

# **LINK PROTEIN A PORC ÉS MÁS SZÖVETEK EXTRACELLULÁRIS MÁTRIXÁBAN**

Ph.D. értekezés tézisei

**Dr. Czipri Mátyás**

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Klinikai Központ  
Ortopédiai Klinika

Doktori Iskola vezetője:	Prof. Dr. Kovács L. Gábor
Programvezető:	Prof. Dr. Than Péter
Témavezető:	Dr. Vermes Csaba
Mentor:	Prof. Dr. Glant T. Tibor

Pécs

2015

## RÖVIDÍTÉSEK

AGC: aggregán  
*Agc1*: egér aggregán gén  
BMP: bone morphogenic protein  
cDNS: komplementer dezoxiribonukleinsav  
CNS: central nervous system  
COC: cummulus-oocyte complex  
*Crtl1*: egér porc link protein gén  
Cspg: chondroitin szulfát proteoglikán  
DNA: deoxyribonucleic acid  
ECM: extracelluláris mátrix  
GAG: glükózaminoglikán  
GAPDH: glyceraldehyde-foszfát-dehydrogenáz  
HA: hyaluronsav  
LP: porc link protein  
mRNS: messenger ribonukleinsav  
PCR: polymerase chain reaction  
PG: proteoglikán  
RNA: ribonucleinsav  
RT-PCR: reverz transkriptáz-polymerase chain reaction  
RT-QT-PCR: real time-quantitative-PCR  
SED: spondyloepiphyseal dysplasia

## 1. BEVEZETÉS

A porcsejtek más szövetek sejtjeihez hasonlóan informácóban gazdag extracelluláris környezetben léteznek, melyet extracelluláris mátrix (ECM) molekulák építenek fel. Ez a környezet növekedési faktorokkal, hormonokkal és ECM remodelláló enzimekkel áll kölcsönhatásban. Az ECM struktúrális információit sejtfelszíni receptorok kötik össze a sejt belsejével. Az általuk kiváltott komplex intracelluláris válaszmechanizmusok határozzák meg a porcsejtek génextpresszióját és ezáltal az ECM felépítését.

Az ECM fő makromolekuláris komponensei a proteoglikánok (PG) közé tartozó aggregán (AGC), hyaluronsav (HA), porc link prortein (LP) és II-es típusú kollagén. Az AGC a porc fehérjetartalmának 35%-át teszi ki, de a legnagyobb mennyiségben jelen lévő, mintegy 60 %-ot kitevő protein a II-es típusú kollagén. A LP ugyanakkor a porc száraz súlyának csupán 0,05%-át reprezentálja. Ezen kis molekulásúlyú (46 kDa) globuláris glikoprotein legfőbb tulajdonsága hogy HA kötő képességgel rendelkezik. A LP-t először, mivel ott nagy mennyiségben található, porcból azonosították, és porc link proteinnek (cartilage link protein) nevezték el.

AGC molekulák egy centrális HA szálhoz százával kapcsolódva óriás ( $10^8$ - $10^9$  Da) PG aggregátumokat hoznak létre. A LP egyszerre kötődik a HA szálhoz és a vele szomszédos AGC molekulához, ezáltal stabilizálja az aggregátum szerkezetét. Ezen óriásmolekulák a II-es típusú kollagén rostok hálózatába ágyazódnak. Az AGC negatív töltésű glükózaminoglikán (chondroitin-szulfát) oldalláncai nagy mennyiségben kötnek meg vizet, és ezért felelősek a porc rugalmas összenyomhatóságáért. A kollagén rostok biztosítják a rugalmas nyújthatóságot. Míg az ECM megfelelő összetétele biztosítja a porc mechanikai tulajdonságait, az ECM molekulái a szerkezeti szerepükön túl biztosítják és befolyásolják azt a környezetet amelyben a porcsejtek élnek és differenciálódnak. Ilyen módon az ECM makromolekulái alapvető fontosságúak a porcsejtek differenciálódásában és az enchondrális csontosodás folyamatában. Ezért az ECM felépítésében résztvevő molekulákat kódoló gének mutációi a skeletális fejlődés örökletes zavaraihoz, azaz osteochondrodysplasiákhoz vezethetnek.

A human chondrodysplasiák a skeletális fejlődés zavarainak diverz és genetikailag heterogén csoportját alkotják. Ezen eltérések molekuláris genetikai hátterére vonatkozó ismeretek robbanászerű fejlődésének köszönhetően klasszifikációjukban változás következett be, most már figyelembe véve az érintett géneket és pathogenetikai folyamatokat. A mi szempontunkból legfontosabb csoportba az extracelluláris struktúrális proteinek defektusai tartoznak, köztük néhány igen jól feltérképezett osteochondrodysplasia családdal. A human chondrodysplasiákhoz hasonlóan állatokon is ismertek természetesen előforduló mutációk, melyek a porc ECM struktúrális fehérjéit kódoló géneket érintik. Ezek a mutációk is chondrodysplasiás fenotípushoz vezetnek, és gyakran halálosak. Ezen eltéréseken túlmenően számos kísérletes állatmodell (elsősorban egér) is ismeretes, ahol különböző genetikai módszerekkel az ECM fehérjéit kódoló gének célzott mutációja érhető el. Az állatmodellek értékét az adja, hogy lehetőséget nyújtanak a molekuláris mechanizmusok olyan szintű vizsgálatára, mely humán viszonylatban nem lehetséges. Ezen túlmenően segítenek megjósolni human betegségeket és lehetőséget adnak a pathogenezissel és új terápiás lehetőségekkel kapcsolatos kérdések megválaszolására.

Noha a LP és más porc ECM protein gének szerepét human chondrodysplasiák kialakulásában korábban kizárták, egy egér modellben a porc LP gén (*Crtll*) célzott mutációja (knockout) fényt derített a LP chondrocyta differenciálódásban, porc ECM szabályozásban és a skeletális fejlődésben betöltött kimagasló szerepére. A homozigóta knockout egyedeken (*Crtll*<sup>-/-</sup>) súlyos letális osteochondrodysplasia alakul ki, de a heterozigóták (*Crtll*<sup>+/-</sup>) normálisan fejlődnek. A legtöbb homozigóta knockout születés után elpusztul légzési elégtelenség miatt, amit a respiratorikus rendszer porcok elemeinek fejletlensége okoz. A néhány túlélő progresszív törpenövést és spondyloepiphyseális dysplasiára emlékeztető eltéréseket mutat. Az érintett állatok törzse és végtagjai megrövidültek, a csigolyatestek ellapultak, a fej jellegzetesen kupolaszerű megjelenést mutat megrövidült orral.

## **2. CÉKITŰZÉSEK**

### **2.1 A porc link protein hiány okozta chondrodysplasia és perinatális letalitás genetikai helyreállítása.**

Célunk az volt, hogy vizsgáljuk a LP szerepét a porc extracelluláris mátrixában és az egér skeletális fejlődésében. Cékitűzéseink eléréséhez a következő kísérletek végeztük:

- LP transzgenikus egereket hoztunk létre porc-specifikus expressziós vektort alkalmazva. Feltételeztük, hogy a transzgének által diktált LP túltermelés fenotípus változáshoz vezet.
- A transzgenikus modellhez szükség volt az egér LP gén kódoló szekvenciájára. Első lépésként meghatároztuk az egér LP gén szerkezetét és cDNS szekvenciáját.
- A “rescue” kísérletek során a transzgenikus egereinket knockout egerekkel kereszteztük, hogy LP géneket juttassunk a LP deficiens knockout egerek genomjába. Feltételeztük, hogy a transzgének által biztosított fehérjetermelés pótolja a kiesett LP termelést, terápiás hatással lesz a chondrodysplasiás elváltozásokra és biztosítja az egyedek túlélését.
- A keresztezések során LP-t különböző mennyiségben termelő transzgenikus vonalakat használtunk annak vizsgálatára, hogy a különböző mennyiségben helyreállított fehérjetermelés milyen hatással van a fenotípusra. A megmentett egyedeket részletesen vizsgáltuk.

### **2.2 Link protein a porcon kívül**

Más vizsgálatok porc LP jelenlétét igazolták a porcon kívül számos más szövetben is. Célunk volt a LP szöveti előfordulásának szisztematikus feltérképezése az egerek fejlődése során különböző szövetekben és szervekben mind a génexpresszió, mind a proteintermelés szintjén. Cékitűzéseink eléréséhez a következő kísérletek végeztük:

- Meghatároztuk a LP génexpresszió előfordulását különböző szövetekben.
- Megmértük a LP génexpressziót az egyedfejlődés különböző stádiumaiban, különböző szervekben.
- Meghatároztuk a LP fehérjetermelés előfordulását különböző szövetekben.

