

**A BIOLÓGIAI ÓRA HATÁSA AZ ARILALKILAMIN-N-
ACETILTRANSZFERÁZ mRNS CIRKADIÁN
EXPRESSZIÓJÁRA CSIRKE RETINÁBAN ÉS
TOBOZMIRIGYBEN**

Ph.D. értekezés

dr. Toller Gábor

Doktori Program vezetője: Dr. Szolcsányi János

Alprogram vezető: Dr. Csernus Valér

Témavezető: Dr. Rékási Zoltán

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar**

**Pécs
2008**

1. Bevezetés

1.1. A cirkadián ritmusok jellemzői

Az egysejtűektől a legfejlettebb gerincesekig, illetve növényekig számos szervezet életjelenségei változnak napszaki, azaz cirkadián ritmicitással. A ritmikusan ismétlődő élettani jelenségek háttérben az élőlények saját belső órája áll, amelyet a környezet ritmikusan változó ingerei igazítanak a külvilág ritmusához. Mivel a külvilág ingereitől független szubjektív napnak a hossza fajoként eltérő, ezért a környezet által nem befolyásolt, szubjektív ciklus alatt történő események időbeni leírásához a cirkadián időt (CT) használjuk. Megyegezés szerint CT 0 a szubjektív hajnalnak, CT 12 pedig a szubjektív szürkületnek felel meg. Azokat a külső környezeti tényezőket, amelyek a ritmusok külső környezettel történő szinkronizálásáért felelősek *Zeitgeber*eknek hívjuk. Ha az óra és az óra által vezérelt fiziológiai változások követik egy adott *Zeitgeber* változásait, akkor kísérleteink időbeni leírásához a CT helyett a *Zeitgeber* időt (*Zeitgeber time*, ZT) használjuk.

A szervi organizációval rendelkező élőlények esetében akár több szerv is rendelkezhet a cirkadián ritmus fenntartására alkalmas biológiai órával. Azon biológiai órával rendelkező szerveket, amelyek a külső környezet jeleinek hatására képesek pacemakerük ritmusát megváltoztatni, és a többi szerv óramechanizmusát koordinálni elsődleges oszcillátoroknak (*master oscillator*), míg az általuk irányított szerveket másodlagos oszcillátoroknak (*slave oscillator*) nevezzük.

A cirkadián ritmusok biológiai hátterét egy három komponensből álló cirkadián rendszer adja. Ennek bemenetét egy olyan mechanizmus képezi, amelynek segítségével az óra a külvilág felől információt kap. A rendszer központi eleme a belső biológiai óra vagy endogén oszcillátor, a rendszer kimenő komponense pedig a hormonális vagy idegi jel, amely az élőlény napszaki életfunkcióit, viselkedését határozza meg.

1.2. A madarak cirkadián rendszere

A madár cirkadián rendszer fő komponensei a retina, a hipotalamusz nucleus suprachiasmaticus (SCN), és a tobozmirigy. Madarakban a cirkadián rendszer összes komponense rendelkezik a többi alkotóelemtől függetlenül is működni képes belső órával. A madarak elsődleges oszcillátorainak ritmusát időzítő legfontosabb környezeti tényező, azaz *Zeitgeber*, a fény. A környezet fényviszonyainak változásait elsősorban a retina érzékeli, de ismert a madár hipotalamusz és a tobozmirigy fényérzékenysége is. A retina a SCN-t a retinohipotalamikus pálya révén informálja a környezet fényviszonyairól. A tobozmirigy egy multiszinaptikus pályarendszeren át a SCN szabályozása alatt áll. A madarak tobozmirigye egy folliculáris szerv, amely a koponyatető alatt helyezkedik el és egy nyél köti az epitalamuszhoz. A tobozmirigy melatonin termelésért a folliculusok hámsját alkotó pinealociták felelősek. A tobozmirigyben elsősorban noradrenerg rostok végződnek. A madarak pinealocitáin a noradrenalin α_2 -adrenerg receptorokon hat, ezért a noradrenalin gátló hatása érvényesül. A madár tobozmirigy melatonin termelését tehát a tobozmirigy elsődleges oszcillátora és a környezeti fényviszonyok együtt szabályozzák.

A pinealociták által termelt melatonin a vérkeringés segítségével egyrészt perifériás szervekhez jut el, másrészt az agy különböző területein fejt ki hatását specifikus receptorokon keresztül, melyek közül kiemelendő a hipotalamusz.

1.3. A biológiai óra molekuláris biológiai háttere

A magasabbrendű gerincesek biológiai órájáról szerzett ismereteink elsősorban rágszálakon végzett kísérletek eredményeiből származnak.

Egerekben a biológiai óra pozitív elemei az mBMAL1 és az mCLOCK proteinek, amelyek a bHLH-PAS doméneket tartalmazó fehérjék családjába tartoznak. Patkányok esetében heterodimér párból az rBMAL1 és az azt kódoló mRNS mutat jelentős napszaki ingadozást. Az rCLOCK esetében nem sikerült jelentős napszaki ingadozás kimutatni, a fehérje C-terminális régiója azon glutaminban gazdag doménnel rendelkezik, amely lehetővé teszi, hogy a rCLOCK a transzkripciós iniciációs komplexet aktiválja. A mCLOCK/mBMAL1 heterodimér egyrészt serkenti a mREV-ERBa fehérjék szintézisét, másrészt az óra negatív komponenseinek génjeiről és az óra által szabályozott génekről történő génátírást serkenti. A mREV-ERBa pozitív visszacsatolással serkenti a *mBmal1* génről történő mBMAL1 szintézist és az *mE4Bp4* génről történő átírást. Emlősökben a cirkadián oszcillátor gátló komponensei a *Per*, *Cry* és *Tim* gének. Az mPER és mCRY fehérjéknek több izoformája is ismert. Az mTIM – ellentétben *Drosophila* ortológjával - nem mutat kifejezett napi ritmiticitást, szerepe valószínűleg a foszforilált mPER stabilizálása. Az alacsonyabb rendűekben fotoszenzitív, *mCry* gének által kódolt kriptokróm fehérjék az mPER fehérjékkel komplexet képezve képesek a mBMAL1/CLOCK fehérjék transzkripciót aktiváló hatását gátolni. A biológiai óra magját a *mBmal1* és a *mClock* és az ezekről szintetizált proteinek képezik, ismertek azonban még egyéb transzkripciós faktorok is, mint az egér *D-site binding protein* az mE4BP4, amelyek az *mPer* gén aktivátorai illetve represszorai lehetnek.

