

# 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

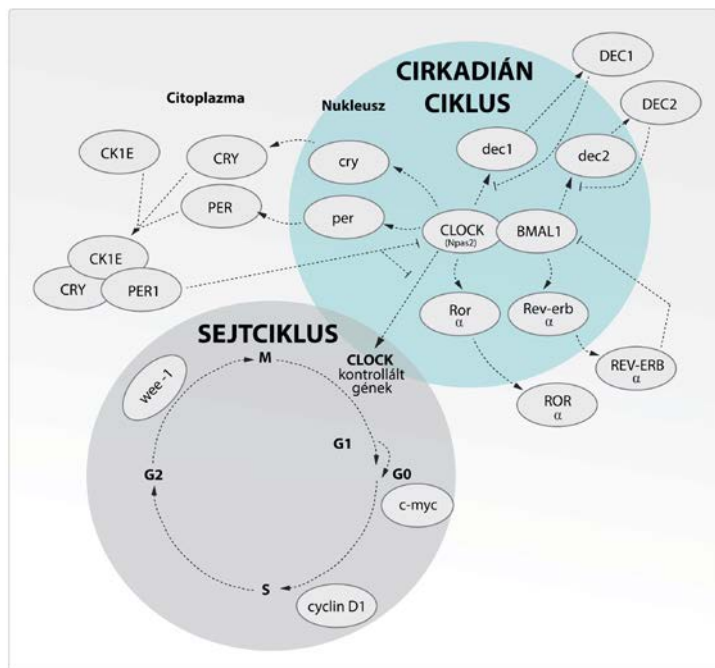
Pécs

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 sejtmétabolizmus 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<sup>-/-</sup>Cry2<sup>-/-</sup></i> egerek	SCN ablációt követően a bőr óragének oszcillációja megszűnik.
2009.07.	C57BL6 vad típusú, <i>Clock<sup>-/-</sup></i> , és <i>Bmal1<sup>-/-</sup></i> egerek	A CLOCK–regulált gének a hajciklus fázisainak megfelelően változnak. Mutáns egér esetében anagén fáziskésés igazolható. <i>Bmal1<sup>-/-</sup></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<sup>-/-</sup>/K5-SOS</i> egerek	A <i>bmal1<sup>-/-</sup>/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  $-70^{\circ}\text{C}$ -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

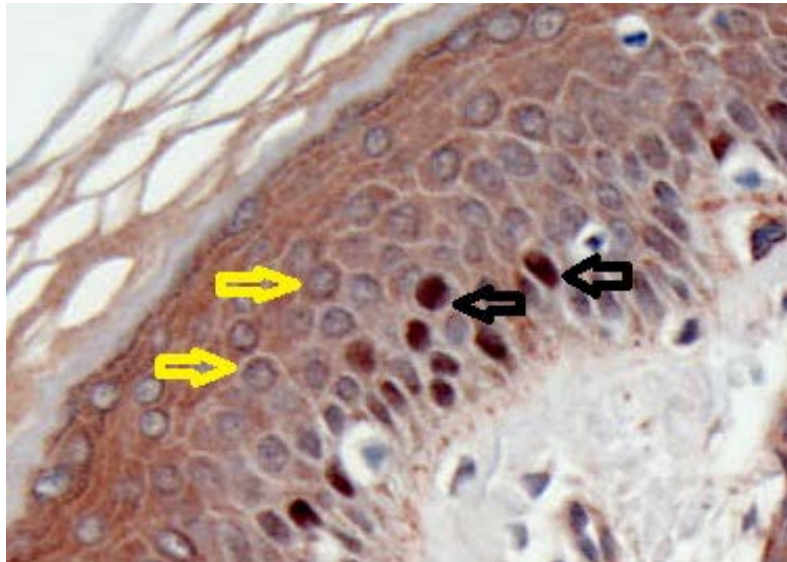
(T<sub>3</sub>), és 1 minta 4 mm-nél vastagabb (T<sub>4</sub>) volt. Szövettani beosztás alapján a melanomák nagyrésze felszínesen terjedő melanomának (n=18), két esetben lentigo maligna melanomának, és egy-egy esetben acrolentiginosus, ill. noduláris melanoma malignumnak bizonyult. A 10 anyajegyves 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 biopsziás 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 sejtnek 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.