### 3. A PORC LIK PROTEIN HIÁNY OKOZTA CHONDRODYSPLASIA ÉS PERINATÁLIS LETALITÁS GENETIKAI HELYREÁLLÍTÁSA.

#### 3.1 Anyag és módszer

##### 3.1.1 Az egér LP gén izolálása és klónozása

Újszülött egerek porcából RNS-t izoláltunk és azt reverz transzkripcióval átírtuk. A reverz transzkripció előtt a mintákat DN-áz I-gyel (Invitrogen, Carlsbad, CA) emésztettük a genomiális DNS eliminálása céljából. First-strand cDNS-t 1µg teljes RNS-ből oligo-d(T) primerrel szintetizáltunk SuperScript II reverz transzkriptázt (Invitrogen) használva. Az egér LP gén azonosításának stratégiája RT-polimeráz lánc reakción (PCR) alapult, először különböző fajokból származó homolog primereket, majd egér specifikus primereket használva. A PCR termékeket TA-vektorba (Invitrogen) klónoztuk, majd szekvenáltuk mindkét irányból. Az 5' és 3' végekről átfedő klónokat generáltunk 5' RACE system (Clontech, Palo Alto, CA) and 5' and 3' Genome Walker (GW) system (Clontech) alkalmazásával, melyeket pT-ADV vektorba klónoztunk. Az 5' transzkripció kezdő hely meghatározására primer extenziót alkalmaztunk. Egy az 1-es exonból származó jelölt reverz primert használtunk az egér chondrocytákból származó mRNS átírására és egy genomiális DNS-ből származó PCR termék szekvenálásához, mely a LP promoter régiójából származott. A [<sup>33</sup>P]-ATP-vel jelölt RT termék és a szekvenáló reakció párhuzamosan került futtatásra 7%-os Long Ranger sequencing gélen (FMC, Rockland, ME). Az intron-exon szerkezet meghatározására a GW csomagot használtuk génspecifikus nested primereket választva a szomszédos exonokból. A PCR termékeket szekvenáltuk, és az Omiga<sup>TM</sup> 2.0 kompjúter csomagot (Oxford Molecular Group, Hunt Valley, MD) vagy az NIH BLAST szerveret használva szekvencia analízist végeztünk.

##### 3.1.2 LP transzgenikus egerek előállítás

Olyan transzgenikus egerek létrehozására, melyek feleslegben termelik a LP-t a porc-szövetben, porc-specifikus transzgenikus expressziós vektort terveztünk. A vector a pSPORT-1-ből származott. Az 5' doboz tartalmazza a II-es típusú kollagén promóter régióját. A 3' végén egy 0,5 Kb nagyságú szakasz tartalmazza az SV40 promótert és a Poly A adenylációs helyet. Az SV40 nonspecifikus enhancer funkcióval is rendelkezik. A vektor 3' végén egy 1,5 Kb szakasz tartalmazza a II-es típusú kollagén enhancer régióját. Ezek a szabályozó elemek együttesen biztosítják a porc-specifikus expressziót. A teljes LP kódoló szekvenciát tartalmazó 1758 bázispár hosszúságú cDNS fragmentum a transzgenikus vector polylinker helyére került beillesztésre. A transzgenikus konstrukciót mikroinjekció formájában (DNX Technologies, Princeton, NJ) juttattuk be. Kezdetben tíz egérben volt megtalálható a transzgén. Ezekből négy független transzgenikus vonal lett kitenyésztve, és végül két transzgenikus törzs került felhasználásra a kísérleteinkben: egy alacsony (*CrtII<sup>TgA</sup>*) és egy magas (*CrtII<sup>TgC</sup>*) magas transzgén-, és protein expressziójú.

### **3.1.3 A transzgenikus és knockout egerek genotípusának meghatározása.**

Az egerek genotípusának meghatározása genomiális DNS mintákból, gén-specifikus vagy neomycin (Neo)-specifikus primerekkel történt. Genomiális DNS-t az állatok farkából izoláltunk standard módszerekkel. A transzgén detektálására különböző exonokból származó primer párokat használtunk. *Crt11* knockout heterozigótákat két PCR termék együttes jelenlétével igazoltuk (283 bp Neo nélkül, 1.88 Kbp Neo-val), melyhez gén-specifikus forward és reverse primereket használtunk a 3-as intronból és a 4-es exonból, közrefogva a knockout konstrukció helyét. *Crt11* knockout homozigótákat a 283 bp nagyságú termék hiányán kívül egy Neo-specifikus primer párral és egy Neo- és gén-specifikus primer párral is igazoltuk.

### **3.1.4 Poliklonális antitestek előállítása**

Egér LP ellenes antitesteket nyúlban termeltettünk, azokat szintetikus peptidekkel (Research Genetics, Huntsville, AL) immunizálva. A peptideket (LPro1 <sup>142</sup>VIEGLEDDTGV és LPro2 <sup>341</sup>KKHKLYGVYCFRAYN) hidrofil tulajdonságukat és jósolható atigenitásukat figyelembe véve terveztük Omega 2.0 szoftver csomag segítségével. A peptideket Keyhole Limpet hemocyanin-hoz kapcsoltuk, PBS-ben feloldottuk és 1 ml Freund adjúvánszal emulziót készítettünk. Mindegyik peptiddel három nyulat immunizáltunk intramuszkuláris injekcióval. 2-3 hetente emlékeztető injekciót adtunk a peptideket inkomplett Freund adjúvánsban emulzifikálva. Az immunizált nyulak szérumát az ötödik injekció után kezdtük gyűjteni hetente. Az antitesteket szulfolink oszlopokhoz kötött, nekik megfelelő peptidekkel tisztítottuk. Mindegyik antitest felismerte az egér LP-t, de a LPro1-R11 és LPro2-R18 jelölésű volt a legspecifikusabb. Ez a két antitest került felhasználásra Western blot analízishez és immunhisztokémia során.

### **3.1.5 Fehérje izolálás, tisztítás és Western blot analízis**

A LP fehérje termelés detektálása és kvantitatív analysise újszülött egerek skeletális szöveteiből készült extraktumokon, Western blot segítségével történt. A mélyfagyasztott és porított porc mintákból a fehérje extrakció 4 mólos guanidinium klorid oldatban történt, majd a minták azok dialízise, liofilizálása és normalizálása után kerültek felhasználásra Western blot analízishez. A fehérjéket 10%-os SDS-polyacrylamide gélen szeparáltuk, majd nitrocellulóz filterre (BioRad, Hercules CA) való átvitelt követően a nyúlban termeltetett LP ellenes poliklonális antitestekkel (LPro1-R11 vagy LPro2-R18) kezeltük. A másodjára hozzáadott, peroxidázzal jelölt, kecskében termeltetett nyúl-ellenes antitest a végül hozzáadott luminol szubsztráttal kemilumineszcens reakciót váltott ki (Amersham). A felszabaduló fényjelenséget, mely arányos a minta LP tartalmával, röntgenfilmen rögzítettük. Előhívás után az eredményeket PDI gél scanner és szoftver segítségével értékeltük (Protein Database Inc., Huntington Station, NY).

### **3.1.6 A génexpresszió mérése**

A porc LP gén expresszióját real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-QT-PCR) segítségével (Smart Cycler System, Cepheid, Sunnyvale, CA) mértük. Az analízishez szükséges cDNS mintákat újszülött egerek porcintáiból kivont RNS-t használva állítottuk elő reverz transzkripcióval. A reakciós oldathoz LP génspecifikus primereket használtunk, és

a gén expressziót a dupla szálú DNS-hez kötődő CYBR green festék fluoreszcenciáját valós időben (real time) mérve határoztuk meg. A reakciók 25 µl-es csövekben történtek. 1 µl cDNS mintát adtunk az alábbi reakciós oldathoz: 0.5 µM *Crt11* specifikus forward és reverse primers, 1:50,000 hígítású SYBR Green-I alapoldat (BioWhitaker Mol. Appl. Cambrex, Rockland, ME), 200 µM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, és 2.5 egység Taq DNS polimeráz (Promega, Madison, WI). Normalizáláshoz, gliceraldehid-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) génextpresszióját mértük specifikus primerekkel. Minden genotípushoz tartozóan három különböző alomból származó három állat két független mintáját használtuk

### **3.1.7 A skeletális szövetek festése és histológiai vizsgálata.**

Újszülött egerek csontos és porcós vázrendszerét alizarin vörös és alcian kék 70%-os ethanolos oldatában festettük meg. A hisztológiai szövetmintákat 10%-os pufferált formailnban fixáltuk, és 1-2 hetes dekalcinálás után paraffinba ágyztuk. A 6 µm vastagságú metszeteket safranin O, fast green és vas hematoxylin kombinációjával festettük. Immunhisztokémiához a szövetmintákat OCT compound-ba (Sakura Finetec, Torrance, CA) ágyztuk, és a 6-8 µm vastagságú fagyasztott metszeteket 3-aminopropyltriethoxi-silane bevonatú (Sigma) tárgylemezen jéghideg acetonban fixáltuk 5 percig. A metszeteket PBS-ben mostuk, proteáz mentes chondroitináz ABC-vel előkezeltük 37 °C fokon 30 percig, majd normál kecske szérum 10%-os PBS oldatában inkubáltuk. A metszeteket LPro1-R11 poliklonális antitesteket 1 %-os normál kecske szérumot tartalmazó PBS-ben oldva (1:100) immunfestettük 1 órára szobahőmérsékleten. Mosást követően a metszeteket rhodaminnal konjugált, kecskében termeltetett nyúl ellenes antitestekkel kezeltük (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1:100-as PBS hígításban 1 órára. A metszeteket mostuk, majd Fluoromount-tal (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) fedtük. Az analízishez Nikon Microphot-FXA mikroszkópot vagy Eclipse TE 200 konfokális mikroszkópot (Nikon, Garden City, NJ) használtunk.

