

Óragén expresszió vizsgálata bőrgyógyászati biopsziás mintákon

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Lengyel Zsuzsanna

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Anatómiai Intézet és Bőrgyógyászati Klinika

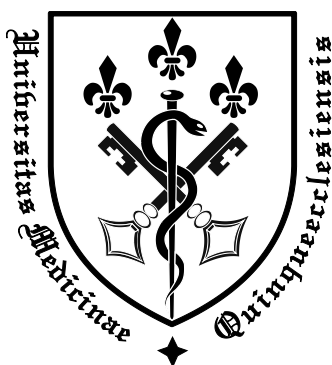
Témavezetők: Dr. Csernus Valér és Dr. Battyáni Zita

Neuroendokrinológia és Neurohisztológia Doktori Program

Programvezető: Dr. Csernus Valér

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Lénárd László



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

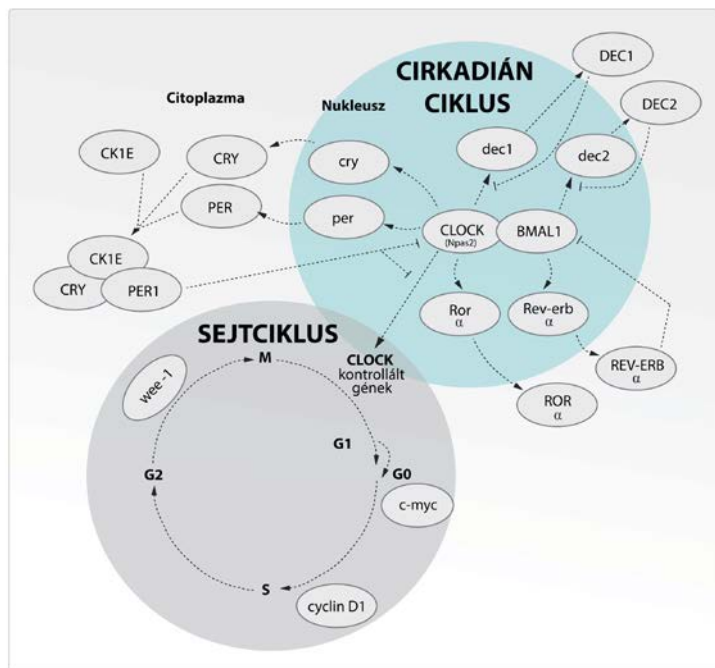
Pécs

2013.

1. BEVEZETÉS

1.1. A napszakos ritmus és az óragének

A biológiai ritmus az élő szervezetekben egy nagyjából azonos periódusidővel ismétlődő biológiai folyamat. A napszakos (cirkadián) ritmus egy közel 24 órás periódusidejű biológiai ritmus, mely a Föld tengely körüli forgása által kiváltott nappal-éjszaka ciklushoz igazodik. A napszakos ritmikus jelenségek az élővilágban széles körben előfordulnak: jelen vannak a prokaryotákban, egysejtű eukaryotákban, növényekben, gombákban, állatokban és az emberben. Az emlősök cirkadián rendszere olyan napi ritmikus folyamatokat hoz létre, melyek alapvetőek a magatartás és az élettani folyamatok létrejöttében, úgy mint, az alvás-ébrenléti ciklus, a hormon termelés, a maghőmérséklet, egyes immunológiai folyamatok, az anyagcsere és sejtciklus szabályozás. Ezen, a fajnak megfelelő időtartamú napszakos ritmusok fázisát bizonyos, arra alkalmas környezeti ingerek (német *Zeitgeber*: időt meghatározó) képesek megváltoztatni. A legjelentősebb *Zeitgeber* a fény-, a hőmérséklet-, a táplálék-, a fizikai aktivitási, az alvás-ébrenléti és a szociális ingerek. Emellett endokrin-metabolikus *Zeitgeber*-ként funkcionál többek között a melatonin, inzulin, glükokortikoidok és a katekolaminok is. Emlősökben a cirkadián rendszert egy központi és számos perifériás óra, valamint működését befolyásoló negatív-, és pozitív visszacsatolási hurkok (feedback) alkotják. A központi óra a hypothalamus mediális zónájának elülső magjai közé tartozó nucleus suprachiasmaticusban (SCN) található. A központilag generált ritmus koordinálja a periférián elhelyezkedő szervek óráit. Az elmúlt 20 évben azonosítottak számos olyan óragént, valamint általuk kontrollált transzkripciós faktorokat (óraproteineket), amelyek mind a SCN-, mind a perifériás szövetekben a napszakos ritmusos folyamatok sejtszintű működtetésében (oszillációjában) és szabályozásában játszanak szerepet. Az emlősöknél a molekuláris óra nagyfokú redundanciáját a többszörös transzkripcionális és poszt-transzlációs visszacsatolási hurkok alkotják. A ciklus pozitív szabályozói a „*circadian locomotor output cycles kapu*” (CLOCK) és a „*brain and muscle ARNT-like*” (BMAL1) óraproteinek heterodimerként a sejtmagba belépnek, majd hiszton-acetilációt és E-box promoterelemhez kötődést követően génexpressziót indukálnak (pl. *period homolog1-3* és *cryptochrome 1-2*). A CRY és PER órafahérjék komplexet képezve, negatív szabályzóként gátolják, a CLOCK/BMAL1 által közvetített transzkripciót a sejtmagban, azaz saját géneinek expresszióját is negatívan befolyásolják (**1. ábra**).



1. ábra

Az emlős circadián rendszer sematikus ábrája

A CLOCK/BMAL1 komplex a circadián molekuláris oszcillátor koordinációján kívül, egyes a sejtciklus szabályozásában résztvevő génekre közvetlenül hat, mint pl: *wee1* (G2/M átmenet), *c-myc* (G0/G1 átmenet) és *cyclin D1* (G1/S átmenet). Számos kísérlet eredménye molekuláris szinten alátámasztja a sejtciklus és napszakos óra között lévő bonyolult, egymásra ható és szerteágazó kapcsolat jelenlétét. Napszakos ritmusú szabályozások a DNS hibajavító mechanizmusokban és az apoptózis folyamatában is megtalálhatók. Mai ismereteink szerint a különböző DNS hibajavító mechanizmusok közül a NER (nucleotid excision repair) áll szoros kapcsolatban a circadián órával. Tanulmányok bizonyítják, hogy a circadián rendszer mind a belső (intrinsic) és mind a külső (extrinsic) apoptotikus útvonalakra hatással van.

