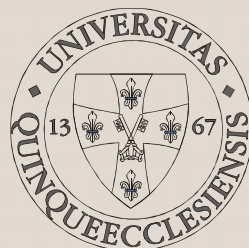


EGYETEMI DOKTORI (PH. D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A CIRKADIÁN ÓRA GÉNSZINTŰ VEZÉRLÉSE –
VIZSGÁLATOK CSIRKE TOBOZMIRIGY MODELLEN**

Dr. Nagy András Dávid



PTE ÁOK Anatómiai Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Doktori Iskola vezető: Dr. Lénárd László

Neuroendokrinológia és Neurohisztológia Doktori Program
Programvezető: Dr. Csernus Valér

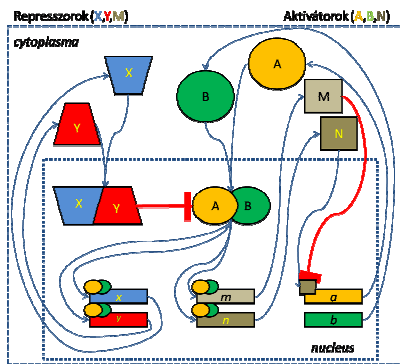
Témavezető: Dr. Csernus Valér

Pécs, 2010.

BEVEZETÉS

CIRKADIÁN RITMUSÚ BIOLÓGIAI JELENSÉGEK. Az emberi teljesítőképesség határait befolyásoló biológiai sajátágok, így a belső időzítő mechanizmusok ismerete iránt egyre nagyobb az igény. A biológiai ritmus egy nagyjából azonos periódusidővel ismétlődő, ritmikus biológiai jelenség, mely előrejelzi a környezeti tényezők ismétlődő változásait (fény, hőmérséklet, táplálék, stressz, *etc.*), hogy ezekre az élő szervezet időben felkészülhessen. A *cirkadián* ritmusú biológiai folyamatok ritmikus mintázata a Föld tengelyforgása által kiváltott nappal/éjszaka ciklushoz igazodik (*circa*- körülbelül, *diem*- 24 órás nap). A cirkadián ritmus az élővilágban széleskörűen elterjedt, és fenomenológiai szempontból az alábbiak jellemzik: (1) Endogén jelenség: a ritmus megfigyelhető folyamatosan sötét (*DD- constant darkness*), állandó hőmérsékletű és páratartalmú környezetben is. Ilyenkor a periódusidő csak *körülbelül* 24 h. (2) A ritmus perióduson belüli aktuális lefutása (fázisa) viszonylag könnyen megváltoztatható az arra alkalmas környezeti ingerrel (*Zeitgeber*: időt meghatározó).

A CIRKADIÁN BIOLÓGIAI ÓRA. A cirkadián ritmust vezérlő biológiai mechanizmusokat az 1960-as években *biológiai óráknak* nevezték el. A *cirkadián órák* rendkívül csekély hibával működnek, a ritmuskeltő *biológiai oszcillátor* összetevői pedig egyetlen sejtre lokalizálhatók. Eukariótákban az ismétlődést génaktivációs szintű kaskád biztosítja, gátló visszacsatolással. Az 1990-es évek közepére vált világossá, hogy a visszacsatolási hurok csak két elemből áll, az aktiváló- és a gátló *óraproteinekből*, melyeket az *óragének* kódolnak (**1. ábra**). A CLOCK óraprotein fő dimerizációs partnerei a BMAL proteinek. A CLOCK/BMAL heterodimerek a sejtmagban *E-box* kötődést követően génexpressziót indukálnak. E-box elemet tartalmaz többek között a *per*, és a PER heterodimerizációs



partnerének, a CRY génjének promotere is. A képződött PER/CRY heterodimerek interakcióba lépnek a CLOCK/BMAL transzkripció komplexekkel és gátolják azokat. A PER és CRY proteintermékek degradációjával a gátlás megszűnik. Az újabb ciklus elindításáért egy másodlagos feed-back hurok felel, ahol a *bmal* transzkripciót a REV-ERB α és ROR α proteinek szabályozzák.

1. ábra. A cirkadián biológiai oszcillátor alapját képező sejtszintű szabályozás sémája. A molekuláris interakciók leírása a szövegben olvasható. Főbb óragének gerincesekben (egér): a: *bmal*, b: *clock*, x: *per*, y: *cry*, m: *Rev-erb α* , n: *Ror α* .

A CIRKADIÁN BIOLÓGIAI ÓRA ÉLETTANI SZEREPE. A cirkadián biológiai oszcillátor időzítő funkcióját a homeosztatisz szabályozórendszerek mellett a kardiovaszkuláris-, az endokrin- és az immunrendszer hasznosítja. Az élettani változók széles spektrumán követhető nyomon az átlagosan 20-30%-os napi fluktuációként megjelenő cirkadián ritmus, és a különféle sejtípusok kifejeződő géneinek akár 90%-a mutathat 24 órás periódusú ritmikus expressziós mintázatot. Alapvető sejtszintű folyamatok is a

molekuláris oszcillátor szabályozása alatt állnak (e.g. sejtciklus), így az organizmuson belüli széleskörű elterjedtsége miatt a cirkadián óra egy általános, „housekeeping” rendszernek fogható fel. Érintettségé igazolt számos, nem ritka kórfolyamat kialakulásában és lefolyásában.