### **3.1.8 Tenyésztési protokoll**

A “rescue” kísérletek során olyan állatok kitenyésztése volt a cél a két törzs (knockout és transzgenikus) keresztezésével, melyek saját LP génjüket tekintve homozigóta mutánsok, ugyanakkor hordozzák a transzgént (*Crt11*<sup>-/-</sup>*Crt11*<sup>Tg+</sup>). Először a transzgenikus A és C törzs homozigóta nőstényeit (*Crt11*<sup>TgA</sup> és *Crt11*<sup>TgC</sup>; F9-F10 generációk) kereszteztük heterozigóta LP knockout hímekekkel (*Crt11*<sup>+/-</sup>), heterozigóta *Crt11*<sup>+/-</sup>*Crt11*<sup>Tg+</sup> utódok létrehozása érdekében. Az utódok genotípusát PCR segítségével meghatároztuk, és azokat az egyedeket választottuk ki további tenyésztésre, melyek knockout heterozigóták voltak és ugyanakkor hordozták a transzgént is. A kívánt genotípusú, transzgént hordozó homozigóta mutánsok (*Crt11*<sup>-/-</sup>*Crt11*<sup>TgA+</sup> vagy *Crt11*<sup>-/-</sup>*Crt11*<sup>TgC+</sup>) a második generációban jelentek meg.

## **3.2 Eredmények**

### **3.2.1 Az egér *Crt11* gén kódoló régiója és génszerkezete**

Meghatároztuk a 2780 bp hosszúságú egér LP cDNS szekvenciát mely AF 098460 szám alatt került a génbank (GeneBank-EMBL) adatbázisába. A kódoló régió egyetlen nyitott 1065



nukleotid nagyságú reading frame-t tartalmaz, mely egy 355 aminosavból álló fehérjét kódol. Összehasonlító analízis 99%-os homológiát mutatott a patkány, és 96%-os homológiát a humán LP génnel. Az 5' transzkripció start helye -368 bp pozícióban van a transláció start helyéhez viszonyítva. A 68099 bp hosszúságú egér *Crtll* gén a 13-as kromoszómán helyezkedik el a 90,138 és 90,206 Mb közötti régióban, közvetlenül a verzikán gén (*Cspg2*) felett fej a fejhez orientációban. Az 1-es exon nem kódol, a 2-es exon tartalmazza a transláció start kodont, a signal peptidet és N-terminális szekvenciát, a 3-as exon kódolja az A hurkot, a 4-es exon kódolja a B hurkot, és az 5-ös exon kódolja a B' hurkot és a 3' nem kódoló régiót.

### 3.2.2 *Link protein transzgenikus egerek*

Négy LP transzgenikus alapító állat mutatott stabil transzgen átörökítést az utódaiba, és került felhasználásra független transzgenikus törzsek létrehozására. Southern blot és denzitometriás analízis alapján a transzgenikus C törzs alapítója rendelkezett a legmagasabb, több mint 20 transzgen másolattal. Az A, B és D törzsek alapítói kevesebb mint 10 másolatot hordoztak. A magas transzgen expressziójú C törzs és a legjobban szaporodó A törzs tenyésztését folytattuk, hogy olyan homozigóta LP transzgenikus törzsekhez jussunk, melyek LP expressziója mennyiségileg különbözik. A LP porc-specifikus túltermelése nem okozott fenotípusbeli változást. Fiziológiás szövet és szervfejlődés, fiziológiás enchondrális csontosodás és skletális fejlődés, valamint fiziológiás születési arányok és növekedés volt megfigyelhető.

### 3.2.3 *A genetikailag manipulált egerek túlélése*

A kiindulási feltételezésnek megfelelően azok az egyedek, melyeknek saját LP termelésük a homozigóta mutáció miatt nem volt, de valamelyik transzgent hordozták (*Crtll*<sup>-/-</sup>*Crtll*<sup>TgA+</sup> vagy *Crtll*<sup>-/-</sup>*Crtll*<sup>TgC+</sup>) túléltek. Különbség volt azonban a túlélési arányokban annak megfelelően, hogy a túlélést biztosító transzgen az A, vagy a C transzgenikus törzsből származott. A túlélési arányok a harmadik generációban stabilizálódtak úgy hogy az A transzgent hordozó homozigóta knockout egerek (túlélő A csoport) aránya 12,9%, a C transzgent hordozó homozigóta knockout egerek (túlélő C csoport) aránya pedig 21,1% volt az összes élveszületésre számítva. Összehasonlításképpen, a szelektív tenyésztés során a Mendeli szabályok szerint, valamint a homozigóta mutánsok szükségszerű perinatális pusztulásával is számolva a harmadik generációban a kalkulált várható túlélési arány 29,3% volna.

### 3.2.4 *A genetikailag manipulált egerek génexpressziója és protein termelése*

Heterozigóta knockout egerekben (*Crtll*<sup>+/-</sup>) a LP génexpresszió kevesebb, mint fele volt mérhető, míg a fehérjetermelés 54±7% (n=10) volt a vad típusú (*Crtll*<sup>+/+</sup>) kontrollhoz képest, ugyanakkor ezen egerek skeletális fejlődése, és születési aránya fiziológiás maradt. A homozigóta LP deficiens egerekben (*Crtll*<sup>-/-</sup>) sem LP génexpresszió, sem fehérjetermelés nem volt kimutatható. A real time PCR mérések nem igazoltak magasabb LP génexpressziót a transzgenikus A törzsből (*Crtll*<sup>TgA+</sup>) Ugyanakkor a termelt LP fehérje mennyisége mintegy 50 %-kal (48±24 %, n=11) magasabb volt, mint a vad típusú kontrollban. A transzgenikus C törzsből (*Crtll*<sup>TgC+</sup>) a LP génexpresszió legalább háromszoros volt a kontrollhoz képest. Ugyanitt, a megnövekedett génexpresszióval társultan a porc LP fehérje tartalma 153±21%-

kal (n=9) volt magasabb. Mindkét túlélő csoportban alacsonyabb volt a mért LP géneexpresszió a vad típusú kontrollhoz viszonyítva úgy, hogy nem várt módon a túlélő A csoport (*Crtll<sup>-/-</sup>Crtll<sup>TgA+</sup>*) géneexpressziója magasabb volt, mint a túlélő C csoport (*Crtll<sup>-/-</sup>Crtll<sup>TgC+</sup>*) géneexpressziója. Ezzel ellentétben a LP fehérjetermelés a túlélő C csoportban volt magasabb, a kontrollhoz képest annak valamivel több mint fele (56±6%, n=10). A túlélő A csoportban ennél kevesebb, csupán 14±3% (n=10) volt mérhető. A fehérjetermelés változásai minden csoportban szignifikánsak (p<0,01) voltak a vad típusú kontrollhoz képest. Szignifikáns volt a különbség a két transzgenikus törzs és a két túlélő csoport között is (p<0,01).

### 3.2.5 *Phenotype of the link protein-rescued mice*

A két különböző túlélő csoportban (A és C) a transzgén (*Crtll<sup>TgA+</sup>* és *Crtll<sup>TgA+</sup>*) általi biztosított fehérje produkció eltérő szintjének megfelelően szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők. Azon túlmenően, hogy az alacsonyabb LP szintet mutató A csoport túlélési aránya elmaradt az erősebb C csoport túlélése mögött, ezeket az állatokat szignifikánsan súlyosabb osteochondrodysplasiás elváltozások jellemezték. A túlélő A csoport egyedei születéskor jóval kisebbek voltak társaiknál. Mind a törzs, mind a végtagok rövidebbek voltak, és jelentős különbségek voltak a fej nagyságában és alakjában. Az állatok orra megrövidült, a fej anteroposterior átmérője kisebb volt, az agykoponya kupolaszerű megjelenést mutatott. A törpe növekedés az egyedek fejlődése során egyre kifejezettebbé vált. A hosszú csöves csontok epiphysis magjai késve jelentek meg, de a csontok meta-, és diaphysisén nem voltak morfológiai eltérések, eltekintve az átlagosan 15%-os rövidüléstől. A gerinc csigolyatestei ellapultak, és jelentős szagittális síkú görbületek alakultak ki, melyek az életkor előrehaladtával fokozódtak. A felső thoracalis szakaszon hyperlordosis, az alsó thoracalis szakaszon hyperkyphosis alakult ki. A túlélő C csoportban ezzel szemben csak nagyon enyhe skeletális elváltozások voltak megfigyelhetők.