1.2. Óragének és a karcinogenezis

A circadián rendszer számos különböző fiziológiás folyamat szabályozásában részt vesz (lásd 1.1), így nem meglepő, hogy sok tanulmány felveti, hogy hibás működése szerepet játszhat rosszindulatú tumor kialakulásában. Epidemiológiai adatok bizonyítják, hogy az életmód napszakos ritmusában bekövetkező károsodás magasabb daganat-kialakulási kockázattal társul. Emberi emlő- és kolorektális karcinóma vizsgálata során, a váltott műszakban dolgozók daganatkockázata magasabbnak bizonyult, mint a normális napszaki ritmusban dolgozóké. Ezen és számtalan hasonló kísérlet eredménye vezetett ahhoz, hogy 2007-ben a WHO (International Agency for Research on Cancer, IARC) a váltott műszakot a

karcinogének 2A csoportjába, azaz a lehetséges rákkeltő tényezők közé sorolta. Molekuláris szempontból számos tanulmány az óragének (*per1,per2*) működését a tumorszupresszorokéhoz hasonlítja. A molekuláris óra egyes tagjainak tumorszupresszor funkciója egyértelmű, míg a rendszert alkotó további óragének szerepe ez irányban kevésbé ismert. Emberi tumor biopsziás mintákon végzett vizsgálatok során az óragének expressziójának downregulációját észlelték különböző tumorokban pl: emlő-, endometrium-, prosztata-, vastagbél-, máj-, fej-nyaki laphám-, tüdő karcinóma, összehasonlítva a mellette lévő nem tumoros szövettel. A vizsgálatok értékelése folyamán figyelembe kell venni, hogy az emberi tumor biopsziákon végzett kísérletek során az óragének expressziójáról nyert leíró adatok nem adnak választ arra, hogy a talált eltérés a malignus transzformáció oka-e vagy következménye. Az epigenetikus downreguláció hátterében a megváltozott neurohumorális vagy metabolikus környezet is állhat, melyet a szervezet tumorelles védekező (helyi vagy szisztémás) mechanizmusai hoznak létre.

1.3. Napszakos ritmus a bőrben

A bőr az emberi szervezet borító rétege a külvilág felé, melyet folyamatosan érnek a napi ingadozást mutató környezeti hatások. Jól ismert, hogy az emberi bőrben bizonyos biofizikai és élettani folyamatok napi ritmussal bírnak, ilyen pl. faggyútermelés, bőr-barrier funkció.

A **1. táblázat** tartalmazza a bőr és a cirkadián rendszer kapcsolatát vizsgáló közleményeket. Összefoglalva elmondható, hogy a bőr funkcionális, perifériás cirkadián óramechanizmusokat tartalmaz, és ezáltal alkalmas modellnek tekinthető a cirkadián rendszer és tumor-kialakulás kapcsolatának tanulmányozására.

1.4. Melanoma és a cirkadián rendszer

A szabályos napszakos ritmus megszűnésének a SCC-, és melanoma előfordulásának gyakoriságára gyakorolt hatása, a számos állatkísérlet ellenére a mai napig nem ismert. A bőrtumorok és a cirkadián rendszer deszinkronizációjának kapcsolatát tanulmányozó epidemiológiai vizsgálatok eredményei is igen ellentmondásosak. Néhány vizsgálat a tengerentúli repülőjáratokon dolgozók melanoma kialakulásának fokozott veszélyére hívja fel a figyelmet, de az emelkedett rizikó hátterében kiváltó okot nem sikerült tisztázniuk (pl: napszakos ritmus zavara vagy légköri sugárzás). A másik oldalon számos, a váltott műszakban dolgozók, ill légikísérők között végzett tanulmány megkérdőjelezi a napszakos ritmus felborulása és a bőrtumorok közötti kapcsolat lehetőségét. Ezt támasztja alá egy friss közlemény, ahol az éjszakai műszakban dolgozók között a melanoma rizikó 44%-os csökkenését írták le. Összefoglalva a melanoma esetében az eredmények igen ellentmondásosak, hiszen amíg az epidemiológiai vizsgálatok egy része a szabályos

napszakos ritmus megszűnésekor a melanoma előfordulás csökkenéséről számol be, addig kísérletek bizonyítják azt is, hogy ezen állapot a tumor progresszióinak kedvez. A fokozott növekedés és szaporodás elsősorban a már transzformált sejtekben észlelhetőek, melyek a felborult napszakos ritmus által okozott metabolikus és neurohumorális diszregulációra elégtelen apoptotikus válasszal reagálnak. A melanoma kialakulásában a mai napig nem sikerült olyan hormont azonosítani, mely szerepe kizárólagos és nélkülözhetetlen lenne. Éppen ezért új hormonális faktorok irányába történő kutatás helyett, a sejtmetabolizmus napszakos szabályozásának részletesebb kutatása a bőrben ígéretes eredményeket hozhat.

