(14):651-657.

Bácsi K, Kósa JP, Borgulya G, **Balla B**, Lazáry Á, Nagy Zs, Horváth Cs, Speer G, Lakatos P: CYP3A7*1C polymorphism, serum dehydroepiandrosterone sulfate level and bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2007; **80**(3):154-159. **IF:2,435**

Lazáry Á, **Balla B**, Kósa JP, Bácsi K, Nagy Zs, Takács I, Varga PP, Speer G, Lakatos P: Effect of gypsum on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells. *Biomaterials* 2007; **28**(3):393-399. **IF:6,262**

Az értekezés témájához kapcsolódó idézhető előadáskivonatok:

Balla B, Kósa JP, Takács I, Speer G, Nagy Zs, Kiss J, Podani J, Lakatos P: Menopausa hatása az immunrendszer működését szabályozó gének csontszövet-specifikus kifejeződésére X. *Magyar Osteológiai Kongresszus Balatonfüred, 2009. május 20-23. Ca és Csont* 2009, **12**(2):57

Balla B, Kósa JP, Kiss J, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Nagy Zs, Bácsi K, Speer G, Lakatos P: Transcriptional profile of immune system-related genes in postmenopausal osteoporotic versus non-osteoporotic human bone tissue. *ECTS 35th European Symposium on Calcified Tissues* Barcelona, Spain, 2008. május 24-28. *Calcif Tissue Int* 2008, **82**(S1):Su-P207

Balla B, Kósa JP, Kiss J, Podani J, Takács I, Speer G, Nagy Zs, Lazáry Á, Bácsi K, Lakatos P: Immunológiailag releváns gének expressziójának összehasonlító elemzése osteoporotikus és nem-osteoporotikus nők csontszövetében. *IX. Magyar Osteológiai Kongresszus Balatonfüred, 2008. május 21-24. Ca és Csont* 2008, **11**(2):81

Balla B, Kósa JP, Kiss J, Borsy A, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Nagy Zs, Bácsi K, Speer G, Orosz L, Lakatos P: Effect of estrogen deficiency on gene expression pattern in the bone tissue of postmenopausal versus premenopausal healthy women. *ASBMR 29th Annual Meeting* Honolulu, HI, USA, 2007. szeptember 16-19. *J Bone Miner Res* 2007, **22**(S1):S261

Balla B, Kósa J, Takács I, Kiss J, Borsy A, Podani J, Lazáry Á, Bácsi K, Nagy Zs, Speer G, Orosz L, Lakatos P: Ösztrogén hiányában fellépő génexpressziós változás vizsgálata posztmenopauzális és premenopauzális nem-osteoporotikus nők csontszövetében. *VIII. Magyar Osteológiai Kongresszus Balatonfüred, 2007. május 23-26. Ca és Csont* 2007, **10**(2):51

Balla B, Kósa J, Takács I, Kiss J, Borsy A, Podani J, Lazáry Á, Bácsi K, Nagy Zs, Speer G, Orosz L, Lakatos P: Génexpressziós mintázat vizsgálata postmenopausas egészséges és osteoporotikus nők csontszövetében. *VII. Magyar Osteológiai Kongresszus Balatonfüred, 2006. május 24-27. Ca és Csont* 2006, **9**(1):11

Balla B, Kósa J, Takács I, Kiss J, Borsy A, Podani J, Lazáry Á, Bácsi K, Nagy Zs, Speer G, Orosz L, Lakatos P: Génexpressziós mintázat vizsgálata prae- és postmenopausas egészséges nők csontszövetében. *Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XXI. Kongresszusa* Debrecen, 2006. május 18-20. *Magy Belorv Arch* 2006, **59**(1):24

Borsy A, **Balla B**, Gyurján I, Stéger V, Molnár A, Szabolcsi Z, Kósa J, Zomborszky Z, Papp P, Vellai T, Lakatos P, Orosz L: Red deer biology for biochemical research on human osteoporosis. *ECTS 33rd European Symposium on Calcified Tissues* Prague, Czech Republic, 2006. május 10-14. *Calcif Tissue Int* 2006, **78**(S1):P138

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Megkülönböztetett tiszteletemet, elismerésemet és köszönetemet fejezem ki Lakatos Péter professzor úrnak, aki a Klinikán laboratóriumában biztosította a kutatómunkámhoz szükséges feltételeket, elindított ezen az úton, valamint, hogy munkám során végig mellettem volt és határozottan támogató. Szakmai útmutatásán túl atyai jó tanácsai, kritikai megjegyzései is segítettek a dolgozat elkészítésében. Korábbi közleményeim és jelen dolgozatom elkészítésében útmutatásai irányítottak.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Takács István docens úrnak baráti segítségét, biztatását a Ph.D. dolgozat megírására és természetesen, hogy elvállalta témavezetésemet és a dolgozatom kijavításával is segítette munkámat.

Különös hálával tartozom dr. Speer Gábornak, dr. Nagy Zsoltnak és dr. Tóth Tamásnak az együtt végzett munkáért és a sok szakmai segítségért.

Köszönöm kutatócsoportunk tagjainak, elsősorban Kósa Jánosnak, dr. Lazáry Áronnak, dr. Bácsi Krisztiánnak, dr. Kis Adriánnak, Tóbiás Bálintnak és mindazoknak, akik az elmúlt évek során tanácsaikkal és kritikájukkal támogatták munkámat.

Köszönetemet fejezem ki Podani János professzor úrnak, aki megismertetett a többváltozós statisztikával, nélküle a dolgozat statisztikai kiértékelése sokkal semmitmondóbb lenne.

Köszönöm az ELTE Genetika tanszékén dolgozó kollégák segítségét, elsősorban Borsy Adriennek, Gyurján Istvánnak, Stéger Viktornak, Vellai Tibor és Orosz László professzor úrnak.

Köszönöm laboratóriumunk minden kedves munkatársának, elsősorban Szabóné Sinkovits Tünde, Keresztényi Györgyi és Máté Edit türelmét és gyakorlati segítségét