A növekedési porc felépítésében is jelentős eltérések voltak, elsősorban a túlélő A csoportban. A növekedési porc kiszélesedett és jóval sejtsejtyesebb volt a kontrollnál, de a C csoport osteochondrodysplasiásaihoz viszonyítva is. A porcsejtek számának csökkenése megfigyelhető volt a proliferációs-, a prehypertrophias-, és a hypertrophias zónában egyaránt. A sejtek oszlopokba rendeződése a hypertrophias zónában megmaradt, de a másik két zónában többé-kevésbé fellazult, mely a növekedési porc struktúrájának felbomlását eredményezte. A szükségszerűen megnövekedett mennyiségű ECM proteoglikánokhoz kötődő safranin O festődése megmaradt mindkét túlélő csoportban. A kalcifikációs zónában kialakuló csontgerendák is elsősorban a túlélő A csoportban voltak vékonyabbak.

A túlélő A csoport fenotípusa nagyban hasonlított azokhoz a masszív chondrodystrophias eltérésekhez, melyeket korábban a *Crtll<sup>-/-</sup>* egerekben írtak le. Ezzel szemben a túlélő C csoportban olyan enyhébb skeletális eltéréseket tapasztaltunk, mint a hosszú csöves csontok megkisebbedett epiphysis magjai, platyspondylia, és a növekedési porc sejt számának csökkenése az ECM mennyiségének növekedése mellett.

### 3.3 Megbeszélés

Ez a fejezet összefoglalja a porc LP hiánya által kiváltott chondrodysplasia és perinatális letalitás részleges és teljes genetikai helyreállítását. A transzgén hatása azaz a genetikai “rescue” dózis dependens, és az eredmények azt bizonyítják, hogy a LP mennyiségének 50% körüli csökkenése nem okoz szignifikáns eltéréseket. *Crtll*<sup>-/-</sup> egerekben a születés utáni halandóságot a megfelelő porcos komponensek hiánya miatt összeomló felső légúti rendszernek tulajdonítják. Ezen túlmenően ezekben az egerekben kialakult gerincdeformitás miatt a mellkas anteroposterior átmérője csökken, tovább rontva a cardiorespiratórikus funkciót. Érdekes, hogy a túlélő A csoportban a vad típus fehérjetermelésének 14±3%-a képes volt helyreállítani a légzési problémákat és buiztosítani az egerek túlélését annak ellenére, hogy az egerek törpék maradtak és relative súlyos skeletális eltéréseket mutattak. Eza a megfigyelés felveti azt a kérdést, hogy hogyan képes ez a viszonylag alacsony LP fehérjemennyiség helyreállítani a porc funkcióját ha csupán egyszerű struktúrális molekula szerepét játssza?

Korábbi publikációkban a *Crtll* egerek növekedési porcának jelentős dezorganizációját írták le, és az egerek 93%-a elpusztult születés után. Azt a következtetést vonták le, hogy a LP elsősorban a chondrocyta differenciáció prehypertrophiásból hypertrophiásba való átalakulás lépcsőjére van hatással, ami jó összefüggést mutat a LP expressziós mintázatával, ugyanis az a prehypertrophiás zónában a legmagasabb. Az AGC szintje a *Crtll*<sup>-/-</sup> porcban jelentősen csökkent, mely bizonyítja a LP szerepét a PG aggregátumok képzésében. A *Crtll*<sup>-/-</sup> egerekkel ellentétben mindkét túlélő csoportban felismerhető maradt a porcsejtek oszlopokba rendeződése, de a túlélő A csoportban minden zónában kifejezettebb volt a sejtszám csökkenése. Ezen túlmenően a porc ECM PG tartalma nem mutatott eltérést a vad típushoz képest. A növekedési porc szerkezetének minden változása a LP mennyiségi különbségét tükrözte.

Ha a *Crtll*<sup>-/-</sup> egerekben az AGC mennyiségének csökkenését a LP stabilizáló hatásának elvesztésével magyarázzuk, akkor azt várhatnánk, hogy a LP fiziológiás mennyiségben szükséges a PG aggregátumok képzéséhez, tekintve hogy a LP és AGC 1:1 sztöchiometriai arányban szerepel a LP-AGC-HA harmadlagos szerkezetben. Ezzel ellentétben kísérleteink során szignifikánsan alacsonyabb LP mennyiség is hatékonyan állította helyre a porc szerkezetét. Lehetséges, hogy mindez a LP növekedési hormon szerű tulajdonságainak köszönhető. A LP N-terminális végéről lehasított 16 aminosav hosszúságú peptid növekedési faktorként viselkedhet, és képes stimulálni az AGC, II-es típusú kollgén és más glikoproteinek szintézisét. Ezáltal az N-terminális peptid szerepet játszhat a matrix komponenseinek homeosztatisz szabályozásában. Egy utóbbi vizsgálatban a SOX9 chondrocyta specifikus transzkripció factor N-terminális peptid által kiváltott fokozott expresszióját találták. Ugyenebben a complex jelátviteli mechanizmusban a link peptid a II-es típusú bone morphogenic protein (BMP) receptorához kötődik. A kísérletünkben tapasztalt dózis függő hatás jól magyarázható azzal, hogy akár alacsonyabb mennyiségben pótolta LP is képes növekedési faktorként működve a porc ECM fiziológiás felépítésének irányába hatni.

A human chondrodysplasiák genetikailag heterogén csoportjából az egér modellünkell legtöbb hasonlóságot a spondyloepiphysealis dysaplasia (SED) csoport mutatja. A csoporton belül a SED congenital nyújtja a legjobb analógiát. Ezen közepesen súlyos chondrodysplasia

jellemzői az ellapult arc, szápadhasadék, jelentősen rövidült tözs és végtegek, megkésett osszifikáció. A gerincen kyphoscoliosis, dorsolumbalis kyphosis, platyspondylia figyelhető meg. Molekuláris szinten ugyanakkor nehezebb hasonlóságokat találni a huán SED csoport és a LP deficiens egerek között. Annak ellenére, hogy a LP szerepére humán osteochondrodysplasiák kialakulásában mindmáig nincs bizonyíték, nem kizárható, hogy létezik olyan osteochondrodysplasia, melynek okozója a LP gén mutációja. Modellünk alapján spondyloepiphyseális megjelenés jósolható, és valószínűleg recesszív öröklésmenet. Az is lehetséges azonban, hogy a LP szerepe túlmutat egy egyszerű strukturális ECM molekulán, és kiesése már az intrauterin élet során súlyos következményekkel járva magzati halálhoz vezet, ami az osteochondrodysplasiás fenotípus klinikai megfigyelését lehetetlenné teszi. A LP porcon kívüli lehetséges szerepének vizsgálatát a következő fejezetben tárgyaljuk.

Eredményeink arra utalnak, hogy a LP legalább két szerepet tölt be a porcszövetben. Az egyik funkciója, hogy biztosítja a porc PG aggregátumainak felépítését és stabilitását AGC-nal és HA-val való kölcsönhatása eredményeként. A stabil aggregátumok jelenléte alapvető fontosságú a növekedési porc funkciójához, de ehhez körülbelül 50%-os LP expresszió elegendő (túlélő C csoport). Ez a LP termelés megegyezik a normál fenotípusú heterozigóta knockout egerekben mért mennyiséggel. Észrevehető különbség azonban, hogy míg a túlélő C csoport egyedek megfigyelhetők nagyon enyhe chondrodysplasiára utaló jelek, a heterozigóta knockout egerekben ez soha nincs jelen. Ez arra utalhat, hogy nem csupán a génexpresszió és fehérje termelés abszolút mértéke, de a fiziológias génkörnyezet és annak lehetséges szabályozó mechanizmusai is szerepet játszhat a porc ECM felépítésében és regulálásában. A LP másik szerepe, hogy az AGC, II-es típusú kollagén és talán más ECM fehérjék termelését stimulálva elősegíti a porc felépítését és fejlődését. Ezen funkció helyreállításához azonban kevesebb LP-re van szükség amint ezt a vad típus  $14\pm 3\%$ -át kitevő fehérjetermelés túlélést biztosító és chondrodysplasiát enyhítő hatása is bizonyítja.

## 4. LINK PROTEIN A PORCON KÍVÜL

### 4.1 Anyag és módszer

#### 4.1.1 Génexpresszió detektálása

A *Crtll* génexpresszió szöveti előfordulásának meghatározásához teljes RNS-t izoláltunk különböző korú egerek szöveteiből és szerveiből. Az RNS-t 10,5 napos egész embriókból, 16,5 napos embriók skeletális szöveteiből, agy-, máj-, és szív mintáiból, 20,5 napos embriók és újszülött egerek skeletális szövet-, agy-, máj-, tüdő-, szív-, vese-, lép-, és intestinális mintáiból vontuk ki. Ugyanezen szöveteket használtuk felnőtt egerekből is testis-, szem-, ovárium-, és uterus mintákat is vizsgálva. A minták reverz transzkripciója során LP specifikus primer párokat használtunk különböző exonokból a LP mRNS azonosítására. A PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélen szeparáltuk és ethidium bromiddal tettük láthatóvá. Reprezentatív PCR termékeket a gélből izoláltuk (Quiaex II gel extraction kit, Qiagen Inc., Valencia, CA), és a szekvenciájukat ABI 310 genetic analyser (Perkin Elmer, Branburg, NJ) segítségével meghatároztuk. Northern dot-blot analízishez teljes RNS-t izoláltunk 20,5 napos embriókból és az mRNS-t Oligotex mRNS csomag (Qiagen Inc) segítségével tisztítottuk. 2 µg oligo-d(T) tisztított mRNS-t 2 µl térfogatban GeneScreen plus membránra (New England Nuclear, Boston, MA) vittük fel, 80 fokon vákumban sütöttük, prehibridizáltuk, majd <sup>32</sup>P-dCTP-jelölt 775 bp hosszúságú LP specifikus PCR termékkel hibridizáltuk.