Az emlősök biológiai órája tehát egy pozitív: BMAL1/CLOCK/REV-ERBa és egy negatív PER/CRY/TIM visszacsatolási körből áll, melyek között a kapocs a BMAL1 protein.

Az madarak órája felépítését tekintve nagyon hasonlít az emlősöknél leírt rendszerre, azonban van néhány részlet ami különböző. A biológiai óra pozitív elemei a csirkében is a cBMAL1 és a cCLOCK proteinek, melyek felépítésüket és szerepüket tekintve megfelelnek az emlős ortológjaiknak. A cCLOCK számára alternatív heterodimerizációs partner a cBMAL2, de érdekesképp a cBMAL2 nagyobb koncentrációi már gátolják a cCLOCK transzkripciót serkentő hatását, ha egyidejűleg a cBMAL1 is jelen van. Bár madarakban is ismert a *Rev-erba* mRNS expressziója, a rendelkezésünkre álló irodalmi adatok alapján, még nem történt arra irányuló kísérlet, amely során bárki is összefüggést keressen a *cBmal1* génexpresszió és a *cRev-erba* között. Szemben emlősökkel, a madarak biológiai órájának nem része a *Tim* és ezideig csak a *mPer2* madár ortológját sikerült azonosítani. Madarakban a cBMAL1/cCLOCK mellett a cMOP4/cBMAL1 heterodimer is serkenti, míg az E4BP4 homodimerje gátolja a *cPer2* expresszióját. A CRY-ok közül ismert mind a három izoforma, sőt az egyik legfrissebben felfedezett madár óragén a *cCry4*, de ennek pontos szerepét további vizsgálatoknak kell majd tisztázni.

A biológiai óráról elmondottakat figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy a madarak biológiai órája jó modellje lehet a gerincesek cirkadián oszcillátorainak. Madarakban tobozmirigy és a retina sejtjei elsődleges cirkadián oszcillátorként működnek, ezért választottuk ezen szerveket modellként a biológiai órát vizsgáló kísérleteinkhez. A madarakon kapott eredmények értékelésekor azonban figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a melatonin szintézis szabályozása bizonyos eltéréseket mutat madarak és emlősök között.

1.4.1. A melatonin anyagcseréje és kapcsolata az endogén oszcillátorral

A melatonin egy indolamin hormon, melynek szintézisét a belső, cirkadián óra irányítja, úgy, hogy a sötét fázisban magas, míg a világos fázisban alacsony melatonin szintek detektálhatóak. Csirkében a melatonin szintéziséért a tobozmirigy pinealocitái felelősek, bár

egyes madárfajok esetében a szem is jelentős mértékben hozzájárulhat a vér melatonin tartalmához.

Az indolaminok metabolizmusa alapvetően két nagyobb területre osztható. Az első a szerotonin szintézise triptofánból, a második a szerotonin átalakítása melatoninná és deaminált termékekké. A melatonin szintézis enzimei közül egyedülálló az arilalkilamin-N-acetiltransferáz (AA-NAT) mivel a napszaktól függő robosztus aktivitás változást mutató AA-NAT bizonyult a melatonin szintézis kulcsenzimének emlősökben.

A melatonin szintek AA-NAT szintektől vagy aktivitásától való függése felveti annak a lehetőségét, hogy a biológiai óra a cirkadián rendszer kimenetét jelentő melatonin termelését az AA-NAT enzimen keresztül befolyásolja. Az elsődleges cirkadián oszcillátor emlősök esetében az SCN-ban helyezkedik el és csak közvetve, a tobozmirigyvet beidegző noradrenerg rostok révén befolyásolja az AA-NAT aktivitását. Madarak tobozmirigy sejtjei azonban rendelkeznek elsődleges cirkadián oszcillátorral, amely madarak esetében így közvetlenül befolyásolhatja az AA-NAT fehérje aktivitását. Mivel a cirkadián oszcillátor alkotóelemei transzkripciósfaktorok, ezért lehetőség lenne arra is, hogy az *Aa-nat* génről történő átírást az óra közvetlenül szabályozza. Ez egyben azt is jelentené, hogy az *Aa-nat* gén, egy az óra által közvetlenül kontrollált gén (*Ókg*).

