

## SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS – OTKA PD 100927

Témavezető neve: Dr. Nagy András Dávid

A téma címe: **A cirkadián biológiai órák beállításában szerepet játszó szignalizáció és neuroendokrin szabályozás vizsgálata**

A kutatás időtartama: 2012-2014

A posztdoktori kutatás célja a cirkadián rendszert szinkronizáló mechanizmusok vizsgálata volt. A munkaterv a PhD munkám folytatásaként a csirke tobozmirigy modellt vette alapul. A posztdoktori kutatás első szakaszában felmerült, hogy a modell alkalmazása érzékenyen érintheti a cirkadián rendszerről gyűjtött eredményeink széleskörűbb elfogadtathatóságát (a modellel nemzetközi szinten aktívan foglalkozók száma az időszakban tovább csökkent néhány kis munkacsoportra), es felhasználhatóságát (a mintegy 2000 főnyi kronobiológus kutatótábor preklinikai kutatásokhoz elsősorban emlős állatmodelleket vesz figyelembe). Célszerűnek tűnt más, szélesebb körben elfogadott cirkadián modellek tanulmányozása is, az eredeti munkaterv teljeskörű kivitelezése helyett, hogy a kutatásunk célkitűzéseit nemzetközi szinten is jelentősebb eredményekkel valósíthassuk meg. Eredményeinket az eredeti céljainknak megfelelően használt különféle modellek szerint csoportosítva összegzem az alábbiakban:

### I. Csirke tobozmirigy

a. Mivel az új többcsatornás szuperfúziós rendszerünkben a korábbi 2 csatornás rendszerhez képest (Csernus & Mess, 1993) az eredetileg tervezettek szerint nyert csirke szövetekből (2 hetes csirkék tobozmirigyé) nem sikerült több napig tartó ritmikus hormontermelést megbízhatóan mérni, így új modellt kerestünk. A 19 napos csirketojásokból nyert tobozmirigyek megfelelő szinkronitást mutattak *in vitro* rendszerünkben több cikluson keresztül is (melatonin RIA). Továbbá a 19 napos csirke embriókból nyert *in vivo* eredményeink a melatoninszintézis kulcsenzimeit (AANAT, HIOMT) kódoló gének es az óragének (*per2*, *cry1*, *clock*, *bmal1*) 24 órás mRNS-expressziós ritmusa tekintetében is megfeleltek a kikelt csirkék használatával nyert irodalmi adatoknak mind kontroll LD (12h fény 12h sötét) ciklusokban, mind DD (állandó sötét) környezetben. Az új csirke embrionális tobozmirigy modell *in vivo* validálását a *General and Comparative Endocrinology* folyóiratban közöltük (utolsószerzős cikk). A közlemény első szerzője (Siri Kommedal) vezetésemmel e munkából PhD fokozatot szerzett az időszak alatt.

b. *In vitro* kísérleteinkben az új többcsatornás szuperfúziós rendszerünkben a 19 napos csirketojásokból nyert tobozmirigyek melatoninritmusát meglepő módon csak LD ciklusokban tudtuk mérni, annak ellenére, hogy a génexpressziós ritmusok DD környezetben is megfigyelhetők voltak. Szövetteni vizsgálatot végeztünk a szuperfúziós rendszerbe helyezett szövetminták életképességét tekintve (TUNEL, bax IHK, caspase IHK), melyből kiderült, a szövetdarabok az új többcsatornás szuperfúziós rendszerünkben LD környezetben is sajnos csak maximum 3 ciklusig vizsgálhatók megbízhatóan. A modell legfontosabb kimenete a melatoninintermelés, és ennek ritmikus mintázata jelzi a szövetek életképességét a kísérlet végéig (amplitudo közel azonos a harmadik ciklusban is LD környezetben), ezért a melatoninritmus mérésétől nem tanácsos eltekinteni megbízhatósági okokból, a génexpressziós és IHK vizsgálatok mellett sem. Ha azonban DD környezetben eltűnik a