#### 4.1.2 A génexpresszió mérése

A különböző korú vad típusú szövetminták gén expresszióját real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-QT-PCR) segítségével (Smart Cycler System, Cepheid, Sunnyvale, CA) mértük. Az analízishez szükséges cDNS mintákat 10,5 napos egész embriókból, 16,5 napos embriók skeletális szöveteiből, agy-, máj-, és szív mintáiból, újszülött és felnőtt egerek skeletális szövet-, agy-, máj-, tüdő-, szív-, vese-, lép-, és intestinális mintáiból kivont RNS-t használva állítottuk elő reverz transzkripcióval. A reakciós oldathoz LP génspecifikus primereket használtunk, és a gén expressziót a dupla szálú DNS-hez kötődő CYBR green festék fluoreszcenciáját valós időben (real time) mérve határoztuk meg a korábban leírtak szerint. Minden genotípushoz tartozóan három különböző alomból származó három állat két független mintáját használtuk

#### 4.1.3 Fehérje izolálás, tisztítás és Western blot analízis

A nyers fehérje kivonatok készítése 4 mólos guanidinium klorid oldatban történt homogenizált szövetmintákból, melyhez 40 felnőtt egér különböző szerveit használtuk fel. Mivel LP csak a porcok szövetek nyers kivonatában volt detektálható, a minták további tisztítását végeztük. Ez tisztított patkány chondrosarcoma AGC hozzáadásával, cézium klorid gradiens centrifugálás segítségével történt. Ennek eredményeként végül 2-8 mg liofilizált mintához jutottunk, minden szervből, melyet Tris-acetát pufferben feloldottunk és a korábban leírt módon használtunk fel Western blot analízisre. Immunhisztokémiai vizsgálatokat a korábban leírtak szerint, fagyasztott metszeteken végeztünk.

## 4.2 Eredmények

### 4.2.1 *Link protein génexpresszió szöveti megoszlása és kvantitatív analízise*

A teljes RNS minták 10,5 napos embriókból, 16,5 és 20,5 napos embriók, valamint újszülött és felnőtt egerek különböző szerveiből készültek. RT-PCR analízis *Crtll* transzkriptumok jelenlétét igazolta minden korcsoport minden szervében. A legkorábbi időpontban, melyet úgy választottunk meg, hogy megelőzze a porcshövet embrionális megjelenésének idejét, a LP transzkriptumok jól detektálhatók voltak. A 16,5 napos embriók mérete már lehetővé tette különböző szervek (skeletális szövetek, agy, máj, szív) gyűjtését. Mindezekben jól észlelhető mennyiségben voltak jelen a *Crtll* transzkriptumok. Az egér egyedfejlődésének későbbi időpontjaiban is minden szerv mutatott *Crtll* expressziót. Noha a RT-PCR nem enged meg kvantitatív következtetéseket, a LP génexpresszió a skeletális szövetekben és az agyban mindig jól detektálható volt. A máj szövetminták rendszerint gyenge jelet szolgáltatottak, valószínűleg a minták enzimatisus károsodásának magasabb kockázata miatt. Érdekes, hogy a *Crtll* transzkriptumok nagyon jól detektálhatók voltak a felnőtt reproduktív szervekben és szem mintákban. Az RT-PCR-hoz hasonlóan a Northern blot hibridizációs kísérlet is igazolta a *Crtll* mRNS jelenlétét minden 20,5 napos embrionális szövetben.

A *Crtll* génexpresszió méréséhez a különböző szervekből származó mRNS mintákat reverz transzkripció után RT-QT-PCR segítségével vizsgáltuk. Minden szövetből 9-11 mintát analizáltunk. A génexpresszió időbeli és térbeli változásait a GAPDH expressziójához viszonyítottuk. Viszonylagosan magas mRNS expressziót találtunk a 10,5 napos embrióban, még a porc kialakulása előtt. Legmagasabb expressziót a 16,5 napos embriók porcok skeletális szöveteiben mértünk, ami hétszer volt magasabb mint az újszülött korú, és 89-szer magasabb mint a felnőtt porcshövet génexpressziója. Hasonló expressziós mintázat volt látható a szívben, ahol a *Crtll* expresszió 30%-kal csökkent a embrionális 16,5 nap és az újszülött kor között, és további 33-szoros szignifikáns csökkenést mutatott a felnőtt kor elérésekor. Ezzel ellentétben a *Crtll* mRNS szintje ellenkező irányban változott az agyban. Itt az embrionális 16,5 nap és újszülött kori expresszió egyaránt alacsony maradt, de felnőtt korban ennek ötszörösét mértük, mely meghaladta a felnőttkori porcban mért expressziót is.

Magas volt a LP génexpresszió az újszülött tüdőben is, a porcban mért expresszió kétharmadát (69%) meghaladva. Ez az újszülöttkori légutakban mért magas expresszió aláhúzza a LP jelentőségét a respiratórikus adaptáció során. Felnőtt egerekben is magas maradt a tüdőben mért LP expresszió, a porcban mért érték 35%-át kiteve. Közepes nagyságrendű génexpresszió volt jellemző a belekben és vesékben újszülött korban (18,5%-a és 4,5%-a a porcban mértnek). Ez mindkét esetben magasabb volt, mint felnőtt korban, ami ezen szervek születés utáni fokozott működésével magyarázható. Noha *Crtll* expresszió a 16,5 napos májban jól detektálható volt (0,3%-a a porcban mértnek), az igen alacsony maradt újszülött és felnőtt korban is. Érdekes, hogy a felnőtt lépben viszonylag magas LP expresszió volt jelen (21%-a a porcban mértnek), ami háromszor volt nagyobb mint újszülött korban, és meghaladta a felnőtt vese és intestinum értékeit.

#### 4.2.2 A link protein szöveti megoszlása

The LP fehérje jelenlétét Western blot analízissel igazoltuk különböző szövetekben. A porcok szövetek magas LP tartalma lehetővé tette a fehérje detektálását nyers kivonatból is, de a többi szövetből csak további tisztítás után lehetett kimutatni. Ezek után minden általunk vizsgált felnőtt szervben igazoltuk a fehérje jelenlétét. A LP fehérje további megoszlásának kimutatására fagyasztott metszeteket LP ellenes poliklonális antitestekkel (LPro1-R11) festettük. Legkorábban 13,5 napos embrionális korban dektáltuk a LP-t a csigolyatestek és a baso-occipitális csont porcok előhírnökeiben. Ugyanebben a korban LP immunpozitivitást mutatott a dermis és az aorta metszete. A 19,5 napos embrió veséje szintén LP jelenlétét mutatta.

#### 4.3 Megbeszélés

Noha LP a porcszövet ECM-ában, ahol AGC-hoz és HA-hoz kapcsolódik nagy mennyiségben van jelen, szintén megtalálható porcot nem tartalmazó szövetekben is. Ez az első olyan emlősben végzett rendszerezett vizsgálat, amely a LP génexpressziójának és fehérjetermelésének megoszlását célozza feltérképezni az egér egyedfejlődése során az embrionális kortól a felnőtt korig. Jól mutatja a LP ubikviter jelenlétét, hogy a *Crtll* expresszió igazolható volt a porcképződés előtti embrionális korban, és nagy számú más szövetben. Ezt mások hasonló megfigyelései is megerősítik. A szisztematikus keresés során LP mRNS-t és proteint találtunk az alábbi szövetekben minden vizsgált életkorban: porcszövet, agy, máj, tüdő, szív, vese, lép, belek, szem, testis, ovárium, uterus. A LP génexpresszió mérése különböző időbeli expressziós mintázatokat igazolt, ami a LP jelentőségének növekedésére vagy csökkenésére utalhat egy adott szervben az egyedfejlődés során. Magasabb génexpresszió fontosabb szerepre utalhat egy fejlődési szakaszban, vagy egy szövet vagy szerv funkciójában. Például a *Crtll* fokozódó expressziója az agyban arra utal, hogy a LP jelentősége nagyobb a felnőtt korban, mint a fejlődő központi idegrendszerben. Ismert, hogy a LP jelen van az agy és gerincvelő szürke állományában. Kizárólag neuronok termelik és fontos építőeleme az idegsejteket körülvevő hálózatnak (perineuronal net) ami a neuronokat és dendriteket körülvevő ECM speciális kondenzációjával jön létre. Ezzel szemben a szívben megfigyelt csökkenő *Crtll* expresszió az intrauterin és felnőtt kor között arra utal, hogy a LP jobban érintett a korai szívfejlődésben. Ez összhangban van mások által is leírt *Crtll* expresszióval az egér endocardiumában a szív fejlődése során. Egy másik feltételezett funkciót tölt be a LP az egér folliculogenezise során. Cumulus sejtek, oocyták és granulóza sejtek termelnek LP-t ami a HA-ban gazdag ECM stabilizálásával elősegíti a cumulus-oocyta komplex (COC) expanszióját. A mi vizsgálatunk során LP valóban jól kimutatható volt az egerek reproduktív szerveiből. A *Crtll* jó jelöltnek tűnik mint neurulációt szabályozó gén csirke embriókban. Lehetséges, hogy részt vesz azon celluláris folyamatok szabályozásában, melyek elősegítik az epidermális ektoderma elevációját és konvergenciáját a neuruláció során. Nagy számú egér embrión végzett megfigyeléseink során nem találtunk konzisztens extraskeletális eltéréseket, de néhány LP deficiens embrióban találtunk olyan jeleket, melyek inkomplett neurulációs folyamatra emlékeztető agyfejlődési rendellenességekre utalhatnak.