2. Célkitűzések:

1. Korábbi, emlősökön elvégzett kísérletek már igazolták, hogy a *Bmall* és *Clock* gének fontos szerepet játszanak az AA-NAT aktivitás éjszakai növekedésében, de kevés adat áll rendelkezésre ezen gének expressziójának mintázatáról normál külső megvilágítási viszonyok között madarakban. Ezért jelen munkánkban először ezen gének ciklikus cirkadián aktivitását vizsgáltuk az eddig leirtaknál precízebb, két óránkénti felbontásban.
2. Kísérleteink tisztázni kívánták továbbá, hogy van-e különbség a *cBmall*, *cClock* és *cAa-nat* gének expressziójának napszaki változásában ugyanazon állat tobozmirigyében és retinájában a környezetével megegyező megvilágítási viszonyok között.
3. Az *in vivo* vizsgálatok eredményétől függően *in vitro* rendszerben szerettük volna bizonyítani a cirkadián expressziót mutató gének szerepét a melatonin szintézisében. Ehhez először egy szuperfúziós rendszert fejlesztettünk ki, amelyben az óragének kiiktatásával a *cAa-nat* gének mint a melatonin szintézis kulcsenzimének és egyben feltételezett *Ókg*-nek az expressziójában és a következményes melatonin szekrécióban bekövetkezett változásokat vizsgáltuk. Az óragének szerepének kiiktatását *locked* nukleinsav tartalmú antiszensz oligonukleotidokkal (LNS tartalmú AON-okkal) kívántuk elérni.

3. Módszertan

3.1. Vegyszerek

A kísérleteinkhez szükséges vegyszereket, hacsak azt másképp nem jelöltük, a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be.

3.2. LNS tartalmú AON-ok

Kétfajta, a *cBmall* translációs start kodonját is magába foglaló, a *cBmall* mRNS 5'-végéhez közeli fragmentumával komplementer LNS tartalmú AON-ot terveztünk, majd szintetizáltattunk a Proligoval (Boulder, CO), amelyek egyike RNáz H-t indukáló hatású (LNS/DNS/LNS gapmer), míg a másik a translációs komplex kialakulását blokkolja (LNS/DNS mixmer). Kontrollként MQ vizet és inverz LNS tartalmú AON-okat használtunk.

3.3. Kísérleti állatok

Három hetes csirkéket (*Gallus domesticus*) egy helyi csirkefarmról (Reménypuszta) szereztük be, amelyeket aztán legalább két hétig, az évszaknak megfelelő napi 14 órán át világosban és 10 órán át sötétben tartottuk (LD 14/10, ahol a világos periódus ZT 0-tól ZT 14-ig tartott). *In vivo* kísérleteink során a második hét utáni első napon két óránként 3-3 csirkéből kivettük a retinát és a tobozmirigyét, amelyeket rögtön homogenizáltuk jégen tárolt Tri Reagentben. A mintákat ezt követően -70 °C-on tároltuk további feldolgozásukig.

Az *in vitro* szuperfúziós kísérletekhez négy állatot dekapitáltunk ZT 5-kor.

Állatkísérleteinket a megfelelő nemzetközi irányelvek figyelembe vételével végeztük (European Communities Council Directive of 24 november 1986 (86/609/EEC)).

3.4. Transzfekció szuperfúziós rendszerben

Disszociált tobozmirigy sejtek szuperfúziójához egy korábban már részletesen leírt szuperfúziós rendszert használtunk néhány módosítással (*Rekasi és mtsai, 1991*). Huszonnégy órás nyugalmi periódust követően ZT 6-kor 60 percre a tenyésztő médiumot marha szérum albumint és antibiotikumokat nem tartalmazó OPTI-MEM I-re cseréltük, majd a tobozmirigy sejteket négy órán át ZT 7 és ZT 10 között a gyártó utasításainak megfelelően Oligofectamine-nal (Invitrogen) transzfektáltuk. Kontrollként a *cBmall*-gyel nem komplementer, inverz LNS-t is tartalmazó AON-ok keverékét és MQ vizet használtunk. A dinamikus sejt kultúrákat napi LD 14/10 megvilágításban tartottuk, amikor is a megvilágítás kezdete ZT 0-ra esett, és ezen fényviszonyokat a transzfekciós kísérletek végéig nem változtattuk meg. Az oszlopban található sejteket 1 mL TRI Reagent infúziójával lizáltuk a korábban már kidolgozott módszer szerint (*Rekasi és Czompoly, 2002*) a második LD ciklus minden 4. órájában vagy a transzfekciós kísérlet végén, azaz a negyedik LD ciklus ZT 17. órájában. A lizált sejteket steril Eppendorf csövekbe gyűjtöttük és -70 °C-on tároltuk teljes RNS tartalmuk későbbi extrakciójáig. Minden egyes kísérleti protokollt három szuperfúziós kísérletben ismételtünk meg. A transzfekciós reagensek lehetséges nem-specifikus citotoxikus hatását a sérült sejtek citoszólójából felszabaduló laktát-dehidrogenáz enzim aktivitásának mérésével végeztük az e célra kifejlesztett „Cytotoxicity Detection Kit” (Roche, Mannheim, Németország) segítségével a gyártó utasításai szerint.

3.5. mRNS szintek mennyiségi vizsgálata

Kísérleteink során a génexpresszió változásait szemikvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakcióval (RT-PCR-ral) követtük, úgy ahogy azt már korábban leírtuk. (*Toller és mtsai, 2006*)

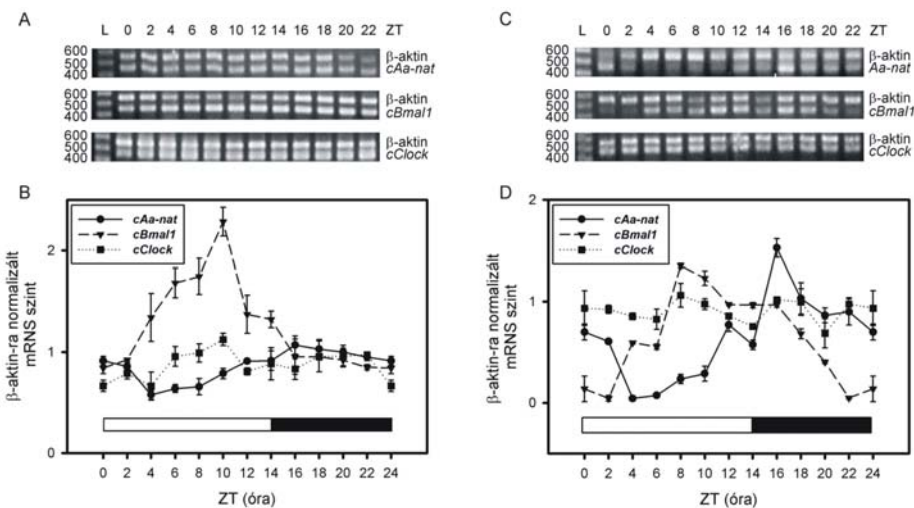
3.6. Melatonin RIA

A szuperfúzió során gyűjtött minták melatonin tartalmát az intézetünkben korábban kifejlesztett melatonin RIA-vel mértük (minta méret: 200µL) (*Rekasi és mtsai, 1991*).