1. táblázat Irodalmi áttekintés az óragének expressziójáról bőrben

Közlés időpontja	Minta	Eredmények
2000.07.	Keratinocytá- (HaCaT), melanocytá-, fibroblaszt-, melanoma A375 sejtvonalak	<i>Clock</i> és <i>per1</i> expressziójának igazolása mRNS és fehérje szinten a bőrt alkotó különböző típusú sejtekben.
2001.02.	Emberi bőr biopszia	<i>Clock</i> , <i>tim</i> , <i>cry1</i> , <i>bmal1</i> , <i>per1</i> expresszió napi ritmicitásának detektálása <i>in vivo</i> .
2002.08.	Emberi keratinocytá sejtvonal	Alacsony dózisu UVB besugárzás a <i>clock</i> , <i>per1</i> , <i>bmal1</i> expressziójában változást okoz.
2008.11.	C57BL6 vad típusú és <i>Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}</i> egerek	SCN ablációt követően a bőr óragének oszcillációja megszűnik.
2009.07.	C57BL6 vad típusú, <i>Clock^{-/-}</i> , és <i>Bmal1^{-/-}</i> egerek	A CLOCK–regulált gének a hajciklus fázisainak megfelelően változnak. Mutáns egér esetében anagén fáziskésés igazolható. <i>Bmal1^{-/-}</i> egérben p21 fokozott termelődése van.
2010.09.	HaCaT keratinocytá	<i>In vitro</i> igazolt az óragének és az általuk kontrollált gének (bőr fiziológiás folyamataiban fontos gének pl: <i>Insig2a</i> , <i>c-myc</i> , <i>Ldl receptor</i> , <i>Hmgcr</i>) ritmikus expressziója.
2011.11.	Hím, ivarérett SKH-1 egerek	A xeroderma pigmentosum group A (XPA) fehérje és a nukleotid excíziós javítás mértéke napi ritmicitást mutat a bőrben. Reggel 4 órakor történt besugárzás esetén kb. ötször több bőrtumor (invazív laphámsejtes karcinóma) alakul ki az egérben, mint a délután 4 óras besugárzás esetén.
2011.11.	<i>Bmal1^{-/-}/K5-SOS</i> egerek	A <i>bmal1^{-/-}/K5-SOS</i> egerek bőrén kevesebb bőrdaganat alakul ki, mint a K5-SOS egereken.
2012.05.	Emberi melanocytá, keratinocytá és fibroblaszt tenyészet	<i>In vitro</i> a bőrt alkotó sejtekben igazolt az óragének expressziójának ritmicitása, ill. az oszcilláció amplitúdója az adott sejt típusra jellemző.
2012.05.	Önkéntesektől nyert emberi epidermális biopsziák	Az emberi epidermiszben több száz gén kifejeződése mutat napi ingadozását mRNS szinten (microarray eredmények).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Számos *in vitro* tanulmány bizonyította a cirkadián rendszer szerepét a sejtciklus, a DNS hibajavító mechanizmusok és az apoptózis szabályozásában, melynek megbomlása tumorképződéshez vezethet. Klinikai vizsgálatok is történtek, melyek során a tumoros szövetből és a szomszédos nem tumoros szövetből nyertek biopsziás anyagot és a bennük mért mRNS óragén expresszió mennyiségét hasonlították össze. A közlemények egybehangzóan az óragének csökkent expresszióját írták le a tumoros szövetekben. Sok esetben feltételezték, hogy a *per* óragén mRNS csökkenése vezethet a tumor kialakulásához, hiszen molekuláris szinten bizonyított a tumorszupresszor hatása. Azonban ezeknél az eredmények értékelésénél figyelembe kell venni, hogy a legtöbb klinikai kísérletben nem tértek ki a sejt összetételbeli különbségre a tumoros és nem tumoros minták között, valamint, hogy a mRNS mennyiség csökkenésének a mértéke a két minta között mérsékelt volt. Ez felveti annak lehetőségét is, hogy a detektált különbséget a két minta közötti sejttözetelési különbség adja. A kérdés tisztázása céljából fontos, hogy a transzkripcionális eltéréseket ne csak a tumorsejtekben, hanem egyidejűleg a tumor szövetben lévő nem tumoros sejtek által alkotott kompartmentekben (pl. lymphocytás infiltráció) is megvizsgáljuk. A bőr a heterogén összetétele és könnyű elérhetősége miatt ideális modellként szolgál ilyen hisztomorfológiai vizsgálatok kivitelezése céljából.

- (1) A munkánk kezdetén egyetlen olyan klinikai vizsgálat volt, mely emberi bőrből származó szövetmintákban igazolta az óragének jelenlétét és ritmicitását. Arra vonatkozó adat nem volt, hogy a bőrben patológiás állapot (betegség) jelenlétekor, mi esetünkben bőrtumor, az óragének expresszálódnak-e. Melanoma malignum és mellette lévő nem tumoros bőrből történő mintavételt terveztünk óragén expresszió meghatározásra mRNs és fehérje szinten is.
- (2) Korábban számos emberi vizsgálat történt különböző típusú daganatoknál, kivéve melanoma, ahol a tumorból származó minta óragén expressziójának mértékét hasonlították a mellette lévő nem tumoros szövetmintához. A vizsgálatok során az óragének mRNS szintjének közel 50% csökkenését észlelték a tumoros mintában a kontroll szövetmintához viszonyítva. A vizsgálatunkban hasonló összehasonlítást terveztünk mRNS és fehérje szinten.
- (3) Egy daganat túlélésének megítélésében fontos szerepet játszanak a prognosztikai faktorok. Vizsgálatunkban a melanoma malignum jól ismert klinikai és hisztopatológiai prognosztikai faktorainak az óragének expressziójának mértékével

történő összehasonlítását terveztük, esetleges új biomarker identifikálása reményében.

- (4) Annak tisztázására, hogy az óragének expressziójában észlelt különbségek esetleg csupán a sejtösszetétel differenciájának a következményei lehetnek, a melanomához hasonló melanocyter eredetű, de benignus elváltozásból (naevus) és mellette lévő normál bőrből történő mintavételt terveztünk. Ennek során először az óragének expressziójának jelenlétét vizsgáltuk, ill. a meglévő adatok alapján a hasonlóan melanocyter eredetű képletek és a két tünetmentes bőr óragén expressziós adatainak összevetését terveztük.

3. BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálat során a PTE ÁOK Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinikán 32 esetben vettünk szövetmintát azon betegeinktől, ahol a melanoma malignum klinikai diagnózisa felmerült (betegek átlag életkora: 63 év, minimum: 24 év, maximum: 88 év). A műtét időpontjában egyik betegnél sem volt detektálható regionális és/vagy távoli áttét. A primer tumor minden esetben reggel 9 és 12 óra között került kimetszésre a melanoma ellátásnak megfelelő protokoll szerint. Ezt követően a tumorból és a mellette lévő nem tumoros bőrből (ez átlagban kb. a tumortól 2 cm-re helyezkedett el) 3-3 mm-es punch biopsziát vettünk. Továbbá 10 önkéntestől 1-1 nem tumoros, melanocyter bőrelváltozásból, azaz naevusokból és a mellettük elhelyezkedő normál bőrből (naevustól kb. 1 cm-re) szintén történt mintavétel a fenn említetteknek megfelelően. A bőr alatti zsírszövetet (szubkutisz) a punch biopsziákról steril szikével leválasztottuk, majd a mintát azonnal TRI reagensben (SigmaT9424) homogenizáltuk és a RT-PCR analízisig -70°C -on tároltuk. Minden esetben a primér elváltozás szövettani vizsgálata megtörtént, mely igazolta a tumor diagnózisát, ill. típusát. A minták sejtösszetételének meghatározása a Pécsi Tudományegyetem, Pathológiai Intézet, II. Sz. Diagnosztikai Laborjában alkalmazott rutin hisztopatológiai protokoll alapján történt (haematoxylin-eosin festést, S-100, HMB45A, Melan-A és tyrosinase immunfestés). Ezen festéseken kívül mind a malignus és nem malignus mintákon CLOCK és PER1 immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk.

