

## 1. *BMAL1*, *CLOCK* ÉS *AA-NAT* GÉNEK CIRKADIÁN EXPRESSZIÓS MINTÁZATÁNAK VIZSGÁLATA *IN VIVO* CSIRKE RETINÁBAN ÉS TOBOZMIRIGYBEN

A pályázatban előírt feladatok közül elsőként saját tervezésű primerekkel sikeresen beállítottuk a csirke *Bmal1*, *Clock* és *AA-NAT* mRNS szintek kvantitatív mérésére alkalmas RT-multiplex PCR módszerünket. Ezt követően 1 hétig 14 óra fény/10 óra sötét periódusban (Zeitgeber idő /ZT/ szerint 0 és 14 óra között volt a fény periódus, reggel 6 órától kezdődően) tartott 3-6 hetes csirkék retinájából és tobozmirigyéből 24 óra alatt 2 órás időközönként total RNS-t izoláltunk, majd elvégeztük a fentiekben említett gének expressziós mintázatának kvantitatív analízisét. Eredményeink szerint a *cBmal1* mRNS szint cirkadián ingadozást mutatott mindkét szervben, melynek maximuma ZT 8 és ZT 10 közé esett megelőzve az *cAA-NAT* expresszió csúcsát (ZT 16). A *cBmal1* és *cAA-NAT* mRNS szintek napi változása kb. 10-szer nagyobb volt a tobozmirigyben, mint a retinában. A *cClock* gén expressziója nem mutatott jól detektálható ritmicitást sem a retinában, sem a tobozmirigyben. Az 1 napra konstans sötétbe vagy világosba helyezett csirke retinájában és tobozmirigyében nem változott a *cBmal1* és *cAA-NAT* expressziók időbeli lefolyása, ugyanakkor 1 hét múlva az *cAA-NAT* gén expressziós mintázata eltolódott, míg a *cBmal1* gén aktivitása nem mutatott jelentős változást a normál megvilágításban tartottakhoz képest. Eredményeink szerint az óragének mellett a környezeti fényviszonyok is szerepet játszanak az *cAA-NAT* génexpresszió szabályozásában. A témakörből egy nemzetközi folyóiratban publikált közlemény és két citálható előadás absztrakt jelent meg: Toller G. L. és mtsai., *J. Mol. Neurosci.*, 28: 143-150, 2006; Rekasi Z. és Toller G., *Clinical Neuroscience*, 56(S2): 74, 2003; Rekasi Z. és mtsai., *Orvosi Hetilap*, 145(S3), 1102-1103, 2004.

## 2. *cBMALI* ÉS *CAA-NAT* GÉNEK CIRKADIÁN EXPRESSZIÓS MINTÁZATÁNAK VIZSGÁLATA *IN VITRO* CSIRKE RETINÁBAN ÉS TOBOZMIRIGYBEN

Az előző OTKA pályázatunk során kifejlesztett, szuperfúziós rendszerben tartott sejtekből történő RNS izolálási technikát alkalmaztuk csirke retina és tobozmirigy sejtek génexpressziós mintázatának mérésére kombinálva egy másik korábbi OTKA pályázatunkban beállított melatonin (MT) radioimmunosassay-vel. A túlélő tenyészetben 10 óra fény/14 óra sötét (ZT szerint 0 és 10 óra között volt fény periódus reggel 7 órától kezdődően) periódusban tartott tobozmirigy sejtek MT szekréciója diurnális ingadozást mutatott a sötét periódus közepén ZT 17 körüli maximummal, mely egybeesett az *CAA-NAT* génexpresszió időbeli csúcsával. A *cBmall* mRNS szint viszont már ZT 8 körül elérte maximális értéket, majd csökkenni kezdett. Hasonló dinamikát kaptunk a retina sejtek diurnális génexpresszióját illetően is a vizsgált génekre nézve, azonban kisebb mértékű ingadozást láttunk a tobozmirigyben tapasztaltakhoz képest. A retina sejtek MT szekréciójának szuperfúziós rendszerből való mérése azonban előre nem várt metodikai nehézségekbe ütközött a rendkívül alacsony MT szekréció miatt (a retina sejtek MT szekréciója *in vitro* 10-30x kisebbnek bizonyult, mint *in vivo*, melyről nem állt irodalmi adat rendelkezésünkre előtte), ezért csak a több retina sejtet tartalmazható statikus szövettenyésztő rendszerből mértünk sikerrel MT szekréciót. Eredményeink arra utaltak, hogy a *cBmall* gén terméke jelentős szerepet játszhat az *CAA-NAT* expresszió szabályozásában, így további transzfekciós antisense kísérleteinket ez irányban terveztük. A témakörből egy nemzetközi folyóiratban megjelent publikáció készült: Toller G. L. és mtsai., *J. Mol. Neurosci.*, 28: 143-150, 2006.