melatoninritmus, a modell „erejét” veszti, annak ellenére, hogy az *aanat* gén ritmusa nem tűnik el. Modellünk alkalmazhatóságát tekintve arra következtettünk, hogy ebben a rendszerben az akut transzkripciós változások vizsgálata elsősorban LD környezetben optimális, de nem alkalmas a fázisváltozások hosszútávú (>3-5 ciklus), precíz nyomonkövetésére. További kísérleteinket leegyszerűsítettük, a fényimpulzusos és a ligand kezeléseket LD körülmények között végezve kutatásunk elsősorban a re-szinkronizáció akut génexpressziós változásainak vizsgálatára korlátozódott. Olyan gének vizsgálatát vettük előtérbe, melyek ismert jelátviteli útvonalak célgénjei, összefüggésbe hozhatók a váltott műszakban dolgozóknál magasabb kockázatban előforduló népbetegségek pathomechanizmusával. Az elért eredményeket közlésre előkészítettük, várhatóan 1-2 hónapon belül beküldjük a *Journal of Pineal Research* folyóirat szerkesztőségébe bírálatra. Az eredmények közül az alábbiakban ismertetem génenkénti felsorolásban azokat, melyek a kutatás céljait tekintve igéretesnek tekinthetők:

**c.** *N-myc downstream regulated gene 1 (ndrg1)*. Az NDRG1 fehérje olyan tumorszuppresszor, melyet transzkripciós szinten onkoproteinek (n-myc, c-myc) gátolnak. A cirkadián időzítés krónikus zavarának állatkísérletes modelljében írták le, hogy az *ndrg1* expressziója 10 napos krónikus jet lag után gátlódik (Wu et al. *Oncol Rep.* 2012; 27:1417-28). Ha ezen egerekre Lewis Lung Carcinoma sejteket injektáltak, egyidejűleg a tumornövekedés és metasztázisképzés üteme is felgyorsult. Ez arra utal, hogy az *ndrg1* gén egy olyan különleges tumorszuppresszor gén, mely transzkripciós szabályozása különösen érzékeny lehet olyan ingerekre, melyek a cirkadián órát átállítják. A csirke tobozmirigy óramodellen végzett *in vivo* és *in vitro* kísérleteink elsőként igazolták, hogy a nappali megvilágítás akut megvonása (LD-ből DD-be), vagy az éjszaka alkalmazott fényimpulzusok egyaránt jelentős akut *ndrg1*-expresszióváltozást okoztak (fény hiányában ~10x indukció, fény hatására 0.1-0.3x csökkenés) a váratlan környezeti változást követő két órán belül. A kontroll csoportban (LD) nem tapasztaltunk napi ritmust az *ndrg1* expressziójában, mely szintén arra utal, hogy a génszabályozás elsősorban a váratlan környezeti változások esetén aktiválódik (akut DD), ill. deregulálódik (éjszakai fényimpulzus). Mindezek arra utalnak, hogy az *ndrg1* tumorszuppresszor gén transzkripcióját szabályozó szignalizáció (pl. n-myc) az óra beállításában kulcsfontosságú ingerekkel jelentősen befolyásolható. Munkánk a váltott műszakban dolgozóknál tapasztalt magasabb tumorkockázat hátterének feltérképezéséhez szolgáltat állatkísérletes referenciát. Ezen eredményekből konferenciárészvétel és államvizsgadolgozat (Luzia Gruber) készült.

**d.** *Dual specificity phosphatase 1 (dusp1)*. A DUSP1 fehérje a MAPK jelátviteli kulcsfontosságú gátlója, és egyben a p53 tumorszuppresszor transzkripciós célpontja. A csirke tobozmirigy óramodellen végzett *in vivo* és *in vitro* kísérleteinkben a kontrollcsoportban (LD) is nagyamplitúdójú változásokat tapasztaltunk a *dusp1* mRNS mennyiség napi mintázatában. A nappali megvilágítás akut megvonása (LD-ből DD-be), vagy az éjszaka alkalmazott fényimpulzusok egyaránt jelentős akut *dusp1*-expresszióváltozást okoztak. Az *ndrg1*-es eredményekhez hasonlóan fény hiányában indukció, fény hatására csökkenés volt tapasztalható a váratlan környezeti változást követő két órán belül. Ezen eredményekből konferenciárészvétel és államvizsgadolgozat (Karina Ovrebó) készült.