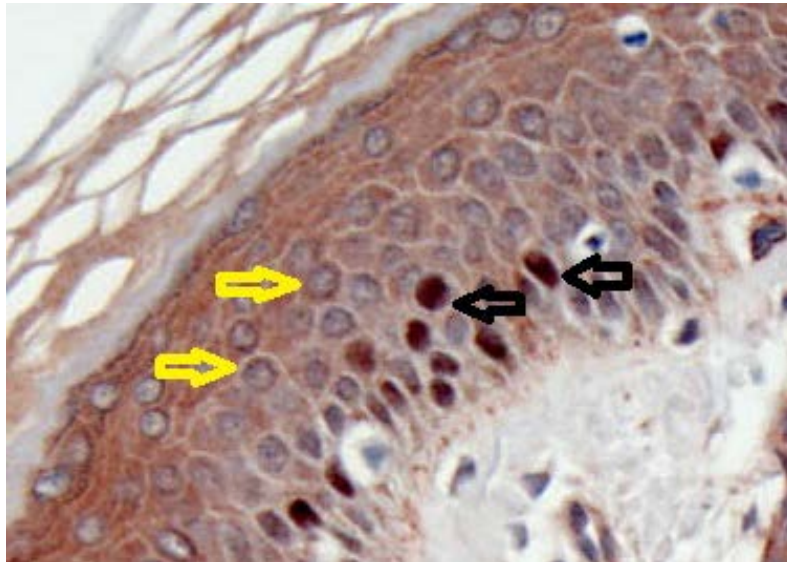
A rutin hisztopatológiai vizsgálat során a 32 betegből 26 esetben igazolódott a melanoma malignum diagnózisa. A szövettanilag igazolt melanomák közül négy esetben RT-PCR nem volt kivitelezhető a magas melanin tartalom miatt, mely a fluorescens vizsgálattal interferált. A minták tumorvastagság szerinti megoszlása, és az *American Joint Committee on Cancer Staging* alapján történő (T) besorolása a következőképpen alakult: a 22 melanomából, 3 minta *in situ* melanoma ($T_{in situ}$), 7 eset <1 mm (T_1), további 7 eset 1-2 mm (T_2), 4 minta 2-4 mm

(T₃), és 1 minta 4 mm-nél vastagabb (T₄) volt. Szövettani beosztás alapján a melanomák nagyrésze felszínesen terjedő melanomának (n=18), két esetben lentigo maligna melanomának, és egy-egy esetben acrolentiginosus, ill. noduláris melanoma malignumnak bizonyult. A 10 anyajegyves minta közül 7 compound-, és 3 junctionális naevusnak megfelelő szövettani képet mutatott.

Az óragének mRNS expressziójának meghatározásához real-time RT-PCR-t alkalmaztunk. A teljes RNS extractió a TRI reagens gyártó cég előírásának megfelelően történt (SigmaT9424). Az extraktum nukleinsav tartalmát 260 nm-en mért abszorbancia alapján (Ultrospec 2100 készülékkel) számoltuk. Real-time PCR kivitelezése során a 15 µL reakció elegy 3 µL cDNS oldatot, valamint a vizsgálni kívánt primereket tartalmazta (Applied Biosystems' TaqMan): *per1* (Hs00242988_m1), *per2* (Hs00256143_m1), *clock* (Hs01546767_m1), *cry1* (Hs01597805_g1). Belső kontrollként *β-actin*-t (Hs99999903_m1) és *hprt1*-t (Hs99999909_m1) alkalmaztuk. Bármely belső kontroll használata esetén az egészséges-, és tumoros bőr között különbséget alig vagy nem lehetett detektálni. A vizsgálatunk másik felében az RT-qPCR eredményeink alapján kiválasztott óraproteinekkal (CLOCK és PER1) immunhisztokémiai festés történt.

A bőrbioptiás mintákban mért óragén mRNS különbségek számszerűsítésére a $\Delta\Delta C_T$ módszert használtuk, a PCR reakciók amplifikációs hatékonyságának normalizálására szolgáló beállítások után. A bőrmintán végzett immunhisztokémiai reakció értékeléséhez az erősen nukleáris immunpozitivitást mutató sejtek számát, majd átlagát határoztuk meg a bioptiás anyag három metszetében. Minden metszetben három egymástól független terület került lefényképezésre. A metszetek értékelése nem-szerkesztett digitális színes képeken történt, az adott metszet szövettani diagnózisa és paramétereinek ismerete nélkül. Az értékelés során erős nukleáris immunpozitív sejtnak minősült az a sejt, melynek a magja barna volt és teljesen elfedte a haematoxylin festés kék színét (**1. kép**). A különböző szöveti minták (melanoma, szomszédos nem tumoros bőr, naevus, és mellette lévő normál bőr) eredményeinek összehasonlítására, ill. a melanoma klinikopatológiai jellemzőivel lévő esetleges kapcsolat elemzésére Student két mintás tesztet alkalmaztunk (két oldalú, nem egyenlő varianciájú). A statisztikai elemzéshez SigmaStat for Windows Statistical Software, 3.5 verzióját (Systat Software Inc., San Jose, California) használtuk.

A statisztikai próbánál a szignifikancia-határának $p=0,05$ -öt tekintettük.