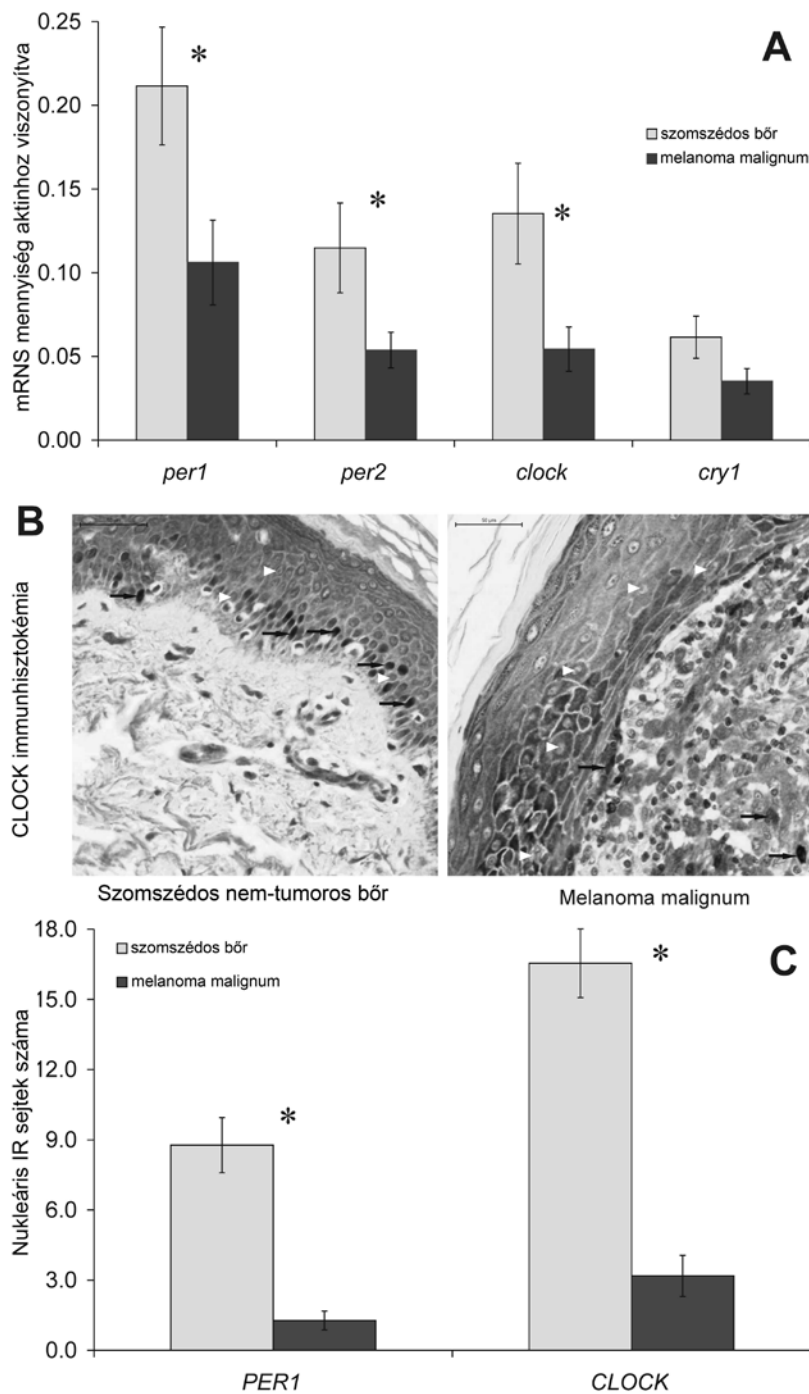
**1. kép**

*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 keratinocyta volt a tumor- és a normál bőrmintákban is (**2B. ábra**). A melanocyta 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 immunhisztokémia (fekete nyíl: immunpozitív-, fehér nyíl: immunnegatív sejtek)  
**C.** PER1 és CLOCK immunpozitív sejtek átlaga

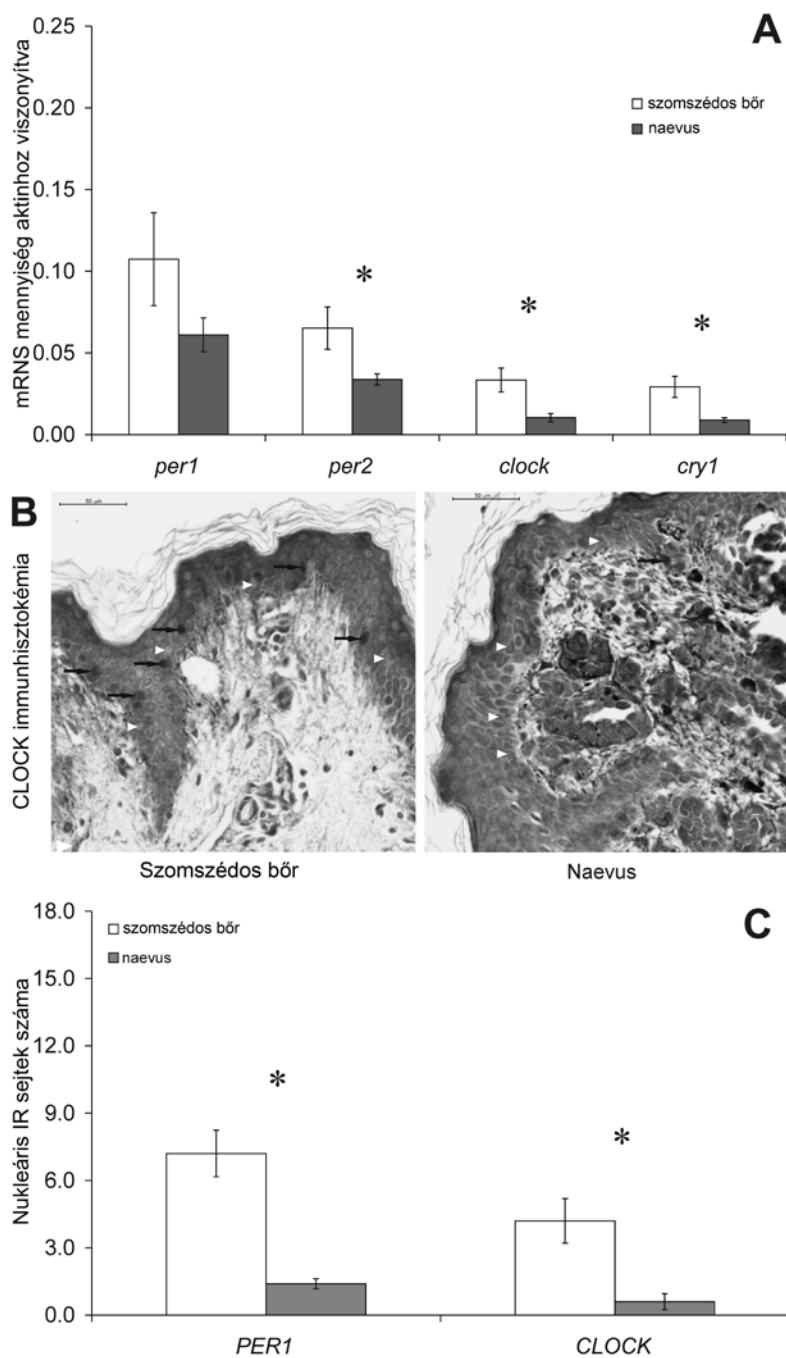
### Melanoma malignum hisztopatológiai jellemzői és a cirkadián óragének közötti összefüggések vizsgálata

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**).