4. Eredmények

4.1. A *cBmall*, *cClock* és a *cAa-nat* gének expressziójának időbeli változása csirke ideghártyában és tobozmirigyben *in vivo*

Csirke ideghártya és tobozmirigy *cBmall*, *cClock* és a *cAa-nat* mRNS-ek szintjét RT-PCR analízissel vizsgáltuk a kísérleti állatok két hétig történő, külső megvilágítási viszonyoknak (LD14/10) megfelelő tartása után (1. ábra). Mindkét szövetben, mindhárom géntermék mutatott többé-kevésbé detektálható napi fluktuációt. *cBmall* mRNS csúcserkékei ZT 8 és ZT 10 között voltak a tobozmirigyben illetve az ideghártyában megelőzve ezzel a *cAa-nat*, mindkét szövetben ZT 16-kor jelentkező csúcst. A tobozmirigy *cBmall* és *cAa-nat* mRNS-ek körülbelül 11-szer illetve 19-szer nagyobb amplitúóval ciklizáltak, mint ugyanabban az állatban a retinális megfelelőjük. A *cBmall* mRNS-ének cirkadián ritmicitása a retinában a tobozmirigyétől némileg eltérő időbeni profillal jelentkezett, ugyanis a retinális *cBmall* csúcserkékei gyorsabban lecsengtek. A fentiekkel szemben az ideghártya és a tobozmirigy *cClock* expressziók nem mutattak kifejezett ciklusos változást. Mindössze egy alacsony napi ingadozás volt észlelhető ZT 8 és ZT 10 között, továbbá ZT 16 és 18 között jelentkező csúcsokkal, amely csúcsok egybe estek a *cBmall* illetve a *cAa-nat* csúcsával mind a tobozmirigyben, mind az ideghártyában.



1. ábra. Csirke ideghártya és tobozmirigy *cAa-nat*, *cBmall* és *cClock* mRNS-ek expressziójának időbeli változása *in vivo* LD 14/10 megvilágítás mellett. Az állatokat a kísérlet előtt két hétig LD 14/10 fényviszonyok között tartottuk. A világos periódus kezdete Zeitgeber idő (Zeitgeber time, ZT) 0, ettől kezdve két óránként történt 3-3 állatból a mintavétel. Csirke (A) ideghártyából és (C) tobozmirigyből nyert multiplex RT-PCR termékek szeparációja agaróz gél elektroforézissel. L: 100-bp létra. Csirke (B) retinából és (D) tobozmirigyből származó *cAa-nat*, *cBmall* és *cClock* transzkriptumok relatív kvantitatív analízise. A vizsgált mRNS-ek szintjét az adott minta β -aktin mRNS szintjéhez normalizáltuk minden mintában. Az adott időpontokhoz tartozó relatív mRNS szintek átlagait \pm SEM három kísérleti állatból határoztuk meg, három egymástól független esszében. A ZT 24-hez tartozó érték a ZT 0-hoz tartozó eredmény ismételt bemutatása. A fekete és fehér csíkok a görbék alatt a sötét illetve a világos fázisokat szimbolizálják.

4.2. Csirke ideghártya és tobozmirigy melatonin szekréciójának, valamint a *cBmall*, *cClock* és *cAa-nat* gének expressziójának időbeli változása *in vitro*