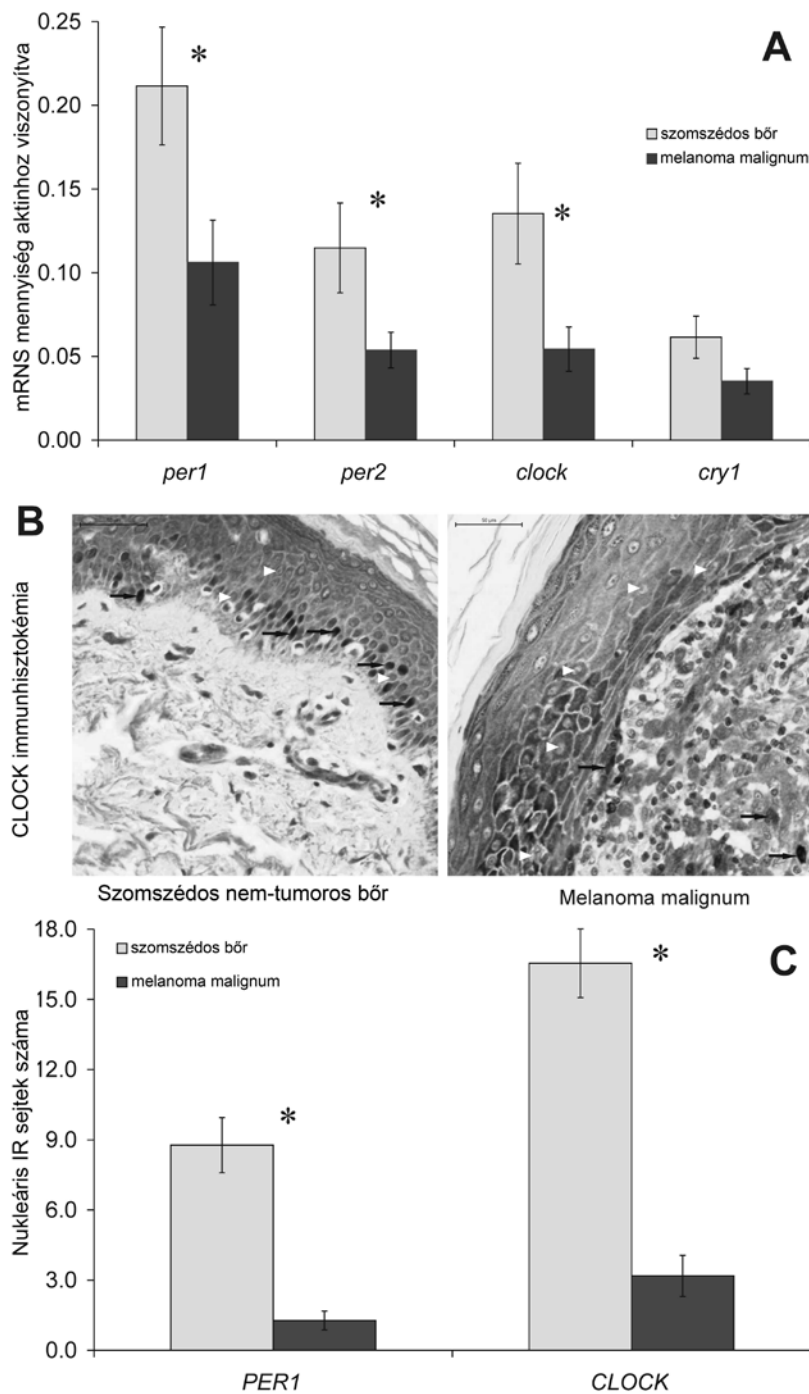
1. kép

Immunreaktív (fekete nyíl)-, és nem jelölődő (sárga nyíl) sejtek

4. EREDMÉNYEK

***Per1, per2, clock* és *cry1* expressziója melanomás betegek bőrbiopsziás mintáin**

Vizsgálatunk során az óragének mRNS expressziójának csökkenését észleltük a melanomás szövetmintákban a mellette lévő normál bőrhöz viszonyítva (**2A. ábra**). Átlagban *per1*, *per2*, és *clock* expresszió szignifikáns csökkenést mutatott (p értékek: 0,020, 0,034, 0,020), míg *cry1* expressziója nem bizonyult annak (p=0,081). Mind a PER1, mind a CLOCK nukleáris immunpozitív sejtek száma egyértelmű csökkenést mutatott a tumoros mintákban a normál bőrhöz képest (p<0,001, **2C. ábra**). A PER1 vagy CLOCK antitesttel nukleárisan festődő sejtek túlnyomó része keratinocita volt a tumor- és a normál bőrmintákban is (**2B. ábra**). A melanocita és melanoma sejtek elhanyagolható mértékben festődtek a két alkalmazott antitesttel. Mivel a PER1 és CLOCK fehérjék befolyásolják a transzkripciót, a nukleárisan pozitív immunsejtek száma a funkcionális molekuláris órával rendelkező sejtek számát tükrözheti. Az immunpozitív sejtek számát látóterenként határoztuk meg, a látóterenkénti összsejtszám figyelmen kívül hagyásával. Ezáltal az általunk immunpozitív sejtek számában detektált 5-6x csökkenés egy sejtgazdagabb tumoros mintában a mellette lévő normál bőrhöz történő hasonlításakor még nagyobb csökkenést jelenhet a funkcionális órával rendelkező sejtek arányában.



2.ábra

- A.** Óragének mRNS expressziójának mértéke tumoros és nem-tumoros bőrben
B. CLOCK immunohisztokémia (fekete nyíl: immunpozitív-, fehér nyíl: immunnegatív sejtek)
C. PER1 és CLOCK immunpozitív sejtek átlaga

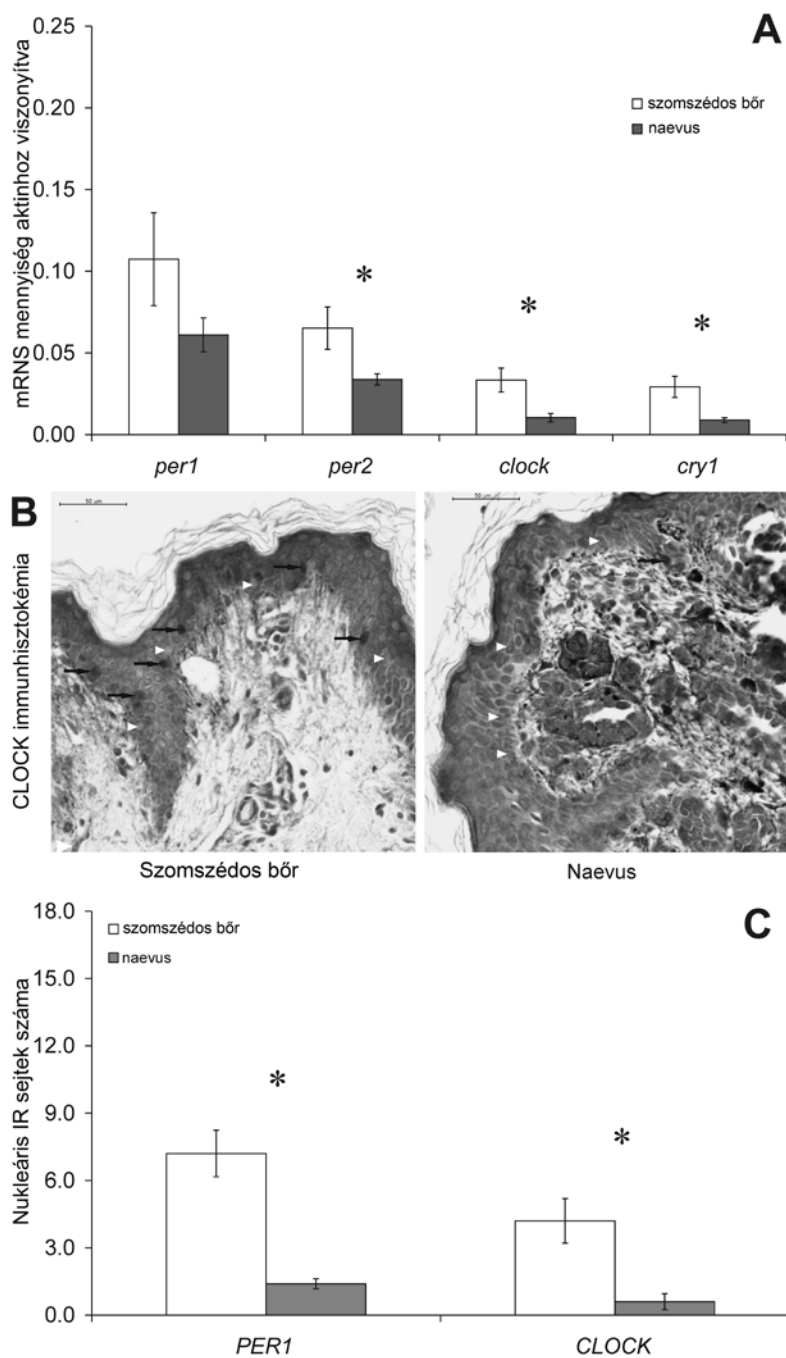
Melanoma malignum hisztopatológiai jellemzői és a cirkadián óragének közötti összefüggések vizsgálata