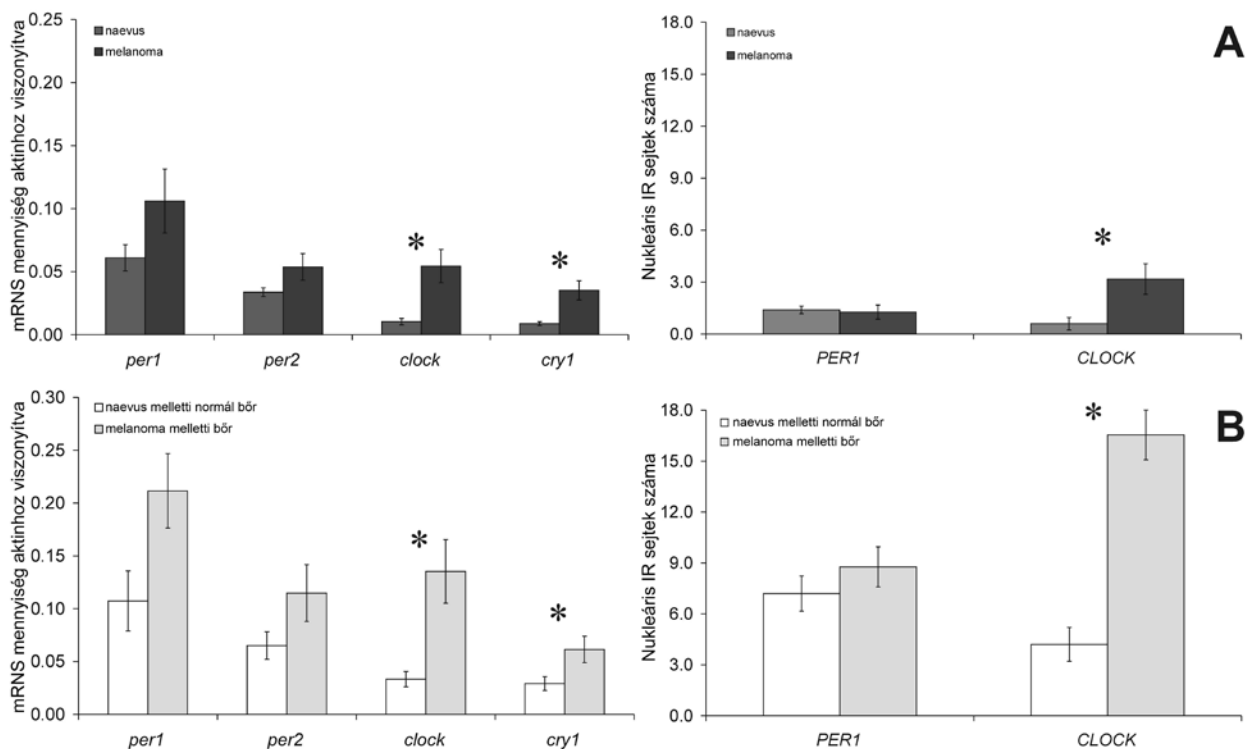
**3. ábra**

- 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 sejtösszetétel 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 sejtösszetételi különbség is adhatja. Feltevésünk igazolására jóindulatú, melanocyta 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 translációs szinten is a melanómás mintákban (**4A. ábra**). Az immunhisztokémiai vizsgálat során a vizsgált órafehérjék elsősorban a szövetminták nem tumoros sejtjeiben (pl. keratinocyta) 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 sejttözsztételéből 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<sub>(2011)</sub>: 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<sub>(2011)</sub>: 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<sub>(2005)</sub>: 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 bőrtumzorok 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<sub>(2006)</sub>: 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<sub>(2011)</sub>: 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**

# Clock gene expression studies in human skin biopsies

Ph.D. thesis

**Lengyel Zsuzsanna M.D.**

University of Pécs, Faculty of Medicine,  
Department of Anatomy and Department of Dermatology

Supervisors: Csernus Valér M.D., PhD., DSc. and Battyáni Zita M.D, PhD.

Neuroendocrinology and Neurohistology Doctoral Program  
Program leader: Csernus Valér M.D., PhD., DSc

Theoretical Medical Sciences Doctoral School  
Head of doctoral school: Lénárd László M.D., PhD., DSc

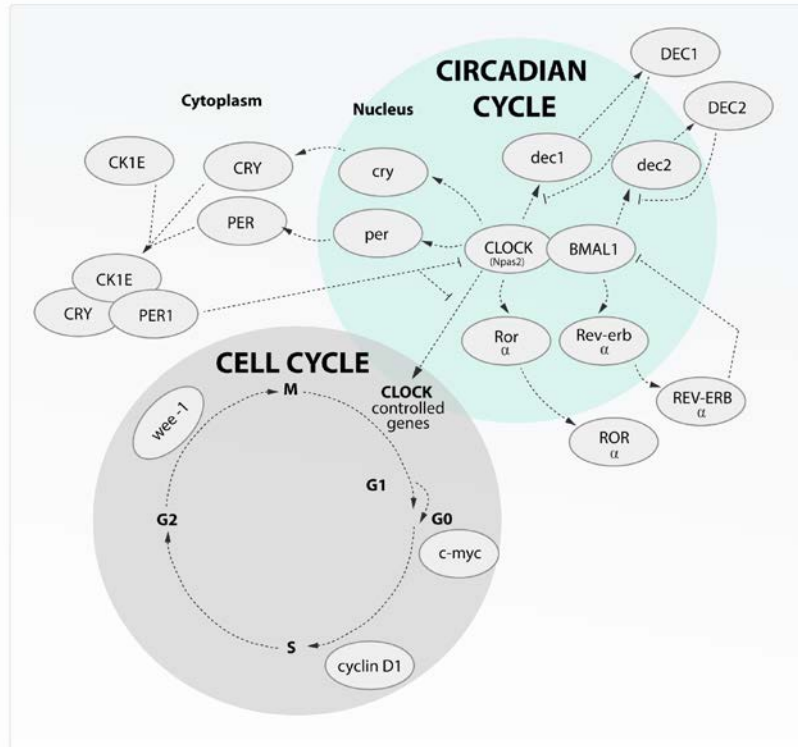


University of Pécs  
Faculty of Medicine  
Pécs  
2013.

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Circadian rhythm and clock genes

A biological rhythm is one or more biological events or functions that reoccur in time in a repeated order and with a repeated interval between occurrences. Circadian biological rhythms show a temporal pattern which tracks light/dark cycles resulting from Earth's rotation around its own axis (circa- approximately, diem- a 24 h day). These daily rhythms have been widely observed in prokaryotes, eukaryotes, plants, fungi, animals and humans. The mammalian circadian timing system generates daily rhythms that are crucial for normal behavior and various physiological processes, such as sleep-wake cycle, hormone secretion, core body temperature, metabolism and cell cycle control. Within one period, the actual stage (phase) of the rhythm can be easily shifted with a proper environmental stimulus (Zeitgeber: german „time giver”). The most important Zeitgebers are light, temperature, food, physical activity, sleep-awake- and social stimuli. Besides melatonin, insulin, glucocorticoids, and catecholamines act as endocrin-metabolic Zeitgebers. In mammals the circadian system consists of a central and numerous peripheral clocks, which are regulated by positive-, and negative feedback loops. In mammals the key regulator is located within the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the anterior hypothalamus. The centrally generated systemic rhythms coordinate molecular clocks in peripheral organs. In the last 20 years, several clock genes and proteins have been identified and implicated in the molecular regulation of circadian rhythms both in the SCN and in peripheral tissues. The mammalian molecular clock is regulated by transcriptional and post-translational feedback loops. The positive regulators of the circadian clock are the „*circadian locomotor output cycles kaput*” (CLOCK) and the „*brain and muscle ARNT-like*” (BMAL1) proteins that heterodimerize, enter the nucleus and induce expression of *per* and *cry* genes by binding to their promoters at E-boxes. The cryptochrome (CRY1 and CRY2) and period homolog (PER1, PER2 and PER3) clock proteins act as negative regulators by forming a complex to inhibit CLOCK/BMAL1 mediated transcription in the nucleus, thus also inhibiting their own transcription (**Fig. 1.**). It has also been shown that the CLOCK/BMAL1 complex directly regulates cell cycle genes such as *wee1* (G2/M transition), *c-myc* (G0/G1 transition) and *cyclin D1* (G1/S transition). The diversifying connection between cell cycle and the circadian clock have been verified by numerous studies.



**Figure 1.**

*Schematic representation of the mammalian circadian clock mechanism*

Circadian rhythmic regulations are involved also in the repair of DNA damage and in apoptosis control. Recent study indicated that among the different DNA repair mechanisms, nucleotide excision repair is tightly controlled by the circadian clock. Studies have shown that both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis seem to interfere with the circadian system.