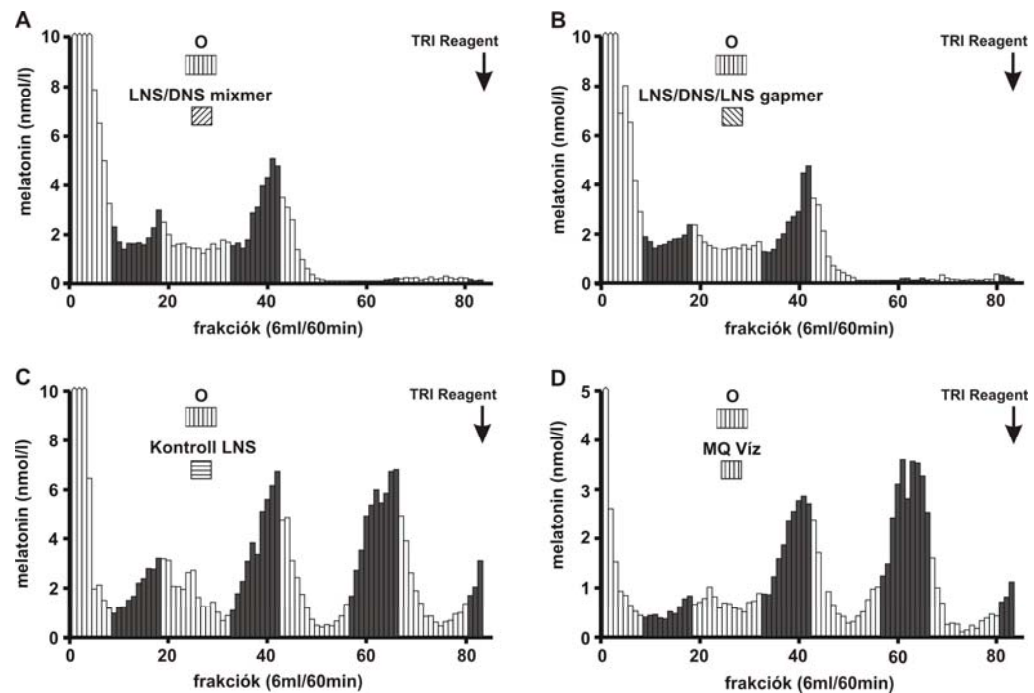
Csirke tobozmirigy vagy ideghártya szövetet 4 napig LD 14/10 megvilágítási viszonyok között tartottunk fenn szuperfúziós rendszerben. A gyűjtött médiumból a szekretált melatonin koncentrációját RIA-vel mértük. Diszpergált ideghártya sejtek szuperfúzióinak esetében a RIA módszer érzékenysége nem bizonyult megfelelőnek a melatonin koncentráció mérésére. Tobozmirigy sejtek szuperfúziói során a melatonin szint napi fluktuációja érzékelhető volt már az első (LD) ciklus alatt, azonban ennek amplitúdója alacsonyabb volt és fázisa megkésett a későbbi LD ciklusok idején detektált csúcsokhoz képest. A melatonin szekréció csúcsa a negyedik LD ciklus idejére igazodott teljesen a sötét periódushoz. Hogy eredményeink összehasonlíthatóak legyenek az *in vivo* eredményekkel, mindkét szövetből a harmadik LD ciklus után izoláltunk RNS-t RT-PCR analízisekhez. Retinában és tobozmirigyben mind a *cBmall*, mind a *cAa-nat* mRNS szintek kifejezett diurnális ritmust mutattak. Mindkét szövetben a *cBmall* szintek csúcspontjai körülbelül ZT 9-re estek, megelőzve a *cAa-nat* csúcspontját ZT 17-kor. A *cBmall* mRNS szintek amplitúdója 1,7 és 3,4-szeres volt az ideghártyában illetve a tobozmirigyben, míg a *cAa-nat* mRNA ritmus amplitúdója 2,4 és 4,6-szoros volt. Sem a retinában sem a tobozmirigyben nem detektáltuk a *cClock* mRNS ritmikus változását. Azonban a *cClock* ciklusos expresszióját nem zárhatjuk ki teljesen, mert egy alacsony amplitúdójú mRNS szint változás, körülbelül 35 % és 44% kimutatható volt ZT 9 körüli csúcspontokkal.

4.3. Csirke tobozmirigy diurnális *cBmall*, *cAa-nat* expressziójának és melatonin ritmusának meghatározása transzfekciós kísérletekhez

Ezen kísérletek során a csirke tobozmirigy szuperfúziója a 4.2. fejezetben leírtakhoz hasonlóan zajlott. A melatonin szekréció megegyezően a korábbi kísérletekkel alacsonyabb amplitúdóval és fázis késéssel jelentkezett az első LD ciklusban. Az LNS tartalmú AON-ok optimális beadási idejének meghatározásához a *cBmall* és *cAa-nat* génextpressziókat a második LD ciklusban ZT 2 és 22 között négy óránként határoztuk meg. A *cBmall* és a *cAa-nat* mRNS szintek - ZT 14-nél és ZT 18-nál jelentkező csúcspontokkal - kifejezett ritmicitást mutattak a második LD ciklus alatt is. A ritmusok amplitúdója 14,6-szoros volt a *cBmall* és 2,9-szeres a *cAa-nat* esetében. Ezért a transzfekciós kísérletek során a *cBmall* mRNS szintek csúcspontjai előtt, ZT 7 és ZT 10 között transzfektáltuk a pinealocitákat LNS tartalmú AON-kal. A sejteket végezettül „Tri Reagent”-tel lizáltuk, 55 órával a kísérlet megkezdése után a negyedik LD ciklusban ZT 17-kor, amikor is a megelőző kísérletekben mindkét vizsgált mRNS szintje elég magas volt.

4.4. Disszociált csirke tobozmirigy melatonin szekréciója *cBmall* ellen tervezett LNS tartalmú AON-kal történt transzfekció után

Csirke pinealocita szuperfúziókat a második LD ciklusban ZT 7 és ZT 10 között transzfektáltuk RNáz H-t aktiváló (LNS/DNS/LNS gapmer) vagy a transzlációs mechanizmust blokkoló (LNS/DNS mixmer) *cBmall* LNS tartalmú AON-okkal (2. ábra). Az LNS tartalmú AON-ok gátló hatása csak a harmadik LD ciklus sötét fázisában jelentkezett, ekkor mind az LNS/DNS/LNS gapmer, mind az LNS/DNS mixmer majdnem teljesen megszüntette a melatonin szekréciót. Ez a szignifikáns gátló hatás egészen a kísérletek végéig megmaradt, a negyedik LD ciklus ZT 17. órájáig. Ezzel szemben az LNS kontrolljaként szolgáló, nem komplementer szekvenciákat tartalmazó inverz LNS-nek, vagy az oldószerként használt MQ víznek csak elhanyagolható hatása volt.