A melanomás bőrminták vizsgálata során a PER1 fehérje expressziója és a Breslow tumorvastagság, ill az ulceráció meglétével reciprok összefüggést találtunk ($p=0,006$, ill $0,018$), azaz vastagabb tumor esetében nagyobb mértékű csökkenés látható a PER1

immunpozitív sejtek számában a melanomás biopsziákban. Ezt a megfigyelést azonban csak fehérjeszinten sikerült igazolni, mRNS szinten sem a *per1*, sem a *per2* nem mutatott összefüggést egyik vizsgált hisztopatológiai jellemzővel sem. Ezzel szemben, a *clock* expresszió több prognosztikai faktorról mutatott korrelációt mind mRNS és fehérjeszinten. mRNS szinten a melanomás szövetmintákban a Breslow tumorvastagsággal szignifikáns reciprok összefüggés volt detektálható ($p=0,023$). Továbbá azt találtuk, hogy a tumor melletti nem tumoros szövetmintákban a *clock* expresszió szintén fordítottan arányos kapcsolatban áll a Breslow tumorvastagsággal ($p=0,018$), a Clark szinttel ($p=0,017$) és az ulceráció jelenlétével ($p=0,005$). Ez azt jelenti, hogy a vastagabb tumoroknál a szomszédos nem tumoros bőrben a *clock* mRNS expresszió alacsonyabb, mint a vékonyabb tumorok esetében. Fehérjeszinten hasonló volt megfigyelhető, a tumor magasabb Clark értékéhez ($p=0,032$) és mitotikus rátájához ($p=0,046$) a szomszédos, nem tumoros bőrben a CLOCK immunpozitív sejtek számának nagyobb mértékű csökkenése társult. A *cry1* óragén expressziója hasonló reciprok összefüggéseket mutatott a Breslow tumorvastagsággal ($p=0,034$) és az ulcerációval ($p=0,029$) a nem tumoros bőrben.

***Per1, per2, clock* és *cry1* expressziója naevus biopsziás mintákon**

Az óragén expresszió mRNS mennyiségének csökkenését detektáltuk a naevus mintákon összehasonlítva a szomszédos egészséges bőrrel (**3A. ábra**). Átlagosan a *per2*, a *clock* és a *cry1* mutatott szignifikáns csökkenést (p értékek: 0,032, 0,008, 0,007), ezzel ellentétben a *per1* mRNS expresszió csökkenése nem volt szignifikáns ($p=0,145$). A naevus mintákban az immunpozitív sejtek száma kevesebb volt, mint a szomszédos normál bőrben (**3B. ábra**). A melanoma mintákon észleltekhöz hasonlóan a melanocyták csekély mértékben festődtek a PER1 vagy CLOCK antitesttel, míg a keratinocyták erős pozitív reakciót adtak. A 10 naevus mintából PER1 festődésnél 8, CLOCK festődésnél 6 esetben volt szignifikáns a csökkenés. A szomszédos normál bőrhöz viszonyítva mindkét fehérje mennyisége szignifikánsan csökkent (PER1/ $p=0,006$; CLOCK/ $p=0,029$) (**3C. ábra**).



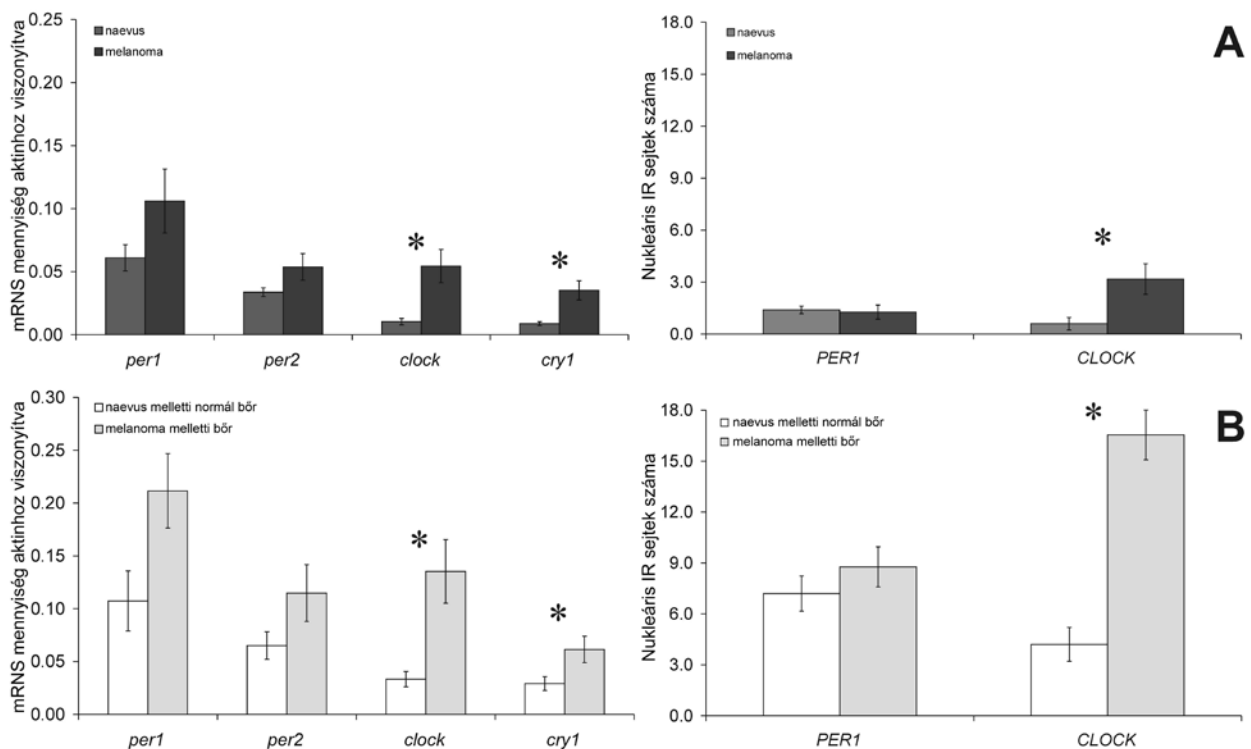
3. ábra

- A.** Óragének mRNS expressziójának mértéke tumoros és nem-tumoros bőrben
B. CLOCK immunhisztokémia (fekete nyíl: immunpozitív-, fehér nyíl: immunnegatív sejtek)
C. PER1 és CLOCK immunpozitív sejtek átlaga