### 3. TRANSZFEKCIÓS KÍSÉRLETEK ANTISENSE LOCKED NUKLEINSAV TARTALMÚ OLIGONUKLEOTIDOKKAL A *cBMAL1* ÓRAGÉN MELATONIN SZEKRECIÓRA KIFEJTETT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATÁRA SZUPERFÚZIÓS RENDSZERBEN

A madarak retina és tobozmirigy sejtjei, a pinealociták pacemaker (óragén) aktivitással és fényérzékeny receptorral rendelkeznek, melyekből éjszaka MT szabadul fel a környezeti fényviszonyok sötét fázisának hormonális manifesztációjaként. Korábbi vizsgálataink szerint az óragének közül a *cBmall* cirkadián mintázattal együtt expresszálódik retina sejtekben és pinealocitákban az MT szekréció kulcsenzimével, a szerotonin-N-acetiltransferázzal (*cAA-NAT*), valamint a BMAL1 transzkripció faktor kötőhelye megtalálható az *cAA-NAT* gén promoterében. Kevésbé tisztázott, hogy a *cBmall* óragén milyen szerepet játszik az *cAA-NAT* génexpresszió szabályozásában. Kísérleteinkben két antisense, a *cBmall* mRNS start kodonját magába foglaló locked nukleinsav (LNS) tartalmú oligonukleotiddal transzfektáltunk csirke pinealocitákat szuperfúziós rendszerben, majd 54 órán keresztül monitoroztuk az MT szekréciót, illetve a végén megmértük a *cBmall* és *cAA-NAT* mRNS szinteket RT-multiplex PCR segítségével. Eredményeink szerint mind az RNáz H aktivitás indukálására, mind a translációs masinéria blokkolására tervezett antisense LNS tartalmú oligonukleotid szignifikánsan redukálta az MT szekréciót, míg az invert szerkezetű, a csirke *cBmall* mRNS-sel nem komplementer LNS tartalmú oligonukleotidok nem okoztak lényegi változást. Mindkét antisense LNS tartalmú oligonukleotid jelentősen gátolta az *cAA-NAT* expresszióját, de csak az RNáz H aktivitást indukáló LNS tartalmú oligonukleotid volt képes csökkenteni a *cBmall* mRNS szintjét. Adataink bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a *cBmall* óragén

(és feltehetően fehérje terméke, a cBMAL1) serkentő hatású az *cAA-NAT* génexpressziójára és a következményes MT szekréción. Elsőként alkalmaztunk szuperfúziós rendszert transzfekciós kísérletekben, melyben minimalizálható a transzfekciós elegy toxicitása, és folyamatosan monitorizálható a transzfekció hatékonysága. Reményeink szerint a szuperfúziós rendszerben más endokrin szöveteken is sikerrel lehet transzfekciót elvégezni, viszont sajnálatos módon a retina sejtek alacsony MT szekréciónja miatt az MT monitorozása lehetetlen volt szuperfúziós rendszerből. Eredményeinket ezért tobozmirigy sejtek transzfekciójával értük el szuperfúziós rendszerben, de a korábbi adataink alapján valószínűsíthető, hogy a retinasejtekben is hasonló szabályozó mechanizmus létezik az endogén órát tekintve. A témakörből egy nemzetközi folyóiratban publikált közlemény és egy citálható előadás absztrakt jelent meg: Rekasi Z. és mtsai., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 249: 84-91, 2006; Rekasi Z. és mtsai., *Clinical Neuroscience*, 58(S1): 80, 2005A.