Ha a LP porcon kívüli lehetséges funkcióit keressük, akkor minden kétséget kizáróan molekuláris partnereket kell találnunk. A porcban betöltött ismert szerepe és HA kötő képessége ismeretében a LP legjobb molekuláris partner jelöltjei a chondroitin-szulfát PG-ok csoportjába tartoznak. Ezek szintén képesek HA-hoz kapcsolódni és LP-nel hármas komplexet alkothatnak (LP-Cspg-HA). A korábban porcspecifikusnak tartott AGC-ről kiderült, hogy jelen van számos más szövetben is. Kimutatták, hogy a molekula jelen van a fejlődő és felnőtt agy ECM-ában ahol főként neuronok termelik. A LP-hez hasonlóan az AGC jelen van a perineuronális hálózatban, melynek kialakulása idején expressziója fokozódik. A molekula HA-hoz kapcsolódik, amit a LP szimultán kötődése és tenascin-R keresztkötések stabilizálnak. Az AGC a perineuronális hálózat egyik fő komponense és majdnem kizárólagos PG-ja. Az AGC csirke embriók szívében vizsgált expressziója azt mutatta, hogy jelenléte azon területeken igazolható ahol a mesenchyma sejtejei a későbbi szívéregek kialakulásában vesznek részt. AGC jelen van más szövetekben is, például inakban, mikrovasculáris pericytáknak és a human sclerában. A másik nagy méretű, HA kötő képességgel rendelkező Cspg a verzikán. Nagy mennyiségben van jelen különböző szövetek ECM-ában, és először human fibroblasztokból izolálták. Verzikán génexpresszió vizsgálata egerekben igazolta annak magas embrionális expresszióját, ami a 13. embrionális nap után csökkenő tendenciát mutat. Felnőtt egér szövetek közül az alábbiakban mutatták ki: agy, tüdő, lép, szív, vázizomzat, bőr, testis és vese. A CNS-ben astrocyták és oligodendrocyták szintetizálják. A nagy méretű, aggregáló Cspg-k csoportjának tagja a neurokán is, mely a főleg a CNS-ben fordul elő. Kísérletes adatok támogatják, hogy a LP-HA-neurokán agregációjának lehetőségét. Ezek a megfigyelések támogatják azt a feltételezést, hogy LP valószínűleg kölcsönhatásban áll ezekkel a PG-okkal különböző szövetekben.

Vizsgálataink kiindulópontjában két porc specifikusnak hitt, HA kötő képességgel rendelkező molekula (LP és AGC) jól ismert kapcsolata állt. Eredményeink jelentősen kiterjesztették ezen ECM molekulákra vonatkozó gondolkodásunkat, mely összhangban van mások irodalmi adataival is. HA kötésre képes PG-ok és a LP számos szövet ECM-ában jelen vannak. Ezek a molekulák kulcsfontosságú szerepet játszhatnak az embrionális szövetek fejlődésében, akár a CNS-ben akár máshol. A porcból ismert LP-AGC kölcsönhatáshoz hasonló molekuláris kapcsolatok egy részét már leírták, de a számos további lehetőség felderítésének igénye új utakat kínál a jövőbeli kutatások számára.



## 5. ÚJ EREDMÉNYEK

### 5.1 A porc link protein hiány okozta chondrodysplasia és perinatális letalitás genetikai helyreállítása

- Meghatároztuk az egér porc LP gén kódoló szekvenciáját és génstruktúráját.
- LP transzgenikus egereket hoztunk létre porc specifikus expressziós vektort alkalmazva.
- A transzgenikus törzseket sikeresen használtuk fel a “rescue” kísérletek során a knockout egerek hiányzó LP termelésének pótlására. A LP hiányának letális hatását helyreállítottuk, a chondrodysplasiás elváltozások javultak, vagy megszűntek.
- A túlélési arányok és a fenotípusos eltérések különböztek az alkalmazott transzgentől függően.
- A túlélő A csoport tagjai törpenövésűek voltak, de a túlélő C csoport chondrodysplasiás eltéréseket alig mutatott.
- A LP expresszió mérése bizonyította, hogy a fenotípus és az osteochondrogenesis változásai a termelt LP mennyiségével álltak arányban. A vad típus LP termelésének 14%-a elégnek bizonyult a túléléshez, 56%-a skeletális rendszer közel fixiológias fejlődéséhez.

### 5.2 Link protein a porcon kívül

- A porcon kívül más szövetekben történt LP után való kutatás bizonyította annak általános jelenlétét az egér fejlődésének minden időpontjában. Ez volt az első szisztematikus vizsgálat emlős állaton.
- A porc LP expressziója jelen volt az embriogenezis során a porcszövet kialakulása előtt.
- A porc LP génexpresszió mérésének eredményei arra utaltak, hogy a LP különböző szervekben, különböző időpontokban valószínűleg különböző jelentőséggel bír.
- A LP expresszió minden életkorban domináns maradt a porcot tartalmazó szervekben.
- A LP expresszió az agyban alacsony maradt az egér fejlődése során, de jelentősen megemelkedett felnőtt korban.

- LP expresszió a szív organogenezise során a legmagasabb, majd születés után jelentősen csökken.
- A LP fehérje jelenlétét az alábbi szervekben igazoltuk: skeletális szövetek, agy, máj, tüdő, szív, vese, lép, intestinum, testis, szem, ovárium, uterus, aorta, bőr.

## 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A legnagyobb elismeréssel mentoromnak, Glant Tibor Professzor Úrnak tartozom, az általa nyújtott irányításért, és folyamatos támogatásért. Az ő segítségével ez a munka nem jöhetett volna létre. Ő és a Rush Egyetem (Chicago, IL, USA) laboratóriumának csapata biztosította számomra azt a professzionális környezetet, mely alapvető volt kutató munkám végzéséhez. Köszönetet mondok Mikecz Katalin Professor asszonynak, Dr Vermes Csabának, Sonja Velinsnek, Jeffrey Ottonak, Reinout Stoopnak, Rajesh V. Kamathnak, Dr Gál Istvánnak, Dr Andrew Nesterovitchnak, Yanal Muradnak, Kevin Kolmannak, Jian Zhangnek a segítségükért. Külön mondok köszönetet barátomnak, Dr Bárdos Tamásnak folyamatos segítségéért, tanácsaiért és támogatásáért, melyek oly értékessé tették a Chicagóban töltött éveket.

Köszönettel tartozom minden régi kollégámnak anyaintézetemből, a Pécsi Tudományegyetem Ortopédiai Klinikájáról. Szeretném kifejezni hálámat Bellyei Árpád Professzor Úrnak, aki progresszíven gondolkodó vezetőm volt karrierem kezdetén, és megadta nekem azt az egyedülálló lehetőséget, hogy tudományos munkámat egy világszínvonalú laboratóriumban végezhessem.

Köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni programvezetőmnek, Than Péter Professzor Úrnak és témavezetőmnek, Dr Vermes Csabának az általuk nyújtott szakmai támogatásért és segítségért. Munkám befejezéséhez mindketten felbecsülhetetlen segítséget nyújtottak.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak, feleségemnek, édesanyámnak és testvéremnek áldozathozatalukat és felétel nélküli támogatásukat.

## 7. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

**Összesített impact faktor: 34.807**

### **Az értekezés témájában írt közlemények (Impact faktor: 15.743)**

1. **Czipri M.**, Than P., Vermes C.:

A link protein szerepe az osteochondrogenézisben: egy állatkísérletes modell és génterápiája.  
Magyar Traumatológia Ortopédia KézsebészetPlasztikai sebészet.  
(közlésre elfogadva, 2015; 58:)

2. Bárdos T., Szabó Z., **Czipri M.**, Vermes C., Tunyogi-Csapó M., Urban RM., Mikecz K., Glant TT.:

A longitudinal study on an autoimmune murine model of ankylosing spondylitis.  
Ann Rheum Dis. 2005; 64:981-7.  
*IF: 6.956*

3. **Czipri M.**, Otto JM., Cs-Szabo G., Kamath RV., Vermes C., Firneisz G., Kolman KJ., Watanabe H., Li FY., Rouhghley PJ., Yamada Y., Olsen BR., Glant TT.:

Genetic rescue of chondrodysplasia and the perinatal lethal effect of cartilage link protein deficiency.  
J. Biol. Chem. 2003; 278: 39214-39223.  
*IF: 6.482*

4. Bárdos T., **Czipri M.**, Vermes C., Zhang J., Mikecz K., Glant TT.:

Continuous nasal administration of antigen is critical to maintain tolerance in adoptively transferred autoimmune arthritis in SCID mice.  
Clin. Exp. Immunol. 2002; 129:224-31.  
*IF: 2.305*

### **Az értekezéshez kapcsolódó publikált absztraktok**

1. Murad Y, **Czipri M.**, Glant TT.:

Accumulation of link protein and G1 domain of aggrecan in transgenic mice leads to destruction of articular cartilage.  
Arthritis Rheum. 2005; 52:S54-S55.