Naevus- és melanoma mintákon vizsgált óragén expresszió összehasonlítása

A nem malignus naevus mintákhoz képest a melanómában (4A. ábra), a *clock* és a *cry1* expressziója mRNS szinten emelkedett volt (5,24x, $p=0,018$; ill. 3,98x, $p=0,002$). A *per1* és *per2* nem mutatott jelentősebb különbséget ($p=0,74$ és $p=0,54$). Fehérje szinten is detektálható volt a CLOCK immunpozitív sejtek számának növekedése a rosszindulatú

elváltozásban (5,3x, $p=0,011$), míg a PER1 pozitív sejtek száma nem különbözött szignifikánsan ($p=0,91$). A *cry1* és a *clock* mRNS szint szignifikánsan emelkedett volt a tumor melletti nem tumoros bőrben, összehasonlítva a benignus lézió melletti bőrrel (**4B. ábra**) (2,1x, $p=0,027$; és 4,0x, $p=0,003$). A *per1* és *per2* expressziója ez esetben sem különbözött szignifikánsan a két mintában (p értékek: 0,8 és 0,9). Fehérje szinten a tumor melletti bőrben észleltük a CLOCK immunpozitív sejtek számának növekedését (3,94x, $p<0,001$), míg a PER1 immunpozitív sejtek száma szignifikánsan nem változott.



4. ábra

A. A melanoma és naevus minták óragén expressziójának összehasonlítása

B. A melanomás betegek nem-tumoros bőrének és a naevus melletti egészséges bőr óragén expressziójának összehasonlítása

5. MEGBESZÉLÉS

A sejtciklus, a DNS hibajavító mechanizmusok, az apoptotikus útvonalak és a cirkadián rendszer egymásra gyakorolt hatásának a bizonyítása új területet nyitott meg a tumor kutatásban. A cirkadián molekuláris óra egyes alkotói direkt tumorszupresszor hatással bírnak (*per1*, *per2*), míg néhány óragén szerepe ebben a folyamatban kevésbé egyértelmű (*clock*, *bmall*, *cry*). Különböző emberi daganattípusokból nyert tumormintákban a tanulmányok az óragének mérsékelt alulműködését írták le a szomszédos normál

szövetmintához viszonyítva. Ezt a jelenséget azonban nem feltétlenül a malignus transzformáció, hanem az eltérő sejttöszetétel is okozhatja.

A bőr ideális modell arra, hogy a cirkadián rendszer és a tumor-kialakulás kapcsolatát tanulmányozzuk, mivel: (i) a bőrt felépítő különböző sejtípusok mindegyike funkcionális perifériás órát tartalmaz, (ii) a cirkadián rendszer szerepe bizonyított állatkísérletes bőrtumor modellben.

Ezen szempontokat figyelembe véve vizsgálatunkban melanómás mintákon határoztuk meg az óragén expressziót mRNS és fehérje szinten. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan az óragének expressziójának csökkenését észleltük a szomszédos nem tumoros szövetmintához hasonlítva (**2. ábra**). Azonban a csökkenés mérsékelt volta, ill. a hisztopatológiai jellemzőkkel való kapcsolat hiánya miatt felmerült, hogy a csökkenést a sejttöszetelési különbség is adhatja. Feltevésünk igazolására jóindulatú, melanocytá tartalmú képletekből is biopsziát nyertünk és ezek óragén expressziós értékeit is a szomszédos bőrhöz viszonyítottuk. Melanomához hasonlóan itt is az óragén expressziójának csökkenését detektáltuk (**3. ábra**), így igazolva láttuk, hogy csupán a sejt összetételbeli különbség is okozhatja az óragén expresszió csökkenését.

Azonban mikor a naevus és melanoma adatokat összehasonlítottuk a *clock* óragén indukcióját találtuk transzkripciós és transzlációs szinten is a melanómás mintákban (**4A. ábra**). Az immunhisztokémiai vizsgálat során a vizsgált órafehérjék elsősorban a szövetminták nem tumoros sejtjeiben (pl. keratinocytá) voltak detektálhatóak (**2B és 3B ábrák**). Ugyanezek az eltérések nem csak a tumorban, hanem a mellette lévő még “tumormentes” bőrben is észlelhetőek voltak, összehasonlítva az egészséges bőrrel (**Fig. 4B.**). Ez felveti, hogy a malignitáshoz kapcsolódó lokális és/vagy szisztémás metabolikus, immun és neurohormonális faktorok a környező, nem malignus területekre (sejtekre) is hatással vannak, már akkor is, mikor klinikailag detektálható elváltozás még nincs jelen. Hogy ez az óragén expressziós eltérés a daganat kialakulásában szerepet játszik-e vagy annak következménye, vizsgálatunk nem ad választ, e célból további vizsgálatok végzése szükséges. Napjainkban megjelent közlemények kimagasló figyelmet tulajdonítanak a cirkadián rendszer (CLOCK) sejt metabolizmusra gyakorolt hatásának és ezáltal a tumor kialakulásában és/vagy progressziójában betöltött szerepére, melyet a mi eredményeink is alátámasztanak.

A cirkadián rendszer és karcinogenezis kapcsolatának pontosabb feltérképezése a jövő feladata, mely az onkológiai terápia individualizációjában és hatásosságának a fokozódásában is ígéretes lehet.

A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK

- (1) Elsőként igazoltuk bőrelváltozásokban, jelen esetben melanomában és naevusban az óragének expresszióját mRNS és fehérje szinten.
- (2) A melanomában detektált óragének expressziójának csökkenése vizsgálatainkban nem mutatott egyértelmű összefüggést a melanoma klinikopatológiai jellemzőivel.
- (3) Elsőként kérdőjeleztük meg a tumoros és a szomszédos nem tumoros szövettani minták összehasonlítása során detektált óragén expresszió csökkenés hátterében a csak malignus transzformáció szerepét. Felvetettük és indirekt módon igazoltuk, hogy a csökkenés akár a szövetminták eltérő sejtösszetételéből is adódhat.
- (4) Eredményeink alapján a *per1* tumorsszupresszor hatású óragén kifejeződésének csökkenése nem feltétlenül a malignus transzformáció következménye.
- (5) Kimutattuk, hogy a tumor melletti nem tumoros bőr sem egészséges, mert az egészséges bőrhöz képest az óragének megváltozott expressziója detektálható. Az észlelt patológiás CLOCK expresszió egy „nem normális” metabolikus környezetet reprezentálhat, melynek jelentőségét a tumor-kialakulásban (precancerosus állapot) vagy a tumorelles kezelés hatásosságának befolyásolásában még tisztázni kell.
- (6) A melanomában és a mellette lévő nem tumoros bőrben mind mRNS és fehérje szinten a CLOCK indukcióját detektáltuk. A malignus szövetmintákban az óragének expressziójában észlelt transzkripciós változások elsősorban nem a daganatsejtekre, hanem a tumorban és környezetében található nem malignus sejtekre jellemzők.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Battyáni Zita tanárnőnek és Dr. Csernus Valér Professzor Úrnak, akik munkám során mindvégig maximális támogatást nyújtottak mind a kísérletes munkámban, mind a tudományos és klinikai életre való nevelésben.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Nagy Andrásnak, aki tudományos munkám elindításában és kivitelezésében segítségemre volt. Tanácsaival, optimizmusával kitartásra ösztökélt. Megtanította, hogy „mindig lehet jobban csinálni, fejlődni”.