A CIRKADIÁN BIOLÓGIAI ÓRA SZABÁLYOZÁSA EMLŐSÖKBEN. A szabályozás legnyilvánvalóbb környezeti kulcsingere a fény/sötét ciklus váltakozása. Ennek érzékeléséhez a retina ganglionsejtjei közül az önmagukban is fényérzékenyek játszanak kulcsszerepet (*ipRGC* – *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*), melyek többnyire a non-vizuális fényinformációk feldolgozásában érintett agyterületekre vetülnek. A retinából a *hypothalamus*ba érkező idegrostok (*tractus retinohypothalamicus*, *RHT*) a *nucleus suprachiasmaticus*on (*SCN*) végződnek, mely mag ablációja a fontosabb élettani funkciók 24 órás periódusú ritmusos mintázatának megszűnéséhez vezet. Emlősökben az *SCN* a legfőbb cirkadián ritmusgenerátor, mert egyéb sejt szintű oszcillátorral (e.g. *fibroblast*, *hepatocya*) ellentétben az *SCN* neuronok a fejlett intercelluláris kommunikáció miatt *zeitgeber* hiányában sem deszinkronizálódnak. A fény éjjel a *retinorecipient* *SCN* neuronokban a *c-fos*, *c-jun* és a *per* gének kifejeződését indukálja, melynek következtében az *SCN* által szabályozott összes jelentős cirkadián ritmusú folyamat fázisgörbéje megváltozik. A csak éjjel kiváltható hatás fázisfüggősége a szignáltranszdukció szintjén szabályozott. A fény által az *SCN*-ben kiváltott $\text{Glu} - \text{NMDA-R} - \text{Ca}^{2+} - \text{CaMK IV} - \text{b-Raf} - \text{MEK1} - \text{ERK1} - \text{MSK} - \text{CREB} - \text{CRE} - \text{per}$ szignáltranszdukció szabályozásában különösen fontos neuromodulátor emlősökben a *RHT*-on felszabaduló *PACAP*. A fény/sötét ciklushoz igazított fázisjelet az *SCN* neuronok többnyire a környező *hypothalamicus* magok felé továbbítják (homeosztátok: testhőmérséklet, energiaháztartás, alvás/ébrenlét, lokomotoros aktivitás/inaktivitás; vegetatív idegrendszer; *hypothalamo-hypophysealis* rendszer). Az *SCN* által szinkronizált perifériás oszcillátorok óragén-expressziós ritmusgörbéinek *SCN*-hez viszonyított, jellemző fáziskésését az érintett receptorok és jelátviteli útvonalak szövet-specifikus eltérései okozzák. A *tobozmirigy* (*glandula pinealis*) az *SCN* által vezérelt endokrin szervek között kitüntetett szereppel bír a cirkadián ritmusú szabályozásában, mert (1) keringő *zeitgeber*-t biztosít (*melatonin*, „sötétség-hormon”) és (2) kulcsszerepe van az évszakok változásaihoz alkalmazkodó biológiai szabályozásban (*fotoperiodizmus*).

A MADÁR TOBOZMIRIGY, MINT A CIRKADIÁN BIOLÓGIAI ÓRA MODELLJE. Bár a melatoninszekréció cirkadián ritmusa filogenetikailag meglehetősen konzervált funkció, a toboztst (*corpus pineale*) jelentős faj-specifikus morfológiai, és funkcionális különbségeket mutat. A madár tobozmirigy bizonyul különösen alkalmasnak a cirkadián ritmussal kapcsolatos szabályozómechanizmusok modellezésére, mert az alábbi tulajdonságok mindegyike jellemzi: (1) A koponyatető közvetlen közelségében helyezkedik el, ahol a csontszövet vékony, fényáteresztő. (2) A retina csapocskáihoz hasonló *fotoreceptorok* és az emlősökéhez hasonló, nyúlványok nélküli *pinealocyták* egyidejű jelenléte a pinealis progenitor sejtek differenciálódási irányának megváltozására utal, melyben döntő szerephez jut a *pinealopetalis* idegrostok beáramlása az ontogenezis során. (3) A melatonin-release amplitúdóját *in vitro* a közvetlen megvilágítás és az adrenerg (α_2) stimulus egyaránt befolyásolja. (4) Az emlősök és más nem- emlősök tobozmirigyéhez

képest madaraknál a tobozmirigy *in vitro* DD környezetben szinkronizált ritmusban működik, az emlős SCN-nel összemérhető ideig (>5 ciklus). (5) A *pinealectomia* számos alapvető cirkadián ritmus eltűnéséhez vezethet madarakban, de emlősökben nem. (6) Az emlős SCN-moddelllel ellentétben a madár tobozmirigyből olyan *in vitro* preparátum készíthető az eredeti szöveti szerkezet megtartása mellett, mely a környező szöveti és neuroendokrin hatásoktól könnyen izolálható. (7) A csirke tobozmirigy már az embriókból is izoláltan kivethető és egészben *in vitro* rendszerbe helyezhető, így ideális modellként szolgál a cirkadián ritmus kifejeződését és szinkronizációját eldöntő, az anyai humorális környezettől függetlenül ható környezeti és genetikai tényezők vizsgálatára.

Az 1990-es évek második felére az emlős SCN, mint gerinces óramodell a genetikai módszerek széles skálájával vizsgálhatóvá vált. 1999-ben, amikor a PTE ÁOK Anatómiai Intézetben tudományos diákkörösként kezdtem munkámat, azt tűztük ki célul, hogy az óragén-expresszió szintjén ellenőrizzük a korábbi adatok alapján kialakított hipotézist, miszerint a csirke tobozmirigy az emlős SCN mellett egy előnyös és egyszerűen kihasználható modell a ritmusos folyamatok alapmechanizmusainak vizsgálatára.

CÉLKITŰZÉSEK

- (1) A munkánk kezdetén a csirke óragének azonosítását tűztük ki célul.
- (2) A csirke tobozmirigy 24 órás óragén-expressziós mintázatának meghatározására normál fény/sötét (LD) körülmények között tartott csirkék vizsgálatát terveztük.
- (3) *In vivo* és *in vitro* kísérleteket terveztünk, hogy a különféle megvilágítási körülmények között gyűjtött adatok összehasonlításával következtethessünk a pineális fotoreceptoroknak az óragén-expresszió szabályozásában betöltött szerepére a csirkék tobozmirigyében.
- (4) A melatonin-szintézis cirkadián ritmusa LD környezetben a 17. embrionális naptól transzkripciós szinten szabályozott a csirkék tobozmirigyében. Hogy ennek hátterében állhat-e már a molekuláris oszcillátor szinkronizált működése, az előzőleg LD körülmények között inkubált E17 stádiumú embriók és az előzőleg LD környezetben tartott 6 hetes állatok 24 órás óragén-expressziós mintázatainak összehasonlítását terveztük.
- (5) Sejtszintű oszcillátorok a csirkék tobozmirigyében már a kikelés előtt működhetnek, de szinkronizációjukhoz alapvetően szükség lehet környezeti impulzusra. Ennek óragén-expressziós szintű igazolására *in vivo* és *in vitro* kísérleteket terveztünk állandó sötét környezetben (DD) inkubált embriókon.
- (6) Már korábban felmerült, hogy PACAP-pal szinkronizálódhat a madár tobozmirigy óramodell is, de a rendelkezésre álló adatok nem voltak egyértelműek. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az emlős SCN-nél leírtakkal hasonló időben, és a hatásosnak leírt dózisban alkalmazott PACAP kezelés befolyásolja-e az óragének 24 órás expressziós mintázatát a DD körülmények között inkubált csirke embriók tobozmirigyében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