2. **Czipri M.**, Vermes C., Bárdos T., Lovász G., Bellyei Á., Glant TT.:

Egy letális osteochondrodystrophia genetikai helyreállítása.  
Magyar Traumatológia Ortopédia KézsebészetPlasztikai sebészet. 2002; 45:S12.

3. **Czipri M.**, Bárdos T., Vermes C., Gál I., Mikecz K., Watanabe H., Yamada Y., Glant TT.: Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development. Orthop. Trans. 2002; 27:0311.

4. Bárdos T., **Czipri M.**, Vermes C., Lovász G., Finnegan A., Mikecz K., Glant TT.: Progressive spondylarthropathy with ankylosis in murine models of arthritis. Arthritis Rheum. 2001; 44:S240.

5. **Czipri M.**, Bárdos T., Stoop R., Vermes C., Gál I., Hanyecz A., Mikecz K., Watanabe H., Yamada Y., Glant TT.: A Novel Approach to gene therapy: Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development. Arthritis Rheum. 2001; 44:S149.

### **Az értekezéshez kapcsolódó előadások**

1. Szász K., Morava É., Halmai V., **Czipri M.**, Illés T.  
A frontometaphyseális dysplasia genetikai háttere és gerincsebészeti klinikai vonatkozásai  
Magyar Ortopéd Társaság 49. Kongresszusa, 2006, Budapest, Hungary

2. Szász K. Cibula A, Raskó J., Halmai V., **Czipri M.**, Illés T.  
Investigation of genetic factors in multiple developmental disorder-related scoliosis and in adolescent idiopathic scoliosis  
49<sup>th</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2006, Budapest, Hungary

3. **Czipri M.**, Lovász Gy, Bellyei Á, Glant TT.  
The roles of link protein in the cartilage extracellular matrix and in osteogenesis  
Forum of Young Hungarian Orthopaedic Surgeons, 2004, Kaposvar, Hungary  
(Best Paper Award winner)

4. **Czipri M.**  
Link proteins: In and out of cartilage  
Invited presentation at the Dept. of Biochemistry at Rush Presbyterian St`Lukes Medical Centre 2003, Chicago, USA

5. **Czipri M.**, Vermes C, Bárdos T, Lovász G, Bellyei Á, Glant T.  
Genetic repair of a lethal osteochondrodystrophy.  
45<sup>th</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2002, Pecs, Hungary

6. **Czipri M.**, Bárdos T, Vermes C, Gál I, Mikecz K, Watanabe H, Yamada Y, Glant TT.  
Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development. (poster)  
Midwest Connective Tissue Workshop 2002, Chicago, USA

7. **Czipri M**, Bárdos T, Vermes C, Gál I, Mikecz K, Watanabe H, Yamada Y, Glant TT. Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development. (poster) Rush University Forum for Research and Clinical Investigation 2002, Chicago, USA
8. **Czipri M**, Bárdos T, Vermes C, Gál I, Mikecz K, Watanabe H, Yamada Y, Glant TT. Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development. (poster) 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 2002, Dallas, USA
9. **Czipri M**, Bárdos T, Vermes C, Gál I, Mikecz K, Watanabe H, Yamada Y, Glant TT. Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development. (poster) 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2002, Dallas, USA (Awarded with New Investigator Recognition Award)
10. **Czipri M**, Glant TT. The “missing link” protein  
Midwest Connective Tissue Workshop 2001, Chicago, USA
11. Bárdos T, **Czipri M**, Zhang J, Gál I, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. Nasal tolerance to proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice can adoptively transferred and the tolerance reconstituted in SCID mice. (poster) American College of Rheumatology 65<sup>th</sup> Scientific Meeting, 2001, San Francisco, USA
12. Bárdos T, **Czipri M**, Vermes C, Lovász G, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. Progressive spondylarthropathy with ankylosis in murine models of arthritis. American College of Rheumatology 65<sup>th</sup> Scientific Meeting, 2001, San Francisco, USA
13. **Czipri M**, Bárdos T, Stoop R, Vermes C, Gál I, Hanyecz A, Mikecz K, Watanabe H, Yamada Y, Glant TT. A Novel Approach to gene therapy: Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development. American College of Rheumatology 65<sup>th</sup> Scientific Meeting, 2001, San Francisco, USA
14. **Czipri M**, Halmai V, Kránicz J. Differential diagnostic aspects of the bilateral Perthes disease  
Forum of Young Hungarian Orthopaedic Surgeons, 1999, Bekescsaba, Hungary

**Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények (Impakt faktor: 19.064)**

1. Kuzsner J, Tunyogi Csapo M, **Czipri M**, Than P, Vermes C.: Early diagnostics of aseptic loosening of hip implants with the help of biomarkers. Hungarian Journal of Orthopedic and Trauma Surgery. 2012; 55:197-202.

2. Vermes Cs., **Czipri M.**, Horváth G., Dömös P., Gázsó I.:  
Investigation of human intervertebral discs with calorimetry.  
Hungarian Journal of Orthopedic and Trauma Surgery. 2005; 48:330-339.
3. Szabó I., **Czipri M.**, Halmai V., Potó L., Costenoble V., Docquier J.:  
Middle term outcomes of the Scarf osteotomy in the treatment of hallux valgus deformity.  
Hungarian Journal of Orthopedic and Trauma Surgery. 2005; 48:33-42.
4. Kontrohr T., **Czipri M.**, Than P., Kránicz J.:  
Results of operative treatment of the condition after Schlatter-Osgood disease.  
Hungarian Journal of Orthopedic and Trauma Surgery. 2004; 47:13-17.
5. Bárdos T., **Czipri M.**, Vermes C., Finnegan A., Mikecz K., Zhang J.:  
CD4+CD25+ immunoregulatory T cells may not be involved in controlling autoimmune arthritis.  
Arthritis Research and Therapy. 2003; 5:106-13.  
*IF: 5.036*
6. Kaplan CD., O'Neill SK., Koreny T., **Czipri M.**, Finnegan A.:  
Development of inflammation in proteoglycan-induced arthritis is dependent on Fc gamma R regulation of the cytokine/chemokine environment.  
J. Immunol. 2002; 169:5851-9.  
*IF: 7.014*
7. Finnegan A., Grusby MJ., Kaplan CD., O'Neill SK., Eibel H., Koreny T., **Czipri M.**, Mikecz K., Zhang J.:  
IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms.  
J. Immunol. 2002; 169:3345-52.  
*IF: 7.014*
8. Hübler J., Sükösd F., **Czipri M.**:  
Tibia metastasis without prostate specific antigen (PSA) increase following radical vesiculo-prostatectomy.  
Int. Urol. Nephrol. 2000; 32:281-4.
9. Kránicz J., **Czipri M.**:  
Early experiences with Calcaneo-stop method in the operative treatment of the flatfoot in children.  
Hungarian Journal of Orthopedic and Trauma Surgery. 2000; 43:177-182.
10. Domán I., **Czipri M.**:  
Report on the First Instructional Course of the European Foot and Ankle Society  
Hungarian Journal of Orthopedic and Trauma Surgery. 1999; 42:362-3.

## **Az értekezéshez nem kapcsolódó publikált absztraktok**

1. Halmai V., Schmidt E., Domán I., **Czipri M.**, Illés T.:  
Bone mineral density measurement in idiopathic scoliosis. Report of 120 cases.  
Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca. 2004; Supplement 1, 27.
2. **Czipri M.**, Szabó I., Halmai V., Costenoble V., Docquier J.:  
The scarf osteotomy for the correction of hallux valgus deformity: a review of 62 cases.  
Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca. 2004; Supplement 1, 32.
3. Vermes C., Bárdos T., **Czipri M.**, Koreny T., Lovász G., Bellyei Á., Glant TT.:  
Periprosthetic osteolysis: multiple cell response for wear debris particles.  
Hungarian Journal of Orthopedic and Trauma Surgery 2002, 45:S73.
4. Bárdos T., **Czipri M.**, Vermes C., Lovász G., Bellyei Á., Glant T.:  
Arthritis psoriatica in humanised mice offers a new insight to the immunological background of the disease.  
Hungarian Journal of Orthopedic and Trauma Surgery. 2002; 45:S6.
5. Vermes C., Bárdos T., **Czipri M.**, Hanyecz A., Lovász G., Bellyei Á., Fritz E., Roebuck K., Jacobs J., Galante J., Andersson GBJ., Glant TT.:  
Differential effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor- $\alpha$  on the functions of human osteoblast cells.  
Orthop. Trans. 2002; 27:0537.
6. Bárdos T., **Czipri M.**, Vermes C., Mikecz K., Glant TT.:  
Suppression of autoimmunity in experimental arthritis by nasal tolerance.  
Orthop. Trans. 2002; 27:0692.
7. Bálint L., Kránicz J., **Czipri M.**:  
Long-term results of more than 700 operatively treated clubfeet.  
J. Bone Joint Surg [Br] 2002; 84-B:Supplement 2:117.
8. Bárdos T., **Czipri M.**, Zhang J., Gál I., Finnegan A., Mikecz K., Glant TT.:  
Nasal tolerance to proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice can adoptively transferred and the tolerance reconstituted in SCID mice.  
Arthritis Rheum. 2001; 44:S87.
9. de Jonge T., **Czipri M.**, Lovász G.:  
Unicompartmental knee arthroplasty: 5-11 years follow-up.  
J. Bone Joint Surg [Br] 1999; 81-B:Supplement 2:O431.