**e.** *Vasoactive intestinal peptide (vip)*. Igazoltuk, hogy a modellünkben az emlős SCN-hez hasonlóan a VIP parakrin szignálként szerepelhet, mert napi ritmusú mRNS-expressziós mintázatát különböző fényviszonyok mellett is sikerült kimutatnunk. Továbbá kimutattuk, hogy az *in vitro* PACAP1-38 kezelés (VIP receptor agonista) számos, cirkadián ritmusban szabályozott gén napi expressziós mintázatát megváltoztatja (*ndrg1*, *dusp1*, *dio2*, *vip*, *rorb*,

*purpurin, cystatin*), így szerepe lehet a fázisszabályozásban a csirke modellen is. Ezen eredményekből konferenciárészvétel és államvizsgadolgozat (Luqman Chaudhary) készült, valamint 1 cikk közlése továbbra is folyamatban van (re-submission).

f. Végül, kollaborációs lehetőségünk nyílt egy japán kutatócsoporttal (Prof. Takashi Yoshimura, Nagoya), akik sikeresen állítottak elő csirke óraprotein-elleni antiszérumot (J Comp Neurol. 2009. 517(3):397-404), melyet rendeletezésünkre bocsátottak. Munkánkkal első alkalommal sikerült a BMAL1 óraprotein szöveti és celluláris elhelyezkedését leírni csirke embrionális tobozmirigyben. *In vivo* és *in vitro* mintavétel is történt a BMAL1 i.r. 24 órás mintázatának meghatározására. A mikrofotók kvantitatív kiértékelése még folyamatban van. Ezen eredményekből konferenciárészvétel és államvizsgadolgozat készül (Sabrina Arnold).

## **II. Laboratóriumi egér (C57BL/6J)**

Jolismert, hogy az emlos suprachiasmaticus mag oramodellben fontos szinkronozalo endokrin faktor a melatonin (negativ feedback). Shinobu Yasuo japan kollegammal 2012-ben kezdtunk kutatasi egyuttmukodesbe annak tisztazasara, hogy a cirkadian ora beallitasa melatonin kezelesek alkalmazasaval elosegitheti-e a szezonalis depresszio tuneteinek kezeleset. Nemzetkozi osztondij elnyeresevel (Matsumae International Foundation Research Fellowship) lehetosegem nyilt arra, hogy dr Yasuo laboratoriumaban magam vegezzem el a kozosen tervezett allatkiserletes munkat. Munkankkal igazoltuk, hogy 8h feny 16h sotet ciklusokban (teli fotoperiodus) tartott egerekben a ket hetig naponta, 2 oraval a fenyperiodus vege előtt alkalmazott i.p. melatonin-kezeles megvaltoztatta a suprachiasmaticus mag oragen-expresszios mintazatait, a dorsalis raphe magban a serotonin-elerhetoseget szabalyozo genek expresszios mintazatait, es az amygdala serotoninartalmanak 24 oras mintazatat. Mindemellett a Porsolt-fele usztatasi tesztben csokkent az egerek immobilitással toltott ideje, mely a depresszio-szeru viselkedes merseklodeset jelzi ebben az allatkiserletes modellben. Mivel a raphe magokban melatonin receptorok nem expresszálódnak, a melatonin szerotonerg rendszerre es depresszioszeru magatartásra kifejtett hatásai akár a suprachiasmaticus mag cirkadian orájának szinkronizálásával is magyarázhatók. Eredményeink várhatóan jelentős hatással lesznek a cirkadian ritmus és a szezonális depresszió kapcsolatának kutatására. Korábban ugyanis azt gondolták, hogy a szezonális depresszió modellezéséhez laboratóriumi ragcsaloknál szükséges a reprodukció szezonálisának megléte, ami a melatonin-rendszer defektusa (az *aanat* gen mutációja) miatt C57BL/6J egereknél teljesen hiányzik. Mivel a preklinikai kutatásokban széleskörűen használt transzgen (pl. oragen-modosított) egerek többnyire C57BL fajtájúak, munkánk elsőként szolgál bizonyítékul a modell széleskörű alkalmazhatóságára a szezonális depresszió allatkísérletes tanulmányozására. Eredményeink elsősorban közleményben jelentek meg, a tudományterület egyik rangos folyóiratában (Chronobiology International, 5 évre átlagolt IF: 4.164).