OLIGONUKLEOTID PCR PRIMEREK. Munkánk kezdetén még nem volt madár óragén-szekvencia ismert. Figyelmünk először a fényérzékeny tulajdonságú óraprotein, a CRY1 génjére irányult: az egér *cry1* mRNS szekvenciája alapján kerestünk az akkor elérhető csirke EST adatbázisban hasonló, de még azonosítatlan fragmentumokat (<http://www.chick.manchester.ac.uk>). A *per1*, *per2*, *per3*, *cry2*, *clock*, *bmal1* és *bmal2* óragének vizsgálatára az időközben az adatbankban elérhetővé vált madár szekvenciákat használtuk (**1. táblázat**). Az oligonukleotid primerpárokat úgy terveztük, hogy a megfelelői az egér génben *intront* tartalmazó szakaszt fogjanak közre. További tervezési szempont volt, hogy az RT-PCR termék 100-500 bp nagyságú legyen, a genomikus PCR termék pedig legalább 100-500 bp-ral hosszabb. A *cry1* specifikus primerekkel nyert RT-PCR termékeket a PTE ÁOK Patológiai Intézetben 2001-ben, a *cry2* és *clock* RT-PCR termékeket a PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézetben 2008-ban szekvenáltattuk.

Óra- gén-ek	GeneBank ID kódok	Species	5' primer	3' primer	RT-PCR termék számított hossza	Intron hossz
Clock	AF 246959	csirke	tcc cag tct ct tgg aca acc	gct gtt gct gga tca t g t g t	420	800
Bmal1	AF 246957	csirke	tgg ca ga ccaaa gga tgg	t t c ga ga ca tag c g t t c a c	370	700
Bmal2	AF 246958	csirke	atg c aca a ca acc ga ac at c	ca at g t t g t c c a t t t g a a g c	330	900
Per1	NM 011065	egér	cgg ag ct t c t g g t g c	cca g g g a t g g g a c t c	275	1200
Per2	AF 246956	csirke	ca at g g t c a c a c ga ac a c t	g g a g a c a g t g a g c t g t g t	250	1050
Per3	AY 046567	csirke	c a c a g g t c a g c a g a t a c a g	a t c a t c a c c a g g c t g a t c	225	1300
Cry1	AY 034432	csirke	g a a t g c t g g a a g c t g g a t g t g	c t t c t g e n c a c t c t c t g g	200	100
Cry2	AY 034433	csirke	a c a a g c a c c c c t c a c c t a c	g a t g g a c c a t a t a c a c a t c	150	700

1. táblázat. PCR primerek az óragének mRNS- és genomikus DNS detektálására csirkében.

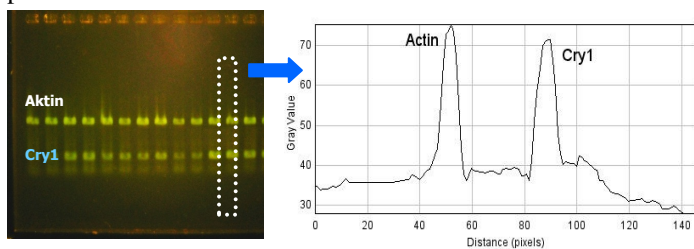
Az adatbankban elérhető szekvenciákból olyan primerpárokat választottunk, melyekkel a táblázatban feltüntetett méretű RNS és genomikus DNS szakaszok detektálhatók.

VEGYSZEREK. A szövetminták RNS-extrakciójához TRI reagenst (Sigma T9424), az RT reakcióhoz MuLV reverz-transzkriptázt (Applied Biosystems N8080018), a PCR reakcióhoz Taq-polimerázt (Sigma D4309) alkalmaztunk. Az agaróz gélelektroforézishez TAE puffert, a nukleinsav festéséhez ethidium-bromidot (Sigma E1385), vagy SYBR Green I-et (Sigma S9430) használtunk.

KÍSÉRLETI ÁLLATOK, SZÖVETMINTÁK. Csirke mRNS és genomikus DNS mintákat fehér *Leghorn* típusú csirkékből vett egész tobozmirigyből (5-8 mg/db) készítettünk (Pécs-Reménypuszta Baromfifeldolgozó Üzem). Az állatok szenvedésének minimalizálására nagy gondot fektettünk. A csirkék dekapitálására közvetlenül a mintavétel előtt került sor.

SZEMIKVANTITATÍV RT-PCR. Az RT reakció hatásfoka és a kiindulási RNS mennyiségek mintánkénti különbségeiből adódó eltérések normalizálására belső standardként a β -aktin gént választottuk. A tobozmirigy RNS extraktumok vizsgálatára egy lépéses RT-PCR

eljárást dolgoztunk ki. Az optimalizált reakció-paraméterek a következők voltak: templát szintézis 42°C 15 min, denaturáció 94°C 5 min, amplifikáció 26 ciklusban (94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min), és végül 72°C 7 min. A protokollt a *clock*, *cry1* és *cry2* primerekre sikerült beállítani, 1,5 mM Mg²⁺ koncentráció mellett. Az RT-PCR termékeket a reakcióelegy 5-5 µl-ének agaróz-gélelektroforézisével választottuk el, a gélét SYBR Green I-gyel festettük, majd kék fényrel világítottuk át (Dark Reader, Clare Chemical, USA). A fluoreszcens jel detektálásához az általunk összeállított dokumentációs rendszert használtuk (sötétkamra, amber filter színszűrő - Clare Chemical, Canon A510 digitális fényképezőgép). A PCR termékek SYBR Green fluoreszcenciáját a gélfotókon látható DNS csíkok átlagos, háttérértékekkel korrigált pixel-intenzitásából határoztuk meg (**2. ábra**). Az óragén RT-PCR termékek fluoreszcenciáját a β -aktin fluoreszcenciájához normalizáltuk: az így nyert relatív fluoreszcencia értékeken végeztük a statisztikai próbákat.