Köszönöm Dr. Szekeres Györgynek és munkatársainak az immunhisztokémiában nyújtott segítségért és Dr. Rékási Zoltánnak a PCR gép használatának lehetőségét.

Nagyon hálás vagyok a mintavétel szervezésében és kivitelezésében segítséget nyújtó asszisztensnőknek, laborosoknak, nővéreknek, műtősnőknek és orvostanhallgatóknak.

Köszönetet szeretnék mondani a vizsgálatban résztvevő betegeknek és pácienseknek.

Végül, de talán legfőképp hálásan köszönöm családomnak, hogy minden körülmény között lehetővé tette számomra a tudományos tevékenységet és az értekezés elkészítését. Köszönöm férjemnek a türelmét, szakmai segítségét, szüleimnek az életem során nyújtott állandó önzetlen segítségét, testvéremnek a szerkesztési feladatokat és nagymamámnak a sok-sok gyermekfelügyeleti segítséget és mindenki biztatását.

PUBLIKÁCIÓK/PUBLICATIONS

Az értekezés alapjául szolgáló folyóiratcikkek/ Articles related to the thesis

(1) **Z. Lengyel**, C. Lovig, S. Kommedal, R. Keszthelyi, G. Szekeres, Z. Battyáni, V. Csernus, A.D. Nagy. Altered expression patterns of clock gene mRNAs and clock proteins in human skin tumors. *Tumour Biol.* 2013. (34) 811-819. doi:10.1007/s13277-012-0611-0

IF₍₂₀₁₁₎: 2,143

(2) **Z. Lengyel**, Z. Battyáni, G. Szekeres, V. Csernus, A.D. Nagy. Circadian clocks and tumor biology: what is to learn from human skin biopsies?

Gen Comp Endocr. 2013. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.03.033

IF₍₂₀₁₁₎: 3,267

Az értekezés témájához nem kötődő közlemények/ Other articles

(1) Kulisch Á., **Lengyel Zs.**, Battyáni Z., Szekeres Gy., Farkas B. Sejtproliferatio és apoptosis immunomorphologiai vizsgálata pigmentált tumoroknál. *Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle.* 2001. (77) 255-258.

(2) B. Csete, M. Moezzi, **Z. Lengyel**, B. Hodosi, E. Zombai, Z. Battyáni. Florid cutaneous papillomatosis leading to social exclusion. *Br. J. Dermatol.* 2005. (153) 667-669.

IF₍₂₀₀₅₎: 2.978

(3) Battyáni Z., **Lengyel Zs.**, Kutasi Zs., Zilahi L., Berki T. Autoimmunitás kialakulása alacsony dózisú interferon alphával kezelt melanoma malignumos betegeknél. *Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle.* 2010. (5) 135-138.

(4) Sebők B., Hortobágyi J., **Lengyel Zs.** Gyógyvizek antipsoriaticus hatásának vizsgálata. *Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle.* 2010. (5) 149-151.

(5) Szász O., **Lengyel Zs.** Szalai G., Battyáni I., Hampel Gy., Battyáni Z. Komplex, mobil szűrés során szerzett tapasztalataink melanoma és non-melanoma bőrtumorok vonatkozásában Dél-Dunántúl Régióban. *IME Az egészségügyi vezetők szaklapja* 2010. (9) 42-44.

(6) Fekecs T., Kádár Zs., **Lengyel Zs.**, Battyáni Z., Kalmár-Nagy K., Szakály P., Wéber Gy., Horváth Ö.P., Ferencz A. Szervtranszplantációt követő bőrgyógyászati szűrővizsgálat

jelentősége a non-melanoma bőrtumorok diagnosztikája és kezelése céljából. Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle. 2011. (1) 9-14.

(7) Csernus A.E., **Lengyel Zs.**, Ferencz J., Kálmán E. Battyáni Z. Melanoma malignum in vivo mélységi terjedésének meghatározása nagyfelbontású ultrahanggal (18-, 22 Mhz). Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle. 2012. (1) 11-18.

(8) Battyáni Z., Kádár Zs., **Lengyel Zs.**: Metasztatikus melanoma ipilimumab (Yervoy) kezelése egy eset kapcsán. Onkológia. 2012.(2) 97-99.

Idézhető kongresszusi összefoglalók / Abstracts that can be cited

(1) Zs. **Lengyel**, Z. Battányi, Gy. Szekeres, B. Farkas. Immunmorphological assessment of cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2003. (1) (Suppl1) p. S16.

(2) **Zs. Lengyel**, Zs. Kutasi, Z. Battányi Zita. Correlation Between DSDP (Digital Standardised Dermatological Point Value) Score and Histopathological Diagnosis of Melanocytic Lesions. Dermatology. 2006. (212) p. 309. **IF₍₂₀₀₆₎: 1,854**

(3) Zs. **Lengyel**, B. Kajtár, Á. Nagy, Z. Battányi. A case of blastic plasmocytoid dendritic cell neoplasm. Mel. Research. 2011. (21) e45-e46. **IF₍₂₀₁₁₎: 2,19**

Az értekezés alapját képező előadások, posztterek/ Presentations related to the thesis

(1) **Zs. Lengyel**, A. D. Nagy, V. Csernus, Z. Battyáni. Expression of the circadian clock gene clock in human melanoma skin biopsy (poster)

25th Conference of the European Comparative Endocrinologists, August 2010, Pécs.

(2) **Lengyel Zs.**, Nagy A.D., Csernus V., Battyáni Z. Cirkadián óragének: per1, per2, clock, és cry1 expressziója melanomában

Magyar Dermatológiai Társaság 84. Nagygyűlése, 2011. December, Budapest.

(3) **Lengyel Z**, Lovig C, Kommedal S, Keszthelyi R, Szekeres G, Battyáni Z, Csernus V, Nagy AD. Expression of per1, per2, clock and cry1 in human melanoma and naevus biopsies (poster)

Society for Research on Biological Rhythms, May 2012. Destin, Florida, USA.

(4) **Zs. Lengyel**, S. Kommedal, V. Csernus, Z. Battyáni, A. D. Nagy. Altered expression patterns of clock gene mRNAs and clock proteins in human skin tumors

26th Conference of the European Comparative Endocrinologists, August 2012. Zürich, Svájc.

Az értekezés témájához nem kötődő előadások száma/Nº of other presentations: 38