## **III. Emberi bőr biopsziák**

Epidemiológiai adatok szerint a cirkadián időzítés zavara esetén (váltott műszakban dolgozók) gyakoribb a bőr rosszindulatú daganatainak és a psoriasis előfordulása, ill. számos bőrgyógyászati megbetegedés esetén a tünetek súlyossága szezonális ritmussal mutat (pl.: atópiás dermatitis). Bár a cirkadián óra szabályozó szerepe a szezonális ritmusok hátterében is jól ismert, túl kevés alapismerettel rendelkezünk arról, hogy a bőr élettani vagy kóros folyamatai

egyáltalán befolyásolhatók-e a cirkadián rendszer szinkronizálásával. Dr Lengyel Zsuzsanna onko-dermatológus szakorvossal a PTE ÁOK PhD program keretében figyeltük meg elsőként emberi bőrdaganatokban az óragén-expresszió változását. Morfológiai vizsgálatunkkal elsokent tisztáztuk, hogy a malignus daganat-biopsziákban korábban is széleskörűen (pl. emlo-, colon-, prostatarak) megfigyelt oragen-expressziós változások nem korlátozódnak a daganatos sejtekre (pl. melanoma sejtek), hanem a daganat melletti, epnek tuno sejteket (pl. keratinocytak) is érintik. Mindez arra utal, hogy a megváltozott oragen-működés elsősorban a malignitással járó (megelőző, vagy következtében fellepo) megváltozott mikrokörnyezet (pl. metabolikus-, immunológiai-, neuroendokrin faktorok) általános szöveti hatása, és nem kizárólag a malignus transzformáció sejten belüli sajátosága. Megfigyelésünk a cirkadian óra és a daganatkepződés kapcsolatának kutatásában teljesen újszerű, ugyanis korábban a molekuláris oraműködés vizsgálata e tekintetben csaknem kizárólag a daganatsejtekre irányult. Eredeti megfigyeléseink a Tumor Biology folyóiratban jelentek meg. A témával kapcsolatos korábbi elméletek korlátait és az új adatok alapján valószínűsíthetően ígértes kutatási irányokat összefoglaló elemzésünket egy review-cikkben közzeltük (mindket közlemény utolsószerzős). A közlemények első szerzője (Lengyel Zsuzsanna) vezetésével e munkából PhD fokozatot szerzett az időszak alatt.

#### **IV. Proliferáló fibroblaszt**

A kronobiológia kutatásának legújabb mérföldköve annak felfedezése volt, hogy a cirkadián ritmus transzkripciós szabályozás hiányában is megfigyelhető eukarióta sejtekben is (Reddy et al, Nature 2011, Edgar et al. Nature 2012). A posztdoktori kutatás idején lehetőségem adódott a felfedező munkacsoport személyes megismerésére, Cambridge-i laborlátogatásra a PTE ÁOK tanulmányi út pályázat keretében, ill. az OTKA támogatás terhére kollaborációs megbeszéléseket szerveztünk. Ennek eredményeként sikerrel pályáztam az Európai Unió Marie Curie posztdoktori karrierfejlesztési programjára (projektazonosító: PEROXIREDOXIN-CLOCK), melynek segítségével a következő 2 évben a Cambridge-i Egyetemen Dr. Akhilesh Reddy laboratóriumában végezhetem modern molekulárisbiológiai eszközökkel a cirkadián óra beállításának sejtszintű vizsgálatát proliferáló fibroblasztokon. Kutatási eredményeink remélhetőleg a munkacsoport megszokott standardjának megfelelően magas impaktú folyóiratban jelennek meg (Nature, EMBO Journal, Current Biology), melyben fel fogjuk tüntetni az OTKA támogatását is, mivel a témába vágó kutatási együttműködés kialakítása a PD keret támogatásával valósulhatott meg.

A posztdoktori kutatás eredményeként megjelent közleményeket teljes terjedelemben elérhetővé tettem a ResearchGate-en:

([https://www.researchgate.net/profile/Andras\\_Nagy2/publications](https://www.researchgate.net/profile/Andras_Nagy2/publications)).

Cambridge, 2015.01.30.

Dr. Nagy András Dávid  
témavezető