2. ábra. Óragén RT-PCR termék mennyiségi vizsgálata. Csirke tobozmirigy RNS-ből β -aktin és *cry1* primerekkel nyert termékek agaróz gélen, SYBR Green I festéssel. A hisztogram a foton pontozott vonallal körülhatárolt gélsvá pixel-intenzitását mutatja.

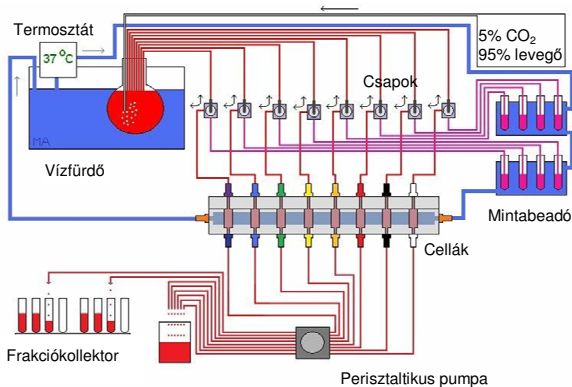
Az mRNS expresszió mennyiségi vizsgálatához cDNS- és mRNS-standardgörbéket készítettünk. Az egységnyi fluoreszcencia-változással járó kiindulási templátmennyiség-eltérés meghatározásakor csak az exponenciális tartományba eső fluoreszcencia adatokat vettük figyelembe. A PCR termékek 2-szeres relatív fluoreszcencia-különbsége legalább 1,4-szeres (*clock*) és 2,4-szeres (*cry1*) kezdeti cDNS mennyiség-növekedéssel korrelált. Az RT-PCR termékek 2-szeres fluoreszcencia-különbsége legalább 2,2-szeres (*clock*) és 3-szoros (*cry1*) kezdeti RNS mennyiség-növekedéssel korrelált. A kísérleti minták RT-PCR termékeinek mért SYBR Green fluoreszcencia értékeit a cDNS standardokhoz viszonyítottuk, majd azokat a transzkriptek méretkülönbségeivel is korrigáltuk. Az így nyert, transzformált, becsült mRNS mennyiségi adatokat ábrázoltuk a grafikonokon.

IN VIVO KÍSÉRLETEK. Fertilizált Leghorn csirketojásokat szereztünk be (Bólyi Keltető Üzem), majd a keltetésig LD (14h fény/10h sötét) vagy DD környezetben inkubáltuk, állandó hőmérsékleten (37,8°C), páratartalom (55-70%), és gépi (2 óránkénti) tojásforgatás mellett (Hemel Brutmaschine A70). A kikelt csirkéket 6 hétig tartottuk LD viszonyok közt, ahol víz és csirketáp szükség szerint volt elérhető. A fényforrás fehér fényű izzó volt, a tojásokat átlagosan 400 Lux, a csirkéket 600 Lux intenzitású fény érte. Kísérleti csoportonként 3-3 azonos fejlődési stádiumú csirkét dekapitáltunk 2, vagy 4 óránként. A minták gyűjtése 12, 24, vagy 36 órán át tartott.

IN VITRO KÍSÉRLETEK. A csirkéket a kísérlet napján 12:00-kor dekapitáltuk. A 6 hetes csirkékből (n=6) eltávolított tobozmirigyeket egyenként 3-4 darabra vágtuk, és az így nyert szövetdarabok keverékét 6 csoportra osztottuk, majd ezeket perfúziós rendszer (**3.**

ábra) 6 cellájába helyeztük. A csirke embriókból (n=18 db) eltávolított tobozmirigyeket egészben helyeztük a perifúziós rendszer 6 cellájába (cellánként n=3). A cellákon a szövettenyésztő médium (*Sigma Medium 199*) átáramlási sebessége 4 ml/h, hőmérséklete 37,8°C volt, LD (14h 225 Lux, 10h sötét), vagy DD környezetben. A mintavételt a rendszer elindítása után 30 órával kezdtük (másnap 18:00): minden 4. órában egy cella tartalmát gyűjtöttük, a felnőtt állatokból származó szövet-mintákat cellánként egy adagban, az embriókból nyert szövetmintákat cellánként 3 külön adagban. A PACAP-expozíciós kísérletben a második mintavételt megelőző 1 órában (20:00-21:00) a 2-6. cellákon 10 nM PACAP-38 (*Sigma A1439*) kezelést alkalmaztunk.

3. ábra. Perifúziós rendszer sémája. A médium 1 mm belső átmérőjű tefloncsövön áramlik a vízfürdőben tartott lombikból egy 2 állású csapon át a cellához (Ann Arbor Plastics), majd a perisztaltikus pumpán át a gyűjtőedénybe. Az elfolyó médium melatonin meghatározását (RIA) nem minden esetben végeztük el, azok eredményeit a dolgozat nem tartalmazza. A rajzot Matkovits Attila készítette.