### **1.2. Clock genes and carcinogenesis**

Looking at the diversity of mechanisms influenced by the circadian system, it is not surprising that the impairment in the clock function has been implicated in cancer formation in numerous studies. Epidemiological data suggested that the disruption of circadian rhythms in behaviour is associated with a higher risk for cancer formation. Studies of human breast and colon cancer have revealed that disruption of circadian rhythms primarily in shift workers increases risk of disease development. Based on numerous similar experimental evidences, shift work is considered by the WHO (International Agency for Research on Cancer, IARC) as “probably carcinogenic to humans”. From the molecular aspect, several studies suggested tumor suppressor functions for circadian rhythms. Some components of the molecular clock might be directly involved in tumor suppression (*per1, per2*), while the roles of other clock genes in this process are less clear. Experiments on human tumorous biopsies consistently showed down-regulated clock gene expression in various cancer types in comparison to

adjacent non cancerous biopsy, *e.g.* in breast-, endometrial-, prostate-, colon-, liver, head and neck squamous cell, lung cancer. It is important to emphasize that descriptive data on clock gene expression gained from human tumor biopsies do not answer the question if the finding is a cause or consequence of malignant transformation. Epigenetic down-regulation could also be a result of altered neuro-humoral or metabolic environment caused by antitumor reactions (local or systemic) of the body.

### **1.3. Circadian rhythms in the skin**

Skin is a barrier organ continuously exposed to diurnal changes in environmental conditions. Rhythmic pattern in some biophysical and physiological parameters of human skin are well known (*e.g.* sebum production, barrier function). **Table 1** depicts the publications on the relationship of the skin and the circadian system. In conclusion, the skin contains functional peripheral clocks, which make it an ideal model to study the relationship of circadian timing and tumor development.

### **1.4. Melanoma and the circadian system**

The effects of circadian disruption on the frequency of SCC or melanoma formation have not been documented in animal experiments. The epidemiological studies available about the relationship between skin tumors and circadian disruption are ambiguous. A higher risk of melanoma was reported in airline personnel related to their job, but the role of the lifestyle in the increased risk currently remains unclear. Other studies on shift workers and on flight attendants question the correlation between circadian disruption and skin tumor incidence. More recently, 44% reduction in melanoma risk was reported among night shift workers. The lack of increase in the risk for melanoma incidence under circadian disruption together with a greater aggressivity of melanoma growth under such conditions is rather interesting. Growth and proliferation seem to be promoted only in already transformed skin cells with impaired apoptotic response to the metabolic and neurohumoral dysregulation of circadian disruption. Since no particular hormone has been proven until now to play an exclusive or indispensable role in melanoma development, uncovering details on the circadian regulation of cellular metabolism in the skin may be more promising than the search for new humoral factors.

**Table 1.** *Expression of circadian clock genes in the skin*

Publication date	Sample	Results
2000.07.	Keratinocyte- (HaCaT), melanocyte-, fibroblast-, melanoma A375 cell lines	Evidence for expression of <i>clock</i> and <i>per1</i> mRNAs and proteins in various skin cell types.
2001.02.	Human skin biopsies	Daily rhythm in the expression of <i>clock</i> , <i>tim</i> , <i>cry1</i> , <i>bmal1</i> , <i>per1</i> <i>in vivo</i> .
2002.08.	Human keratinocyte cell lines	Low-dose UVB irradiation induces altered expression of <i>clock</i> , <i>per1</i> , <i>bmal1</i> .
2008.11.	C57BL6 wild type and <i>Cry1<sup>-/-</sup>Cry2<sup>-/-</sup></i> mice	Oscillation of skin clocks abolished after SCN ablation.
2009.07.	C57BL6 wild type, <i>Clock<sup>-/-</sup></i> , and <i>Bmal1<sup>-/-</sup></i> mice	CLOCK-regulated genes are modulated in phase with the hair growth cycle. Delay in anagen phase is observed in case of mutant mice. Upregulation of p21 in <i>Bmal1<sup>-/-</sup></i> mice.
2010.09.	HaCaT keratinocytes	<i>In vitro</i> rhythmic expressions of circadian clock genes and clock controlled genes, involved in epidermal physiology ( <i>Insig2a</i> , <i>c-myc</i> , <i>Ldl receptor</i> , <i>Hmgcr</i> ).
2011.11.	Male outbred SKH-1 mice	The xeroderma pigmentosum group A (XPA) protein expression and the excision repair rate show daily rhythmicity in the skin. Exposure to UV radiation at 4:00 AM caused cca. five fold higher multiplicity of skin cancer (invasive squamous cell carcinoma) than mice exposed at 4:00 PM.
2011.11.	<i>Bmal1<sup>-/-</sup>/K5-SOS</i> mice	Fewer neoplastic lesions on the skin of <i>Bmal1<sup>-/-</sup>/K5-SOS</i> mice in all stages of cancer development if compared to K5-SOS.
2012.05.	Human melanocyte, keratinocyte and fibroblast cultures	<i>In vitro</i> rhythmic expression of the clock genes with different amplitudes of oscillation in each cell types.
2012.05.	Human epidermal biopsies from healthy volunteers	Hundreds of genes show daily fluctuations in their mRNA levels in the human epidermis <i>in vivo</i> (microarray results).

## 2. AIMS

Several *in vitro* studies have proved the role of circadian system in cell cycle-, DNA repair mechanisms and apoptosis. The impaired function of any of these may lead to cancer formation. Clinical studies were carried out in which biopsies were obtained from the tumor and the adjacent non-tumorous tissues and the measured clock gene mRNA expression data was compared. The results of the experiments consistently showed down-regulated clock gene expression in various cancer types in comparison with adjacent non cancerous biopsy. Many

studies have assumed that decreased expression of *per* gene may lead to tumorformation as its tumorsuppression function is proven at molecular base. However analyzing these results we have to consider that only limited data has been documented on cellular composition of these clinical samples and the reduction in mRNA content differences was modest. Consequently, the measured decreased mRNA contents at the tissue level could be simply caused by altered cellular composition of the tumorous biopsy if compared to the paired adjacent non-tumorous biopsy. To show a clearer picture, transcriptional alterations not only in cancer cells but also in adjacent non-tumorous cellular compartments within the tumorous tissue (e.g. lymphomonocytotic infiltration) need to be examined simultaneously. Based on its heterogenous composition and ease of access, skin seems to serve as a good model for such histomorphological studies.