10. **Czipri M.**, Bellyei Á.:  
One-stage operation of CDH in children aged between 1-5 years.  
J Bone Joint Surg [Br] 1999; 81-B:Supplement 2:O461.

### **Az értekezéshez nem kapcsolódó előadások**

1. **Czipri M.**

Complex treatment of the diabetic foot.  
Annual Meeting of the Hungarian Society for Podiatry and Foot Surgery  
2014, Kecskemet, Hungary

2. **Czipri M.**

Orthopaedic problems in diabetic foot  
Integrated Diabetic Foot Care Seminar  
2013, Exeter, UK

3. **Czipri M.**

Surgical treatment for 2<sup>nd</sup> metatarsophalangeal joint instability with plantar plate reconstruction: early results  
Annual Meeting of the Hungarian Society for Podiatry and Foot Surgery  
2013, Siofok, Hungary

4. **Czipri M.**, Sharpe IT.

Reconstructive surgery on neuropathic feet  
Annual Meeting of the Hungarian Society for Podiatry and Foot Surgery  
2013, Siofok, Hungary

5. **Czipri M.**, Guyver P., Taylor J., Knox R., Talbot NJ., Sharpe IT.

Tibiototalcaneal arthrodesis with a retrograde nail: results of 55 cases  
Annual Meeting of the Hungarian Society for Podiatry and Foot Surgery  
2013, Siofok, Hungary

6. **Czipri M.**

Diabetic foot disorders  
3M National Symposium  
2013, Staverton Park, Daventry, UK

7. **Czipri M.**, Sharpe IT., Talbot NJ.

Hallux metatarsophalangeal joint hemiprosthesis: short term results  
Annual Meeting of the Hungarian Society for Podiatry and Foot Surgery  
2012, Cegléd, Hungary

8. **Czipri M.**, Sharpe IT., Talbot NJ.  
Experiences of surgical treatment of the rheumatoid forefoot deformities  
Annual Meeting of the Hungarian Society for Podiatry and Foot Surgery  
2012, Cegled, Hungary
9. **Czipri M.**, Talbot NJ., Sharpe IT.  
Experiences of arthroscopic ankle arthrodesis  
Annual Meeting of the Hungarian Society for Podiatry and Foot Surgery  
2010, Budapest, Hungary
10. **Czipri M.**, Sharpe IT., Talbot NJ.  
Surgical treatment of rheumatoid forefoot deformities  
52<sup>nd</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2009, Szolnok, Hungary
11. **Czipri M.**, Sharpe IT., Talbot NJ.  
Radiological analysis of the bony healing in 1<sup>st</sup> metatarsophalangeal joint arthrodesis  
52<sup>nd</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2009, Szolnok, Hungary
12. **Czipri M.**, Herron M.  
Experiences of arthroscopic ankle arthrodesis  
51<sup>st</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2008, Szekesfehervar, Hungary
13. **Czipri M.**  
Hemophilic arthropathy: staging and treatment options.  
Hemophilia Symposium, 2006, Pécs, Hungary
14. Halmai V., **Czipri M.**, Szász K., Illés T.  
The role of the EDF plaster corsette in the conservative treatment of spinal deformities  
49<sup>th</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2006, Budapest, Hungary
15. Halmai V., **Czipri M.**, Szász K., Illés T.  
Comparative analysis of classification systems for scoliosis  
49<sup>th</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2006, Budapest, Hungary
16. **Czipri M.**, Halmai V., Szász K., Illés T.  
Results of spinal instrumentation of idiopathic scoliosis  
4<sup>th</sup> Congress of the Hungarian Society of Pediatric Spinal Disorders, 2006, Budapest, Hungary
17. **Czipri M.**, Halmai V., Szász K., Illés T.  
Results of surgical treatment of idiopathic scoliosis  
49<sup>th</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2006, Budapest, Hungary
18. **Czipri M.**, Dömös P., Kiss I.P., Than P., Kránicz J.  
Long term results of high tibial osteotomy in varus gonarthrosis

48<sup>th</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2005, Galyateto, Hungary

19. **Czipri M.**, Bárdos T., Bálint L., Than P., Kustos T.

Primary Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using Patellar Bone Tendon Bone Autograft or Allograft: a Comparative Study

International Knee Surgery Symposium, 2004, Pécs, Hungary

20. **Czipri M.**, Szabó I., Halmai V., Costenoble V., Docquier J.

Middle Term Outcomes of the Scarf Osteotomy in the Correction of Hallux Valgus Deformity

Forum of Young Hungarian Orthopaedic Surgeons, 2004, Kaposvar, Hungary

21. Halmai V., Schmidt E., Domán I., **Czipri M.**, Illés T.

Bone mineral density measurement in idiopathic scoliosis. Report of 120 cases.

5<sup>th</sup> Central European Orthopaedic Congress, 2004, Prague, Czech Republic

22. **Czipri M.**, Szabó I., Halmai V., Costenoble V., Docquier J.

The scarf osteotomy for the correction of hallux valgus deformity: a review of 62 cases

5th Central European Orthopaedic Congress, 2004, Prague, Czech Republic

23. Vermes C, Bárdos T, **Czipri M.**, Koreny T, Lovász G, Bellyei Á, Glant T.

Periprosthetic osteolysis: multiple cell response for wear debris particles

45<sup>th</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2002, Pecs, Hungary

24. Bardos T., **Czipri M.**, Vermes C., Lovasz G., Bellyei A., Glant TT.

Arthritis psoriatica in humanized mice offers a new insight to the immunological background of the disease.

45<sup>th</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2002, Pecs, Hungary

25. Vermes C, Bárdos T, **Czipri M.**, Hanyecz A, Lovász G, Bellyei Á, Fritz E, Roebuck K, Jacobs J, Galante J, Andersson GBJ, Glant TT.

Differential effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor- $\alpha$  on the functions of human osteoblast cells. (poster)

48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2002, Dallas, USA

26. Bárdos T, **Czipri M.**, Vermes C, Mikecz K, Glant TT.

Suppression of autoimmunity in experimental arthritis by nasal tolerance.

48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2002, Dallas, USA

27. **Czipri M.**, de Jonge T, Lovász Gy, Kránicz J, Bellyei Á.

Long term results of unicompartmental knee arthroplasty

43<sup>rd</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 2000, Debrecen, Hungary

28. Bálint L, Kránicz J, **Czipri M.**

Long term results of 700 operatively treated clubfeet.

8<sup>th</sup> Instructional Course Lectures of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology 2000, Prague, Czech Republic

29. **Czipri M**, Kráncz J, Bárdos T.

Experiences with more than 900 operatively treated clubfeet.

3<sup>rd</sup> Central European Orthopaedic Congress 2000, Prtoroz, Slovenia

30. **Czipri M**, Kráncz J.

Introduction of the Calcaneo-stop surgery

2<sup>nd</sup> Annual Meeting of Hungarian Foot and Ankle Society, 1999, Lakitelek, Hungary

31. de Jonge T, **Czipri M**, Lovász G.

Unicompartmental knee arthroplasty: 5-11 years follow-up.

4<sup>th</sup> Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology 1999, Brussels, Belgium

32. **Czipri M**, Bellyei Á.

One-stage operation of DDH in children aged between 1-5 years.

4<sup>th</sup> Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology 1999, Brussels, Belgium

33. Bellyei Á, **Czipri M**.

Long-term results of one-stage operation of DDH.

SICOT 21<sup>st</sup> World Conference 1999, Sidney, Australia

34. Bárdos T, Kráncz J, **Czipri M**.

Experience with 900 operatively treated clubfeet

42<sup>nd</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 1999, Kaposvar, Hungary

35. **Czipri M**, Kráncz J, Bárdos T.

Results of the treatment of the valgus foot deformities in children

42<sup>nd</sup> Congress of Hungarian Orthopaedic Association, 1999, Kaposvar, Hungary

35. **Czipri M**, Kráncz J.

Introduction of the Calcaneo-stop surgery

Forum of Young Hungarian Orthopaedic Surgeons, 1998, Tata, Hungary

(Best Paper Award winning paper)

37. Bellyei Á, **Czipri M**.

One-stage operation of CDH between 1-5 years

2<sup>nd</sup> Central European Orthopaedic Congress 1998, Budapest, Hungary