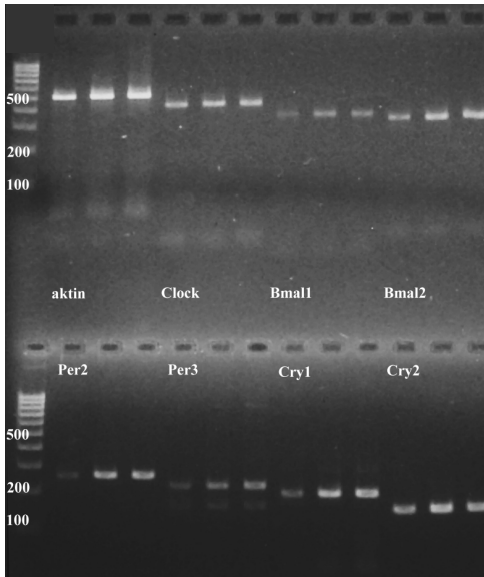
STATISZTIKAI ANALÍZIS. A standardgörbék készítésekor a hígítási sorokból nyert (RT)-PCR termékek közötti fluoreszcencia-különbségeket *t-próbával* (egymintás, homoscedasztikus, egyvégű) ellenőriztük. Az *in vivo* kísérleteknél a különböző időpontokban gyűjtött minták közti különbségeket varianciaanalízissel (egy-utas ANOVA) és *Tukey-féle post hoc* teszttel határoztuk meg. A normál LD ciklustól eltérő megvilágítás hatásait az óragén-expresszió 24 órás mintázatára szintén varianciaanalízissel (két-utas ANOVA) és kétmintás *t-próbával* (kétmintás, kétvégű, egyenlőtlen varianciájú) vizsgáltuk. Az *in vitro* kísérleteknél a 6 hetes csirkékből származó, egy kísérleten belül különböző időpontokban gyűjtött minták közti különbségeket *non-parametrikus* módszerrel határoztuk meg. A különböző időpontokban gyűjtött minták közti különbségeket *Wilcoxon-féle előjeles rang próbával*, a normál LD ciklustól eltérő megvilágítás hatásait az óragén-expresszió 24 órás mintázatára *Mann-Whitney-féle u*-teszttel vizsgáltuk. Az embriókból származó, egy *in vitro* kísérleten belül különböző időpontokban gyűjtött minták közti különbségeket varianciaanalízissel (egy-utas ANOVA) és *Tukey-féle post hoc* teszttel határoztuk meg. A PACAP-38 kezelés hatásait az óragén-expresszió 24 órás mintázatára szintén varianciaanalízissel (két-utas ANOVA) és kétmintás *t-próbával* (kétmintás, kétvégű, egyenlőtlen varianciájú) vizsgáltuk.

Szignifikancia-határnak $p=0,05$ -öt tekintettük minden statisztikai próbánál.

ÓRAGÉNEK AZONOSÍTÁSA CSIRKE TOBOZMIRIGYBEN

EREDMÉNYEK

Az általunk tervezett oligonukleotid primerpárok közül mindegyikkel sikerült csirke tobozmirigy RNS preparátumból diszkrét nagyságú RT-PCR terméket nyerni (**4. ábra**). A reakciókban a tervezetthez nagyságban hasonló termékeket kaptunk. Az RT-PCR paraméterek kisebb változtatásai mellett minden alkalommal detektáltuk a *bmal1*, *bmal2*, *per2*, *cry1* és *cry2* gének mRNS-eit, míg *clock*, *per1* és *per3* termékeket csak eltérő PCR paraméterek mellett sikerült kimutatni. A *per1*, *per3* és *cry1* esetében megjelenő másodlagos, halványabb csíkok közül a *cry1* méretben megfelelt az intront is tartalmazó DNS szakasz várt méretével. A *cry1* cDNS és genomiális DNS szakasz szekvenciáinak meghatározása alapján a homológia az emlős és csirke *cry1* gén között a vizsgált cDNS szakaszon 86%-os, a várt arányú volt. A genomikus DNS-ből nyert PCR-termék intron-szakasznak megfelelő része 98%-ban megegyezett az időközben más kutatócsoport által is



azonosított csirke *cry1* génben megtalálható szakasszal, mely az egér genomban nem fordul elő. A *cry1* mellett a *cry2* és a *clock* primerek működtek megbízhatóan az általunk később standardizált egylépéses szemikvantitatív RT-PCR módszerben. A *cry2* és *clock* PCR termékek szekvenciáját ekkor ellenőriztük, melyek 99%-ban azonosnak bizonyultak a tervezéshez használt templátokkal. A többi génnel ellentétben *per1* expressziót nem sikerült reprodukálható módon kimutatnunk, és továbbra sincs irodalmi adat a madár *per1* gén létezéséről.

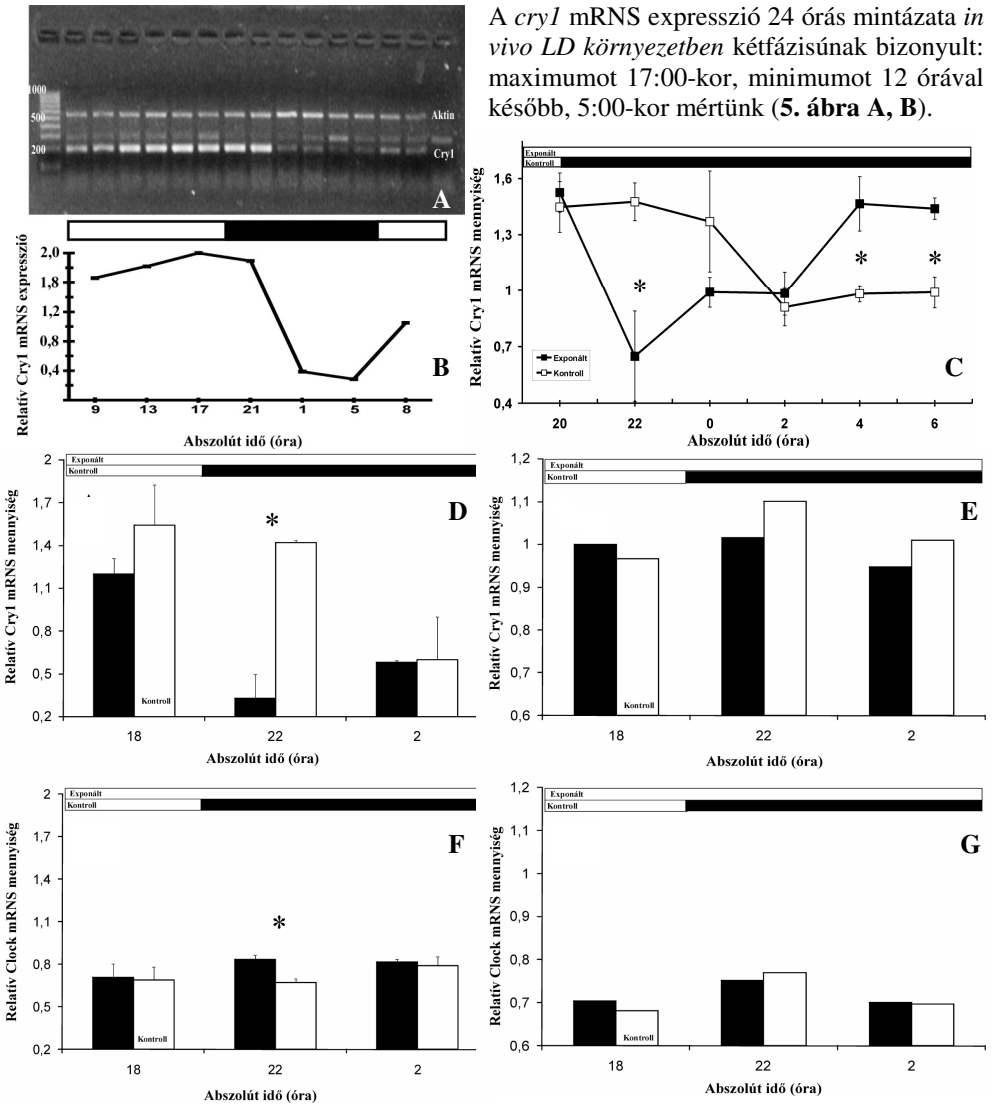
4. ábra. Csirke tobozmirigy RNS minták RT-PCR reakciótermékei, agaróz gélen, etidium-bromid festéssel.