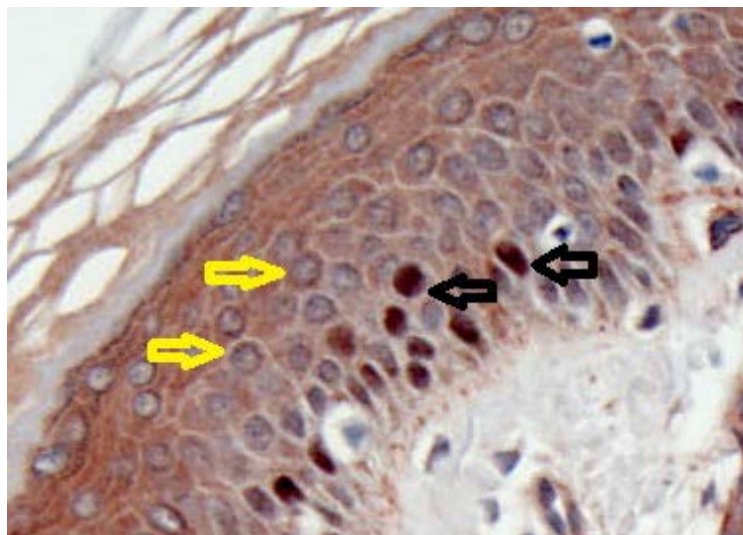
- (1) At the beginning of our research there was only one human study, which proved the presence of clock genes and their rhythmicity in human skin samples. No data was available on clock genes expression in case of skin diseases (skin tumor in our case). We planned to take biopsies from melanoma malignum and the adjacent non-tumorous skin to determine clock gene expression both at mRNA and protein levels in the samples.
- (2) Several studies have been conducted previously in various cancer types (except melanoma), where clock genes expression of the tumor biopsy was compared to the adjacent non cancerous biopsy. Most human studies on tumorous biopsies with heterogenous cellular compositions provide cca. 0.5 fold difference in the mRNA amounts of clock genes between paired tumorous vs. non-tumorous tissue samples. Similar comparison was planned at mRNA and protein levels.
- (3) To determine overall survival in cancer patients prognostic factors are evaluated. In our experiment we planned to seek for correlations between the clock genes expression and clinico-pathological features in the melanoma patients.
- (4) To clarify that the difference observed in clock gene expression between tumorous and non-tumorous samples is may be due to altered cellular composition we planned to gain samples from benign melanocyter lesion (naevus) and it's adjacent healthy skin. The presence of clock genes expression was examined first and afterwards the available data on melanocytic lesions and adjacent skin were planned to be compared.

### 3. PATIENTS AND METHODS

Tissue samples from 32 patients (mean age 63, minimum 24, maximum 88) who underwent surgery due to suspected melanoma were collected at PTE ÁOK Dermatology and Oncodermatology Department. There were no signs of distant or sentinel lymphnode metastasis in any of the patients. 3 mm dermatological punch biopsies were obtained from the primary melanoma which was removed surgically from each patient between 9:00-12:00 a.m. Non-cancerous samples were collected either from adjacent skin in average of 2 cm from the melanoma. In addition, non-cancerous samples were collected also from naevi and adjacent skin 1 cm from the naevus in 10 additional patients without malignant disease. After removing the subcutis from all the punch biopsies with a sterile blade, the samples were immediately homogenized in TRI Reagent (SigmaT9424) and stored at -70°C until processing for RT-PCR analysis. Tumor diagnosis and classification was confirmed by histopathological analysis of the whole excised skin samples. Cell composition of all specimens was determined according to routine pathohistodiagnostic protocol of the University of Pécs (haematoxylin-eosin staining, S-100, HMB45A, Melan-A immunostaining, tyrosinase histochemistry). Furthermore, CLOCK and PER1 immunopositivity was tested in both malignant and non-malignant sample blocks. According to the routine histopathological examination, 26 out of 32 patients were diagnosed with melanoma malignum. Four of the samples could not be evaluated with RT-PCR because of high melanin contents which interfered with the fluorescent measurements. According to the measured tumor thickness and the American Joint Committee on Cancer Staging we have found that out of the 22 melanoma samples 3 samples were *in situ* melanoma ( $T_{in situ}$ ), 7 were <1 mm ( $T_1$ ), 7 were 1-2 mm ( $T_2$ ), 4 were 2-4 mm ( $T_3$ ), and one was thicker than 4 mm ( $T_4$ ). Most of the processed melanoma samples were superficial spreading melanomas (n=18), two were lentigo maligna melanomas, one was acrolentiginosus melanoma malignum, and one was nodular melanoma malignum. Out of the ten naevi samples 7 were histologically proven as being compound-, and 3 as junctional naevi. To determine the mRNA expression of the clock genes real-time RT-PCR was used. Total RNA was extracted according to the specifications of the TRI-reagent's manufacturer (SigmaT9424). Absorbance was measured at 260 nm with Ultrospec 2100 instrument. Real-time PCR was run using 3  $\mu$ L cDNA solution per 15  $\mu$ L reaction volume with Applied Biosystems' TaqMan gene expression assays for *per1* (Hs00242988\_m1), *per2* (Hs00256143\_m1), *clock* (Hs01546767\_m1), *cry1* (Hs01597805\_g1); and also for internal reference genes  *$\beta$ -actin* (Hs99999903\_m1) and *hprt1* (Hs99999909\_m1) which show little or no variation between healthy and tumor skin samples. Furthermore immunohistochemistry



was performed with clockproteins (CLOCK and PER1), which selection was based on our RT-qPCR results. To quantify differences in clock gene mRNA contents of the obtained biopsies, the  $\Delta\Delta C_T$  method was used after control measurements for reaction efficiency normalizations. To quantify differences in clock protein contents of the obtained biopsies, the number of cells with strong nuclear immunopositivity was counted and averaged in three different sections of the biopsy. In each section, three different fields were photographed. The cell counting was performed on non-edited digital color images, without knowing the histopathological result. Strong nuclear immunopositivity was considered in cells with brown colored nuclei masking the blue counterstaining (haematoxylin) completely (**Fig. 2**). Differences in clock gene expression between biopsy types (melanoma, adjacent skin, naevus, healthy skin) or between clinicopathological categories of melanoma were evaluated with *Student's* two sample test (two-tailed, with unequal variances). All statistical analysis were performed using SigmaStat for Windows Statistical Software, version 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, California), where  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.