2. ábra. *cBmall* ellen tervezett LNS tartalmú AON hatása disszociált csirke tobozmirigy sejteken. A pinealocitákat négy napon át tartottuk fenn a szuperfúziós rendszerben LD 14/10 megvilágításban, ahol Zeitgeber idő (Zeitgeber time, ZT) 0 a világos fázis kezdete. A sötét oszlopok a sötét fázist jelölik. A sejteken átáramló mediumot a második LD ciklusban ZT6 és ZT11 között BSA és antibiotikumok nélküli OPTI-MEM I-re cseréltük (O). A sejteket a második LD ciklusban ZT7 és ZT10 között 200 nM LNS tartalmú AON-kal áramoltattuk át. Az LNS tartalmú AON-ok úgy voltak megtervezve, hogy a (A) translációt gátolják (LNS/DNS mixmer), vagy (B) RNáz H-t indukáljanak (LNS/DNS/LNS gapmer). A kontroll kísérletekben vagy (C) *cBmall*-gyel nem-komplementer inverz LNS tartalmú AON-t (Kontroll LNS), vagy (D) MQ vizet használtunk. Teljes RNS izolálására a negyedik LD ciklusban a nyíllal jelzett időpontban „TRI Reagent” felhasználásával került sor.

4.5. Disszociált csirke tobozmirigy *cBmall* és *cAa-nat* expressziója *cBmall* ellen tervezett LNS tartalmú AON-kal történt transzfekció után

Mind az LNS/DNS/LNS gapmer, mind az LNS/DNS mixmer jelentősen csökkentette a *cAa-nat* gén expresszióját 70 % illetve 80 %-kal, míg a kontroll LNS vagy a MQ víz hatástalannak bizonyult. A *cBmall*-re tervezett LNS tartalmú AON-ok *cBmall* mRNS szintekre kifejtett hatását olyan RT-PCR-ral vizsgáltuk, amelyben a forward és a reverse primerek közrefogták az RNáz H feltételezett hasítási helyét is. A *cBmall* mRNS szintet csak az LNS/DNS/LNS gapmerrel történő transzfekció csökkentette 44%-kal, míg az LNS/DNS mixmernek vagy a kontroll LNS-nek nem volt szignifikáns hatása.

5. Az eredmények értékelése

1. Kísérleteink igazolták, összhangban más kutatók irodalmi adataival, hogy a csirke tobozmirigyben és retinában mind *in vitro* és *in vivo* a *cBmall* és *cAa-nat* gének expressziója napszaki ritmussal változik a külső környezetének megfelelő megvilágítási viszonyok között. A *cBmall* mRNS szintek napi maximuma a környezetének megfelelő megvilágítási viszonyok közt megelőzi a *cAa-nat* mRNS szintek napi csúcsát. A *cClock* mRNS szintek jelentős diurnális ritmust nem mutattak.
2. Vizsgálataink igazolták, hogy a tobozmirigy és az ideghártya esetében a *cBmall* mRNS szintek zenitje és nadírja a két szervben megközelítőleg egy időpontra esik. A legmagasabb és a legalacsonyabb *cAa-nat* mRNS szintek ideje szintén megegyeznek a tobozmirigyben és az ideghártyában.
3. Csirke tobozmirigy sejtek a szuperfúziós rendszerben megtartják azon képességüket, hogy napi ritmussal szekretálnak melatonint, ami arra utal, hogy a csirke tobozmirigy melatonin termelését egy endogén oszcillátor tartja fenn a szerv denervációja után is. A ritmikus melatonin szekréció hátterében feltehetőleg a *cBmall* és *cAa-nat* mRNS-ek szintén megtartott ritmikus expressziója áll. A génexpressziók dinamikája arra utal, hogy a *cBmall* mRNS szerepet játszik a *cAa-nat* expressziójában.
4. Az *in vitro* melatonin elválasztás fokozatos szinkronizációja a környezeti fényviszonyokhoz igazolja, hogy a csirke tobozmirigy még rendelkezik funkcionális fotoreceptorokkal.
5. A tobozmirigy sejtek *cBmall* mRNS-ről történő transzlációjának gátlása a *cAa-nat* mRNS és a melatonin szintek következményes csökkenésével járt *in vitro*. Ez a megfigyelés kiegészítve azokkal az eredményeinkkel, melyek szerint magasabb *cBmall* mRNS szintek időben megelőzik a *cAa-nat* mRNS szintek emelkedésének kezdetét, azt sugallja, hogy a *cAa-nat* mRNS szintek a *cBmall* mRNS-ről transzlálódó fehérje szabályozása alatt állnak. Ennek értelmében a *cAa-nat* gén egy *Ókg* és a cirkadián melatonin termelésért a biológiai óra felelős.
6. Elsőként végeztünk transzfekciót szuperfúziós rendszerben. Tapasztalataink szerint az LNS tartalmú AON-kal történő transzfekció nem toxikus a szuperfúziós rendszerben fenntartott szövetekre. Megfigyeléseink alapján az LNS tartalmú AON-okkal történő transzfekció alkalmas lehet más endokrin szervek szuperfúziós rendszerben történő vizsgálatára.

Irodalomjegyzék

- [1.] Bailey, M.J., Beremand, P.D., Hammer, R., Bell-Pedersen, D., Thomas, T.L., és Cassone, V.M. (2003) Transcriptional profiling of the chick pineal gland, a photoreceptive circadian oscillator and pacemaker *Molecular Endocrinology* **17**: 2084-2095.
- [2.] Bailey, M.J., Beremand, P.D., Hammer, R., Reidel, E., Thomas, T.L., és Cassone, V.M. (2004) Transcriptional profiling of circadian patterns of mRNA expression in the chick retina *Journal of Biological Chemistry* **273**: 52247-52254.