MEGBESZÉLÉS

Eredményeink számos más, időközben megjelent közleménnyel összhangban alátámasztják, hogy a madár tobozmirigyben az emlős óragének homológjai kifejeződnek. Igazolták a csirke CLOCK/BMAL óraprotein-komplex *in vitro* E-box kötődését, transzkripció aktiváló szerepét, és ennek gátlását csirke CRY1 proteinek ko-expressziója esetén. Mindezen adatok arra utalnak, hogy a csirke tobozmirigy autonóm oszcillációja hátterében az emlősökben már leírt óragén-expressziós feed-back szabályozás állhat.

FÉNY HATÁSA AZ ÓRAGÉN MRNS-EXPRESSIONÁRA 6 HETES CSIRKÉK TOBOZMIRIGYÉBEN

EREDMÉNYEK

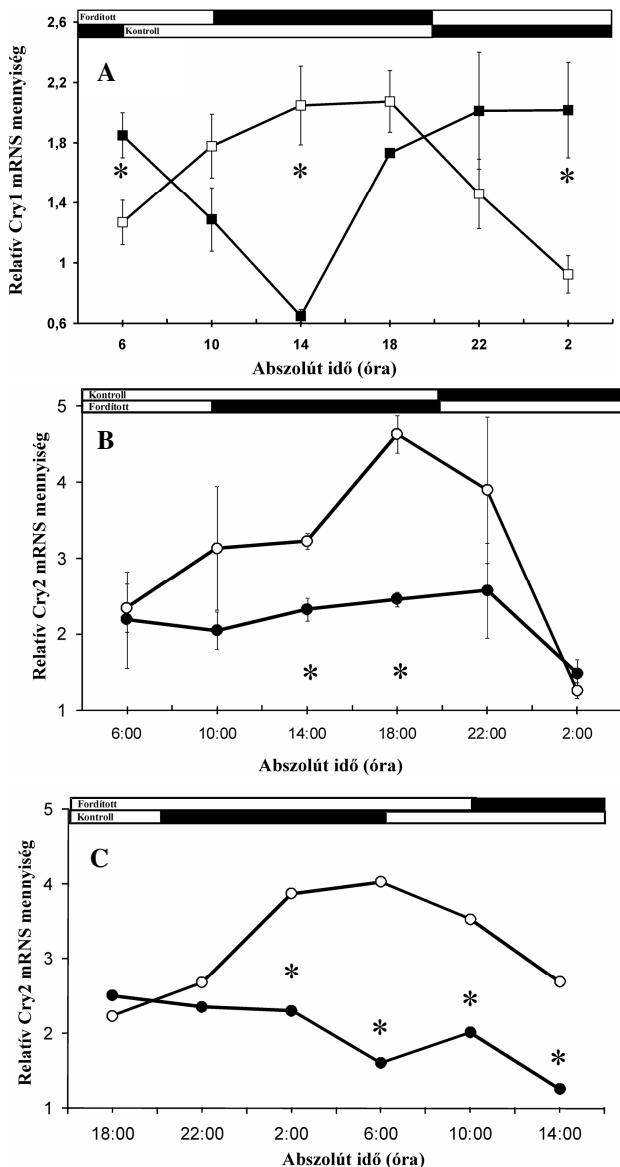


5. ábra. A fény hatása csirke tobozmirigy *cry1* (A-E) és *clock* (F-G) mRNA szintjeinek változására *in vivo* (A-D, F) és *in vitro* (E, G). A vízszintes sávok a környezeti fényviszonyokat jelzik (üres: fény, teli: sötét). Az adatpontok és oszlopok minden időpontban a relatív mRNA expresszió átlagát (+/- SEM, C,D,F) ábrázolják, az *exponált* (teli) és a *kontroll* (üres) csoportban (C-G). A kontroll-hoz képest mért szignifikáns eltérést * jelöli.

Éjszakai megvilágítás hatására *in vivo* a *cry1* mRNS mennyiség 22:00 órára csökkent (50%), 4:00 és 6:00 órára növekedett (140%, **5. C-D**); a *clock* expresszió a 22:00-kor fokozottabb volt (115 %, **5. F**) a kontrollhoz viszonyítva. *In vitro* éjszakai megvilágítás hatására sem a *cry1*, sem a *clock* esetében nem volt eltérés az exponált és a kontroll adatok között (**5. E, G**).

Fordított megvilágításban (10h sötét/14h fény, DL) *in vivo* a *cry1* mRNS-expresszió 24 órás mintázata 6:00 órára növekedett (140%), 14:00 órára csökkent (30%), majd 2:00 órára ismét növekedett (200%) a kontrollhoz viszonyítva (**6. A**). A *cry2* expresszió a DL csoportban 6:00-22:00 között lényegében nem változott, 18:00-2:00 között 70%-ára csökkent (**6. B**). A kontrollhoz viszonyítva 14:00-18:00 között mértünk csökkent *cry2* mRNS mennyiségeket (70% és 50%, **6. B**).