#### **4. A DOPAMIN A D2-RECEPTORCSALÁDON KERESZTÜL GÁTOLJA AZ ÉJSZAKAI MELATONIN SZEKRÉCIÓJÁT CSIRKE RETINÁBAN**

A gerincesek retinájában a dopamin (DA) a legfontosabb katekolamin, ahol neuroregulátor/neurotranszmitter szerepe van. A madarak retinájában - hasonlóan a tobozmirigyhez, összegződik a pacemaker (óragén) aktivitás és a photoreceptor funkció, melynek következtében a környezeti fényviszonyok hormonális jellé alakulnak át, mely a sötét fázisban termelődő MT formájában nyilvánul meg. Feltételezések szerint a retinális MT lokális neuromodulátorként hat a retina dopaminerg neurotranszmisszióját gátolva. Kevésbé ismert azonban, hogy a DA

befolyásolja-e az MT szekrécióját, és mely receptorokon keresztül. Kísérleteinkben egyrészt megvizsgáltuk a retinális MT szekréció kulcsenzimének, a *cAA-NAT* circadián génexpressziós mintázatát *in vivo*, összehasonlítva ugyanazon állat tobozmirigyével. Másrészt ú.n. eye-cup modellen tanulmányoztuk a két nagy DA-receptorcsalád (D1 és D2) szerepét a circadián MT ritmus szabályozásában *in vitro*. Az *cAA-NAT* génexpresszió mértékét 2 óránként vett mintákból RT-multiplex PCR-rel határoztuk meg, míg az MT szinteket radioimmunoassay-vel mértük a szövettenyésztő médiumból. Eredményeink szerint a retinális *cAA-NAT* expresszió diurnális ritmicitást mutat, melynek maximuma a sötét fázis kezdete után 2 órával jelentkezik, hasonlóan a tobozmirigyhez, és a világos fázis értékéhez képest 3-szoros emelkedést mutat. *In vitro* körülmények között az MT szekréció a sötét fázisban kb. 1.8-szorosa a világos fázis értékeinek. A D2-receptorcsalád agonista quinpirol (1  $\mu$ M) szignifikánsan csökkentette a sötét fázisban tapasztalható MT szekréció emelkedést ( $P < 0.05$ ), míg nem befolyásolta a nappali MT szekréció mértékét. A D1-receptorcsalád agonista SKF 38393 (1  $\mu$ M) hatástalannak bizonyult az MT szekrécióra mind sötét, mind világos fázisban. Adataink alapján a csirke retinájában a DA gátló hatást fejt ki az MT szekrécióra (kölcsonös negatív feed-back), mely elsősorban a D2-receptorcsaládon keresztül érvényesül. A témából egy idézhető előadás kivonat jelent meg: Rekasi Z. és mtsai., *Clinical Neuroscience*, 58(S1): 80, 2005B.

## **5. AZ ÓRAGÉNEK EXPRESSZIÓJA CSIRKE NUCLEUS SUPRACHIASMATICUS NEURONJAIBAN**

A pályázat utolsó évében a madarak belső órájának harmadik komponensét, a hipotalamikus nucleus suprachiasmaticus (SCN) génexpressziós mintázatát kezdtük el vizsgálni. Ehhez először a Palkovits professzortól elsajátított punching technikával (a punching tű ugyancsak Palkovits professzor adománya volt) mintát gyűjtöttünk 1 hétig 14 óra fény/10 óra sötét periódusban (fény kezdete reggel 6 órakor) tartott 3-6 hetes csirkék hipotalamuszából 24 óra alatt 2 órás időközönként, majd total RNS-t izoláltunk. A fentiekben említett gének expressziós mintázatának kvantitatív analízise, és a többi oszcillátor központ SCN-re való hatásának vizsgálata azonban még folyamatban van, mert a pályázat pénzkeretének csökkentésével nem állt megfelelő molekuláris biológiai kit rendelkezésünkre a vizsgálatok elvégzéséhez.

## **6. GHRH ANTAGONISTÁK RECEPTOR SPECIFIKUS HATÁSAINAK TESZTELÉSE DISZPERGÁLT TOBOZMIRIGYSEJTEKEN**

Hasonlóan korábbi vizsgálatainkhoz (Rékási és mtsai PNAS, 2000) a pályázatban szereplő diszpergált tobozmirigysejtek túlélő tenyészetét használhattuk az antiproliferatív GHRH antagonisták endokrin hatásának karakterizálására is. A tobozmirigysejtek ugyanis VPAC1 receptort expresszálnak, így az antagonisták VIP-szerű hatásai jól tesztelhetők a szuperfúziós rendszerben, melyek hasznosíthatók voltak human prosztata daganatsejtvonal proliferációjának gátlásában is. Ezen eredményeinket felhasználtuk egy nemzetközi közleményben és két idézhető előadás kivonatban, melyekben így feltüntettük az OTKA grant számát: Rekasi Z., és mtsai., *PNAS*, 102: 3435-3440, 2005; Rekasi és mtsai., *Tissue Antigens*, 64: 391. 2004; Rekasi Z. és mtsai., *Magyar Belorvosi Archivum*, Supplementum 2006/1: 62, 2006.