- [3.] Bernard, M., Iuvone, M.P., Cassone, V.M., Roseboom, P.H., Coon, S.L., és Klein, D.C. (1997a) Avian melatonin synthesis: photic and circadian regulation of serotonin N-Acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina *Journal of Neurochemistry* **68**: 213-214.
- [4.] Bernard, M., Klein, D.C., és Zatz, M. (1997b) Chick pineal clock regulates serotonin N-acetyltransferase mRNA rhythm in culture *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* **94**: 304-309.
- [5.] Bernard, M., Guerlotte, J., Greve, P., Grechez-Cassiau, A., Iuvone, M.P., Zatz, M., Chong, N.W., Klein, D.C., és Voisin, P. (1999) Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina *Reproduction Nutrition Development* **39**: 325-334.
- [6.] Braasch, A.D., Liu, Y., és Corey, D.R. (2002) Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design *Nucleic Acid Research* **30**: 5160-5167.
- [7.] Braasch, D.A. és Corey, D.R. (2001) Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA *Chemistry and Biology* **8**: 1-7.
- [8.] Cantwell, E.L. és Cassone, V.M. (2006) Chicken suprachiasmatic nuclei: I. efferent and afferent connections *Journal of Comparative Neurology* **496**: 97-120.
- [9.] Cassone, V.M. és Moore, R.Y. (1987) Retinohypothalamic projection and suprachiasmatic nucleus of the house sparrow, *Passer domesticus* *Journal of Comparative Neurology* **266**: 171-182.
- [10.] Chong, N.W., Bernard, M., és Klein, D.C. (2000) Characterization of the chicken serotonin N-acetyltransferase gene *Journal of Biological Chemistry* **275**: 32991-32998.
- [11.] Csernus, V., Faluhelyi, N., és Nagy, A. (2005) Features of the circadian clock in the avian pineal gland *Annals of the New York Academy of Sciences* **1040**: 281-287.
- [12.] Deguchi, T. (1979) A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland *Nature* **282**: 94-96.
- [13.] Dias, N. és Stein, C.A. (2002) Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms *Molecular Cancer Therapeutics* **1**: 347-355.
- [14.] Dunlap, J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks *Cell* **96**: 271-290.
- [15.] Falcón, J. (1999) Cellular circadian clocks in the pineal *Progress in Neurobiology* **58**: 121-162.
- [16.] Iuvone, M.P., Chong, N.W., Bernard, M., Brown, A.D., Thomas, K.B., és Klein, D.C. Melatonin biosynthesis in chicken retina, in: *Melatonin after four decades* (2000) ed.by: Olcese, J. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York
- [17.] King, D.P. és Takahashi, J.S. (2000) Molecular genetics of circadian rhythms in mammals *Annual Review of Neuroscience* **23**: 713-742.
- [18.] Klein, D.C., Auerbach, D.A., Namboodiri, M.A.A., és Wheler, G.H.T. Indole metabolism in the mammalian pineal gland, in: *The pineal gland* (1981) ed.by: Reiter, R.J. CRC Press, Boca Raton
- [19.] Loudon, A.S.I., Semikhodskii, A.G., és Crosthwaite, S.K. (2000) A brief history of circadian time *Trends in Genetics* **16**: 477-481.
- [20.] Mess, B., Rekasi, Z., Gosh, M., és Csernus, V. (1996) Regulation of pineal melatonin secretion: Comparison between mammals and birds *Acta Biologica Hungarica* **47**: 313-322.
- [21.] Moore, R.Y. (1996) Neural control of the pineal gland *Behavioural Brain Research* **73**: 125-130.
- [22.] Natesan, A., Greetha, L., és Zatz, M. (2002) Rhythm and soul in the avian pineal *Cell and Tissue Research* **309**: 35-45.
- [23.] Rekasi, Z., Csernus, V., Horvath, J., Vigh, S., és Mess, B. (1991) Long-term dynamic in vitro system for investigating rat pineal melatonin secretion *Journal of Neuroendocrinology* **3**: 563-568.

- [24.] Rekasi, Z. és Czompoly, T. (2002) Accumulation of rat pineal serotonin N-acetyltransferase mRNA induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide *in vitro Journal of Molecular Endocrinology* **28**: 19-31.
- [25.] Rekasi, Z., Horvath, R.A., Klausz, B., Nagy, E., és Toller, G.L. (2006) Suppression of serotonin N-acetyltransferase transcription and melatonin secretion from chicken pinealocytes transfected with *Bmal1* antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid in superfusion system *Molecular and Cellular Endocrinology* **249**: 84-91.
- [26.] Robertson, L.M. és Takahashi, J.S. (1988a) Circadian clock in cell culture: I. Oscillation of melatonin release from dissociated chick pineal cells in flow-through microcarrier culture *Journal of Neuroscience* **8**: 12-21.
- [27.] Robertson, L.M. és Takahashi, J.S. (1988b) Circadian clock in cell culture: II. *In vitro* photic entrainment of melatonin oscillation from dissociated pineal cells *Journal of Neuroscience* **8**: 22-30.
- [28.] Toller, G.L., Nagy, E., Horvath, R.A., Klausz, B., és Rekasi, Z. (2006) Circadian expression of *Bmal1* and serotonin-N-acetyltransferase mRNAs in chicken retina cells and pinealocytes *in vivo and in vitro Journal of Molecular Neuroscience* **28**: 143-150.
- [29.] Vigh, B., Manzano, M.J., Frank, C.L., David, C., Lukáts, Á., és Szél, Á. Change in the control of the biological circadian rhythms during the evolution. The role of the deep brain photoreceptors, pineal organs and retina, in: *Rhythmic biological processes* (2003) ed.by: Csernus, V. és Mess, B. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs
- [30.] Yasuo, S., Watanabe, M., Okabayashi, N., Ebihara, S., és Yoshimura, T. (2003) Circadian clock genes and photoperiodism: comprehensive analysis of clock gene expression in the mediobasal hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus and the pineal gland of the Japanese quail under various light schedules *Endocrinology* **144**: 3742-3748.