In vitro fordított megvilágítás hatására a *cry2* mRNS szint a vizsgálat ideje alatt folyamatosan csökkent (50%-ára, **6. C**). A *cry2* expresszió 24 órás mintázata a kontroll csoportban 6:00-ig növekedett (sötét-ben), majd ezután csökkent. A DL csoportban a kontrollhoz viszonyítva 2:00-14:00 között mértünk csökkent *cry2* mRNS mennyiségeket (40%-70%).



6. ábra. Fordított megvilágítási ciklus hatása csirke tobozmirigy *cry1* (A) és *cry2* (B-C) mRNS szintjeinek változására *in vivo* (A-B) és *in vitro* (C). Az ábra jelölései hasonlóak az 5. ábrához.

MEGBESZÉLÉS

LD környezetben az óragének expressziós mintázata csirke tobozmirigyben nem az emlős tobozmirigyéhez hasonló, hanem az emlős SCN-éhez. A *cry1* fázisgörbe maximumértékei a nappali megvilágítási szakasz közepére (*in vitro* – irodalmi adat) vagy végére esnek (*in vivo* – **5. A-C**), tehát az eltérő útvonalakon (retina vs. tobozmirigy saját fotopigmentjeiből) érkező fényinformációk a *cry1* kifejeződését alapvetően serkentik. Az *in vivo* mintázat késése a neurohumorális környezet moduláló szerepére utal. A *cry2* esetében ez a késés 180°-os: a *cry2* mRNS ritmus *cry1*-éhez hasonló *in vivo* lefutását (**6. A-B**, kontroll) a neurohumorális szabályozás vezérli, míg *in vitro* a 180°-ban késleltetett *cry2* fázisgörbe (**6. C**, kontroll) kizárólag a tobozmirigy saját oszcillátora és fotopigmentjéhez kapcsolódó eltérő jelátviteli folyamatokat tükrözi. A *clock* gén expressziós mintázata is hasonlít a *cry1*-ére *in vivo* LD körülmények között, de kisebb amplitúdójú (irodalmi adat).

Az *éjszakai megvilágítás* 2 órán belül átmeneti *cry1* mRNS-szint csökkenést okozott *in vivo* (**5. C-D**). A *cry1* gén fény általi indukciója az emlős SCN modellhez hasonlóan a csirke tobozmirigyben is kizárólag közvetett lehet. A *clock* mRNS-szint is megváltozott, de a *cry1*-gyel ellentétben emelkedett (**5. F**), vagyis az *in vivo* váratlan időben jelentkező (éjszakai) megvilágítás egyszerre több génszabályozási út azonnali aktiválásával különböző óragén-expressziós válaszokat okozhat csirke tobozmirigyben is. *In vitro* körülmények között alkalmazott hasonló fényexpozíció azonban nem befolyásolta a *cry1* és *clock* óragén-expressziót (**5. E, G**), tehát a gyors alkalmazkodáshoz a neurohumorális környezet szükséges. A *cry2* vizont eltérést mutatott az *in vitro* éjszakai megvilágítás alatt (**6. C**, 18:00-6:00), így az *in vivo* azonos expressziós fázisgörbét mutató *cry1* és *cry2* óragéneket a pineális fotoreceptorok valóban eltérő útvonalon befolyásolhatják.

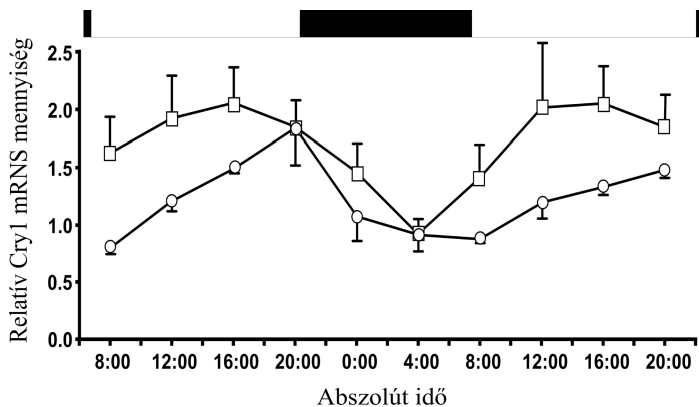
Fordított megvilágítási ciklus (DL) hatására a *cry1* expresszió mintázata *in vivo* 24 órán belül megfordult úgy, hogy a magasabb *cry* mRNS szint továbbra is a megvilágítási szakaszt reprezentálja (**6. A**). A fény *in vivo* *cry1* expressziót fokozó hatása nem közvetlen, mert az első éjszakai megvilágítás elején átmenetileg csökkent (22:00, **5. C-D**), a második éjszakai megvilágítás előtti sötét szakasz végén pedig növekedett a *cry1* mRNS mennyiség (18:00, **6. A**). Mindez arra utal, hogy az *in vivo* váratlan időben (éjjel) érkező fényinformáció olyan jelátviteli útvonalakat befolyásol, melyek hatására nemcsak a *cry1* expresszió, hanem maga a molekuláris oszcillátor fázisgörbéje is 24 órán belül megváltozik csirke tobozmirigyben. Az *in vitro* vizsgálatunkban a *cry2*-expresszió az *in vivo* adatokhoz képest éppen ellenkező fényfüggő változást mutatott (**6. C**): ugyanabban az időpontban (22:00-6:00) alacsonyabb mRNS-szinteket mértünk megvilágítás alatt (DL), mint sötétben (LD), mely ismét arra utal, hogy a lokális fotoreceptorok és a neuroendokrin stimulusok lényegesen eltérő jelátviteli mechanizmusokkal szabályozhatják a *cry2* óragén mRNS-mennyiségét. A *cry1*-gyel ellentétben a *cry2* génextpresszió ritmusa az első 24 órán belül nem fordult meg *in vivo* DL körülmények között (**6. B**). Alacsony *cry2* mRNS-szinteket mértünk mindkét csoportban (DL vs. LD) ugyanabban az időpontban (2:00, **6. B**), a megvilágítástól függetlenül (fény vs. sötét). Az *in vivo* váratlan időben (éjjel) érkező megvilágítás a hatásokat tekintve ellentétes jelátviteli útvonalakat is befolyásolhat, mert 2:00-kor a DL csoportban a megvilágítás, az