**Figure 2.**

*Immunopositive (black arrow)-, and immunonegative (yellow arrow) cells*

#### **4. RESULTS**

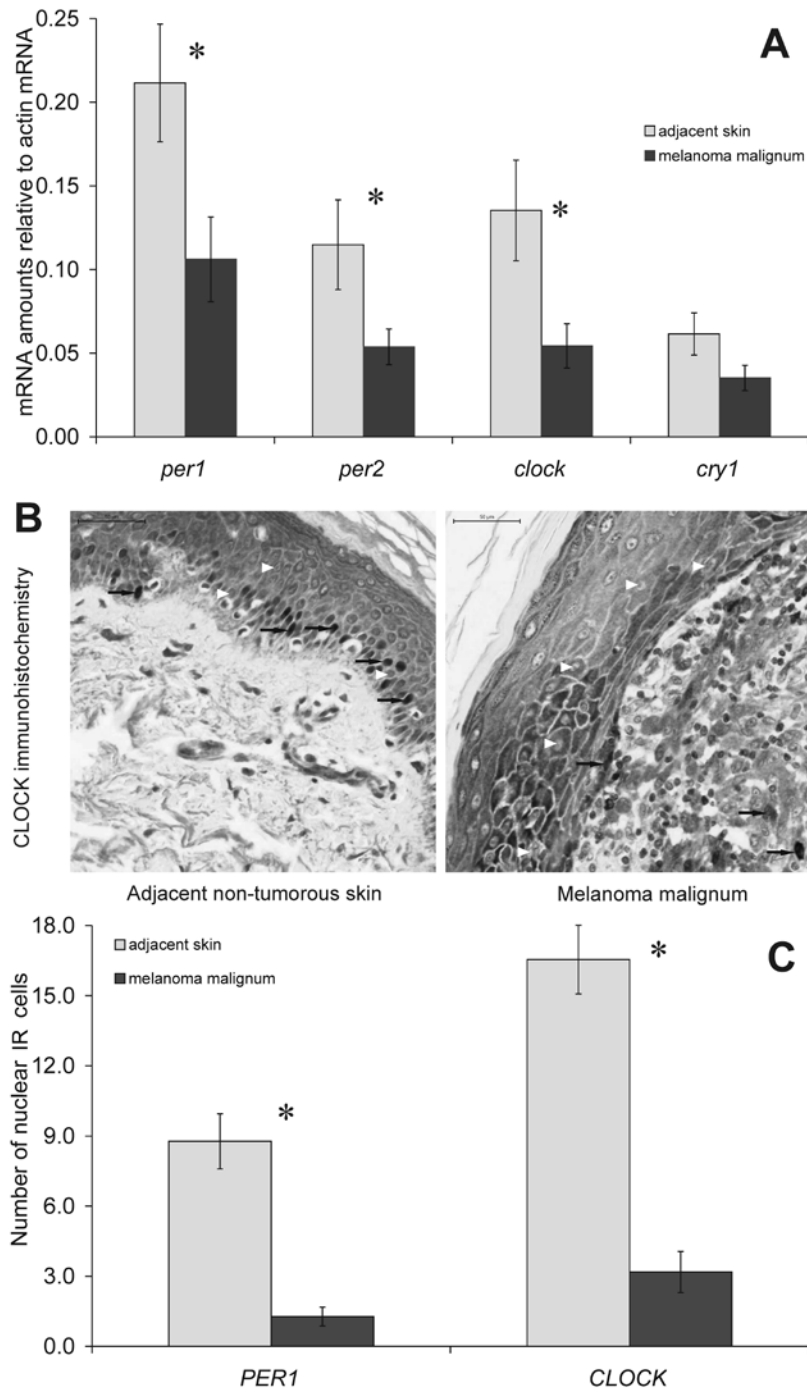
##### **Expression of *Per1*, *Per2*, *Clock* and *Cry1* in Skin Biopsies of Melanoma Patients**

Levels of clock gene mRNAs showed a decrease in melanoma tumors when compared to adjacent non-tumorous skin tissues (**Fig. 3A**). On average, *per1*, *per2*, and *clock* showed significantly decreased levels of expression ( $p$  values were 0.020, 0.034, 0.020, respectively), while decrease in *cry1* expression proved not to be significant ( $p=0.081$ ). The number of PER1 or CLOCK nuclear immunopositive cells in our skin samples showed a clear decrease in melanoma tumors compared to adjacent skin ( $p<0.001$ , **Fig. 3C**). The majority of PER1 or

CLOCK nuclear immunopositive cells were mostly keratinocytes of the epidermis both in the tumor and the adjacent skin biopsies (**Fig. 3B**). In contrast, melanocytes or melanoma cells did not show remarkable PER1 or CLOCK immunopositive staining. Since PER1 and CLOCK are transcriptional regulators, the number of nuclear immunopositive cells in skin biopsies may represent the number of cells with functional molecular clocks. Immunopositive cell number was assessed per visual field without considering the total cell number within the same visual field. Therefore, our finding of 5-6 fold decrease in the more cell-rich tumorous biopsies vs. adjacent skin means even greater reduction in the proportion of functional clock cells in melanoma biopsies.

### **Possible Correlations of Circadian Clock Gene Expression with Histopathological Characteristics of Melanoma Malignum**

In our human skin samples, there was a correlation between the expression of PER1 and the Breslow thickness and presence of ulceration of melanoma biopsies ( $p=0.006$  or  $0.018$ , respectively). The association of PER1 immunopositivity with these histopathological features was reciprocal: e.g. thicker tumors presented greater reduction in the number of PER1 immunopositive cells in the melanoma biopsy. However, this correlation was found significant only at the protein level: the mRNA expression patterns for neither *per1* nor *per2* correlated with any histopathological features in our melanoma biopsies. In turn, the expression of *clock* showed significant correlations with certain histopathological characteristics both at the mRNA and protein levels. For *clock* mRNA levels, significant reciprocal association was found in tumorous skin biopsies with Breslow thickness ( $p=0.023$ ). Interestingly, similar inverse correlation was seen among adjacent, non-tumorous skin samples of the paired tumor biopsies for more clinicopathological features ( $p=0.018$  for Breslow thickness,  $p=0.017$  for Clark level, and  $p=0.005$  for ulceration). This means that in thicker tumors, clock mRNA expression in adjacent non-tumorous skin is lower if compared to biopsies adjacent to thinner tumors. Similar observations were found at the protein level: higher Clark levels ( $p=0.032$ ), and higher mitotic rate ( $p=0.046$ ) of the tumor was accompanied by a greater reduction in CLOCK immunopositive cell number only in adjacent, non-tumorous skin samples of the paired tumor biopsies. Furthermore, *cry1* expression showed similar reciprocal associations ( $p=0.034$  for Breslow thickness, and  $p=0.029$  for ulceration) in the adjacent, non-tumorous skin.