A disszertációhoz kapcsolódó különnyomatok jegyzéke

Rekasi Z., Horvath R.A., Klausz B., Nagy E., Toller G.L. (2006) Suppression of serotonin N-acetyltransferase transcription and melatonin secretion from chicken pinealocytes transfected with *Bmal1* antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid in superfusion system *Molecular and Cellular Endocrinology* **249**: 84-91.
IF.: 2,918

Toller G.L., Nagy E., Horvath R.A., Klausz B., Rekasi Z. (2006) Circadian expression of *Bmal1* and serotonin-N-acetyltransferase mRNAs in chicken retina cells and pinealocytes *in vivo and in vitro Journal of Molecular Neuroscience* **28**:143-50.
IF.: 2,965

A disszertációhoz kapcsolódó konferenciái szereplések jegyzéke

Rekasi Z., Toller G. (2002) A környezeti fényviszonyok hatása a *Bmal1*, Clock és serotonin N-acetyltransferáz génexpresszió circadian ritmusára csirke retinában és tobozmirigyben *Orvosi Hetilap* **143. Suppl. 1**: 992-993.

Rekasi Z., Toller G. (2003) Circadian expression of *Bmal1*-Clock and serotonin N-acetyltransferase transcripts in chicken retina cells and pinealocytes *Clinical Neuroscience* **56. Suppl. 2**. 75.

Rekasi Z., Toller G., Nagy E., Horvath R. (2004) A fényviszonyok hatása a circadian órára csirke tobozmirigyben *Orvosi Hetilap* **145. Suppl. 3**: 1102-1103.

Rekasi Z., Horvath R., Kosi L., Klausz B., Nagy E., Toller G. (2005) Transfection experiments using antisense locked nucleic acids to study the effect of Bmal1 clock gene on melatonin secretion in superfusion system. *Clinical Neuroscience* **58 Suppl 1**: 80.

Rekasi, Z., Horvath, R., Klausz, B., Kosi, L., Nagy, E., Toller, G. Transfection experiments using antisense locked nucleic acids to study the effect of Bmal1 clock gene on melatonin secretion in superfusion system. - *X. Congress of European Pineal and Biological Rhythms Society*, Frankfurt/Main, Germany, September 01-05, 2005.

Toller G., Rekasi Z. Circadian expression of Bmal1-Clock and serotonin N-acetyltransferase transcripts in chicken retina cells and pinealocytes. *IBRO International Workshop on Signalling Mechanisms in the Central and Peripheral Nervous System*, Debrecen, Hungary, January 24-26, 2002.

Toller G., Rekasi Z. Effect of constant light and darkness on the expression of cBmal1-Clock and serotonin N-acetyltransferase transcripts in chicken retina cells and pinealocytes. *IXth Symposium of the European Pineal and Biological Rhythms Society*, Aberdeen, Scotland, July18-22, 2002.

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények jegyzéke

Engel J. B., Keller G., Schally A.V., Toller G.L., Groot K., Havt A., Armatis P., Zarandi M., Varga J.L., Halmos G. (2005) Inhibition of growth of experimental human endometrial cancer by an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**: 3614-3621.
IF: 6,020

Havt A., Schally A.V., Halmos G., Varga J.L., Toller G.L., Horvath J.E., Szepeshazi K., Koster F., Kovitz K., Groot K., Zarandi M., Kanashiro C.A. (2005) The expression of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its splice variants in normal and neoplastic human tissues. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* **102**: 17424-17429.
IF.: 10,231

Horvath J. E., Toller G.L., Schally A.V., Bajo A.-M., Groot K.(2004) Effect of long-term treatment with low doses of the LHRH antagonist Cetrorelix on pituitary receptors for LHRH and gonadal axis in male and female rats *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* **101**: 4996-5001.
IF.: 10,452

Keller G., Schally A.V., Groot K., Toller G.L., Havt A., Koster F., Armatis P., Halmos G., Zarandi M., Varga J.L., Engel J.B. (2005) Effective treatment of experimental human non-Hodgkin's lymphomas with antagonists of growth hormone-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* **102**: 10628-10633.
IF.: 10,231

Toller G. L., Horvath J.E., Schally A.V., Halmos G., Varga J.L., Groot K., Chism D., Zarandi M. (2004) Development of a new polyclonal antiserum for the detection of the isoforms of the

receptors for human growth hormone-releasing hormone on tumors. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* **101**: 15160-15165.
IF.: 10,452

Varga J. L., Schally A.V., Horvath J.E., Kovacs M., Halmos G., Groot K., Toller G.L., Rekasi Z., Zarandi M. (2004) Increased activity of antagonists of growth hormone-releasing hormone substituted at positions 8,9, and 10 *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* **101**: 1708-1713.
IF.: 10,452

Zarandi M., Varga J.L., Schally A.V., Horvath J.E., Toller G.L., Kovacs M., Letsch M., Groot K., Armatis P., Halmos G. (2006) Lipopeptide antagonists of growth hormone-releasing hormone with improved antitumor activities *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* **103**: 4610-4615.
IF.: 9,643

Köszönetnyilvánítás

Kutatásaim szakmai irányításáért és ezen dolgozat elkészítéséhez nyújtott segítségért ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Rékási Zoltánnak, Dr. Sétáló György és Dr. Csernus Valér a Neuroendokrinológia és neurohisztológia Doktori Program vezetőiként, valamint az Anatómia Intézet vezetőiként támogatták kutatói munkámat. Köszönet illeti Nagy Enikót a PCR-ok és a szuperfúziók, Mercz Tündét és Végi Gabriellát pedig a melatonin RIA-k kivitelezésében nyújtott segítségükért. Köszönöm továbbá Horváth Réka és Klausz Barbara Tudományos Diákkörös Hallgatók az ebben a dolgozatban leírt tudományos munkához nyújtott lelkes segítségét.