**Figure 3.**

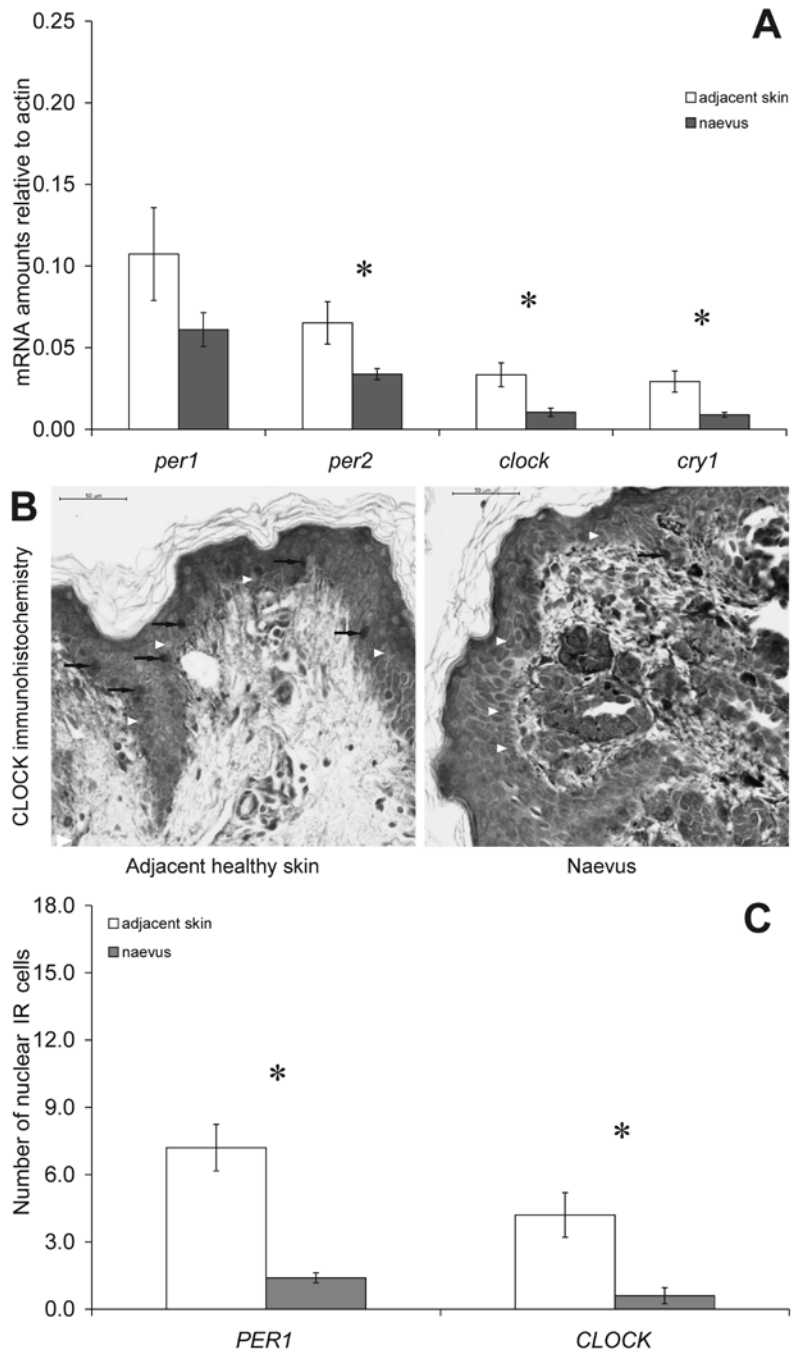
**A.** The expression levels of circadian genes in melanoma and non-cancerous adjacent skin

**B.** CLOCK immunohistochemistry (black arrow: immunopositive-, white arrow : immunonegative cells)

**C.** Mean number of PER1 or CLOCK nuclear immunopositive cells

### Expression of *Per1*, *Per2*, *Clock* and *Cry1* in Skin Biopsies from Human Naevi

Amounts of clock gene mRNAs were decreased in naevi compared to adjacent healthy skin tissues (**Fig. 4A**). In average, *per2*, *clock*, and *cry1* showed significantly decreased levels of expression ( $p$  values were 0.032, 0.008, 0.007, respectively), whilst decrease in *per1* mRNA



**Figure 4.**

**A.** The expression levels of clock genes in paired naevus and normal skin of volunteers

**B.** CLOCK immunohistochemistry (black arrow: immunopositive-, white arrow: immunonegative cells)

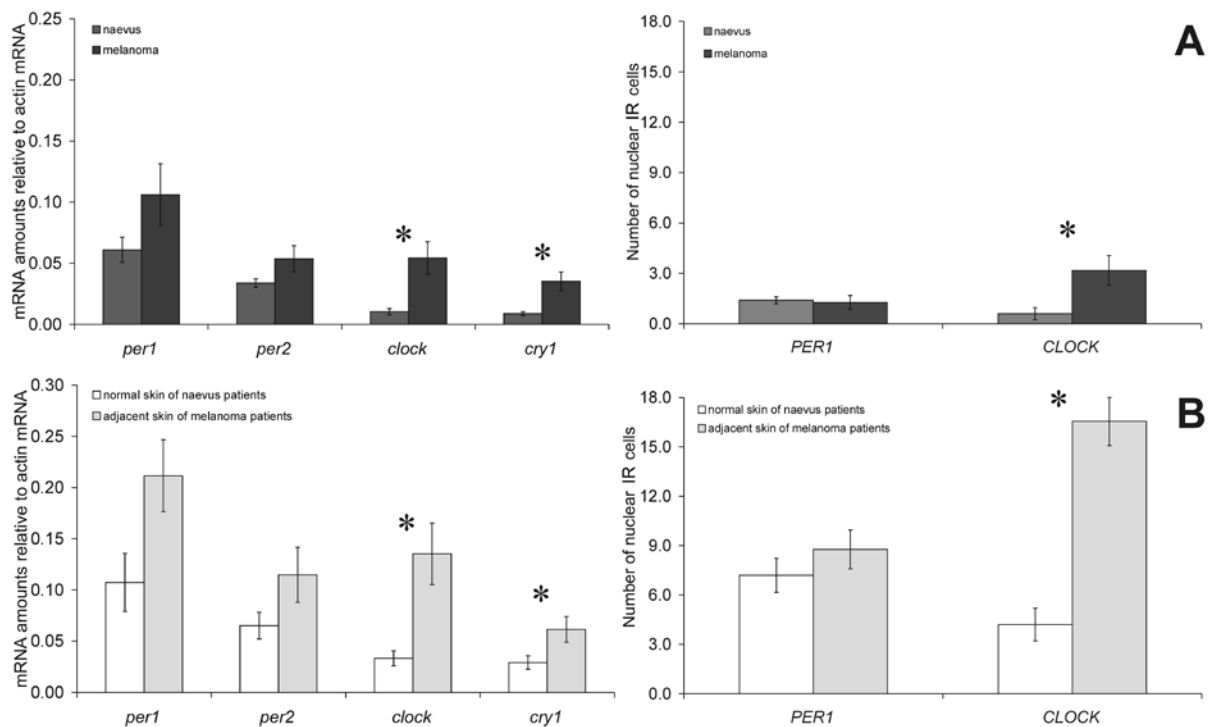
**C.** Mean number of PER1 or CLOCK nuclear immunopositive cells

expression was not significant ( $p=0.145$ ). The number of nuclear immunopositive cells in naevi compared to adjacent healthy skin biopsies also showed a decrease (**Fig. 4C.**). Similar to that seen in our melanoma samples, melanocytes did not show remarkable PER1 or CLOCK nuclear immunopositive staining, while most of the immunopositive cells were keratinocytes. PER1 and CLOCK immunopositivity was significantly reduced in the samples

of 8 and 6 out of 10 naevus volunteers, respectively. In average, the naevus samples clearly showed an overall reduced number of immunopositive cells in PER1 or CLOCK IHC analysis ( $p=0.006$  and  $p=0.029$ , respectively) (**Fig. 4B.**).

### Comparison of clock gene expression patterns between melanoma and naevus biopsies

When comparing malignant melanoma tumors with non-malignant naevus biopsies (**Fig. 5A.**), mRNA levels from *clock* and *cry1* were seen increased in the melanoma (5.24 and 3.98 folds, with  $p=0.018$  and  $0.002$ , respectively). On the other hand, *per1* and *per2* mRNA levels did not differ significantly ( $p=0.74$  and  $0.54$ , respectively). Similarly, the number of CLOCK nuclear immunopositive cells in melanoma were seen increased (5.3 fold,  $p=0.011$ ), but the number of PER1 cells did not differ significantly ( $p=0.91$ ). Comparing the non-tumorous adjacent skin biopsies of melanoma patients with the normal healthy skin biopsies of naevus patients (**Fig. 5B.**), mRNA levels from *cry1* and *clock* again were increased in the non-tumorous biopsy of melanoma patients (2.1 and 4.0 folds, with  $p=0.027$  and  $0.003$ , respectively). In turn, *per1* and *per2* mRNA levels did not differ significantly ( $p$  values were 0.8, and 0.9 respectively). The number of CLOCK nuclear immunopositive cells in the non-tumorous adjacent skin biopsies of melanoma patients were increased (3.94 fold, with  $p<0,001$ ), but the number of PER1 cells did not differ significantly ( $p=0.75$ ).



**Figure 5.**

- A.** Comparison of clock gene expression in tumorous samples of melanoma vs. naevus  
**B.** Comparison of clock gene expression of adjacent non tumorous skin of melanoma patients vs. normal skin of naevus

## 5. DISCUSSION

Findings on the daily rhythmic nature of cell cycle control, DNA damage response and apoptotic mechanisms opened a new path in tumor biology research. Some of the components of the circadian molecular clock are directly involved in tumor suppression (*per1*, *per2*), while the roles of other clock genes in this process remain less clear (*clock*, *bmall*, *cry*). Human tumorous biopsies of various cancer types consistently show down-regulated clock gene expression as cca. 0.5 fold reduction in mRNA contents at the tissue level if compared to their adjacent non cancerous biopsies. This phenomenon not necessarily caused by malignant transformation, but could be simply due to altered cellular composition of the tumorous biopsy.

Skin is an ideal model to study the relationship of circadian timing and tumor development: (i) it contains functional peripheral clocks within different cell types of its heterogenous cellular composition; (ii) a role of the circadian system in skin tumors has been proven in animal experiment.

Having taken these into consideration we determined clock genes expression in melanoma samples at mRNA and protein levels. In concordance with several reports on other human tumor types we also have found that the expression of clock genes is significantly lower in the tumor biopsy than in the adjacent non-tumorous skin (**Fig. 3.**). The moderate decrease of clock genes expression and the lack of clear associations with the melanoma prognostic factors challenged the hypothesis that the altered cellular composition itself might be responsible for the downregulation of the clock genes. Therefore we obtained biopsies from benign melanocytic lesions and compared their clock gene expression to adjacent skin biopsies. When comparing to the paired adjacent skin, a decrease in clock gene expression was detected also in the naevus biopsies (**Fig. 4**), which finding was similar to that seen in melanoma patients (**Fig. 3**). These findings suggest that the moderate down-regulation of clock gene expression in malignant tumors may be a result of the altered cellular composition between tumor and adjacent non-tumorous tissues, irrespective to the presence of malignancy. On the other hand when we compared the data of naevus vs melanoma the induction of *clock* gene was detected both on transcriptional and translational levels in melanoma biopsies (**Fig. 5A.**). In our immunohistological study, the majority of PER1 or CLOCK nuclear immunopositive cells were mostly epidermal keratinocytes both in the tumor and the adjacent skin biopsies (**Fig. 3B and 4B**). The above mentioned results were seen not only in the tumor, but also in the adjacent non-tumorous skin when compared with the normal healthy skin biopsies of naevus patients (**Fig. 5B.**). The induction of CLOCK in both the tumor and in the

non-tumorous adjacent skin of melanoma patients suggests that malignancy-related metabolic, neuro-humoral, or immune factors target also non-melanocytic cellular compartments of the skin in these patients. Our data on clock gene expression gained from human melanoma biopsies does not answer the question whether the finding is a cause or consequence of malignant transformation. To clarify this further investigations are needed. Recently published reports attribute outstanding attention to CLOCK, that links circadian oscillations to metabolic regulations, hereby may play a part in tumor development and/or progression, which is suggested by our findings as well.

A better understanding of the relationship between circadian timing, tissue metabolism and tumor development is expected in the near future with a potential for new, more potent and individualized therapeutic strategies in oncology.

### NOVEL FINDINGS

- (1) Being the first to confirm the expression of clock genes at mRNA and protein levels in human melanocytic lesions (melanoma and naevus).
- (2) No obvious correlations have been found between the decreased expression of the clock genes and the known prognostic factors of melanoma malignum.
- (3) Being the first to doubt, that only the malignant transformation can be responsible for the detected downregulation of clock genes, observed in tumorous biopsies when compared to adjacent non-tumorous samples. Hypothized and proved indirectly that the decrease of clock gene expression may be due to the altered cellular composition of the tissue samples.
- (4) According to our results, decrease in the expression of *per1* is not necessarily an indicator of malignant transformation in tumor biopsies.
- (5) We have demonstrated that the non-tumorous skin adjacent to melanoma is not healthy skin, because altered clock gene expression is detected, when compared to normal skin. The altered CLOCK expression in the skin may represent a perturbed metabolic environment which may either promote tumor formation (i.e. pre-cancerous stage) or affect tumor treatment efficiency.
- (6) Induction of CLOCK was observed both in the melanoma and in the adjacent non-tumorous skin at mRNA and protein levels. The transcriptional alterations of clock gene expression in malignant samples are rather characteristic of the non-malignant cells in the tumor and its surrounding than for the malignant cells.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

I owe a debt of gratitude and appreciation to my advisors, Dr. Zita Battyani and Prof. Dr. Valér Csernus, who completely supported me throughout my PhD both in my research work and in preparing me for academic life and clinical practice.

Special thanks to Dr. Andras Nagy who helped me begin and complete my academic work. With his advice and optimism, he encouraged me to be persistent. He thought me that “you can always improve and grow”.

Thank you to Dr. György Szekeres and his colleagues in their help with imunohistochemistry and Dr. Zoltán Rékási for the opportunity to utilize his PCR machine.

I am grateful for the help of the assistants, laboratory technicians, nurses, surgical nurses, and medical students in obtaining samples.

I would like to thank the patients and study participants who participated in the examinations. Finally, but perhaps most importantly, my grateful thanks to my family who under all circumstances made it possible for me to pursue my academic activities and the preparation of the dissertation. I thank my husband for his patience, professional advice, my parents’ selfless and continuous help throughout my life, my brother for the illustration tasks, and my grandmother for the many, many hours of childcare and everyone for their encouragement.