LD csoportban annak hiánya idején volt alacsonyabb a *cry2* mRNS-szint (6. B). Az aktiváló hatás a fény által kiváltott neuroendokrin stimulusokhoz (*in vivo*, 6. B), a gátlás a lokális fotoreceptorokhoz köthető (*in vitro*, 6. C). Ezek *in vivo* interakciói elfedhetik a 180°-ban megváltozott fázisgörbéjű oszcillátor szabályozó hatásának érvényesülését az első fordított fény/sötét ciklusban, azaz megakadályozzák a *cry1*-éhez hasonló gyors fázis-adaptációt (6. A-B). Az *in vitro* adataink igazolják ezt a késleltetést, mert a *cry2* expresszió az első fordított megvilágítási ciklus (DL) teljes ideje alatt alacsonyabb volt az LD csoport értékeihez képest (6. C). Ez egyben azt jelenti, hogy csirke tobozmirigy óramodellben *in vivo* a pinealocyták fotoreceptorai által váratlanul kiváltott intracelluláris hatásokat a *cry2* transzkripció változásai tükrözhetik jobban, míg a retina felől érkező váratlan neuroendokrin stimulusokat a *cry1* és a *clock*.

AZ ÓRAGÉN-EXPRESZIÓ 24 ÓRÁS MINTÁZATÁNAK KIALAKULÁSA CSIRKE EMBRIÓK TOBOZMIRIGYÉBEN

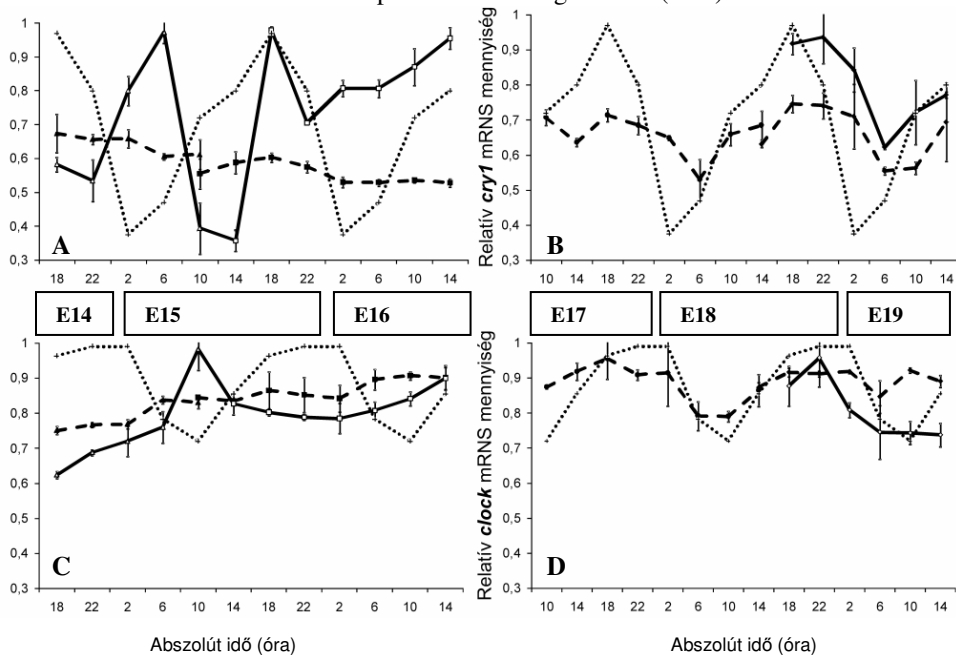
EREDMÉNYEK

Az LD környezetben inkubált csirke embriókban *in vivo* kétfázisúnak bizonyult a *cry1* expresszió 24 órás mintázata: maximumot 20:00-kor, minimumot 12 órával később, 8:00-kor mértünk (7. ábra). A 6 hetes csirkéknél hasonló volt a mintázat: maximumot 16:00-kor, minimumot 12 órával később (4:00) mértünk.



7. ábra. Csirke tobozmirigy *cry1* mRNS szintjeinek változása *in vivo* normál (LD) megvilágítási ciklusban. A vízszintes sáv a környezeti fényviszonyokat jelzi (üres: fény, teli: sötét). Az adatpontok minden időpontban a relatív mRNS expresszió átlagát ábrázolják (+, vagy - SEM), az embrió (kör) és a 6 hetes kikel állatok (négyzet) csoportjában.

A DD környezetben inkubált csirke embriókban *in vivo* a *cry1* expresszió a 13-15. embrionális napokon folyamatos, enyhe csökkenést mutatott (80%-ra), míg *clock* mRNS-t csak a 14. naptól detektáltunk (8. A, C). A 16. nap végéig továbbra is csak enyhe, folyamatos változást mérünk mindkét gén esetén (8. A, C). A *cry1* mRNS-szint az 17. napon már emelkedett (125%-ra). A 18. nap elejére mind a *cry1*, mind a *clock* expresszió csökkent (25% és 10%-kal, 6:00), majd a nap végére ismét növekedett (8. B, D). A 19. nap elejére is csökkent a *cry1* expresszió (10%-kal, 6:00), majd ismét emelkedett (8. B). Az eltérés a *clock* esetében a 19. napon nem volt szignifikáns (8. D).



8. ábra. A *cry1* (A, B) és *clock* (C, D) mRNS szint változása állandó sötétben inkubált csirke embriók tobozmirigyében *in vivo* (szaggatott vonal) és *in vitro* (folyamatos vonal). Az adatpontok minden időpontban a relatív mRNS expresszió átlagát ábrázolják (+/- SEM). A pontozott vonal az *in vivo* LD környezetben nevelt 6 hetes csirkékből nyert tobozmirigyek óragén-expressziós mintázatát mutatja. A négyzetövek az embrionális stádiumot jelölik (e.g. E15 = 15. embrionális nap).

A DD környezetben inkubált csirke embriókban *in vitro* a *cry1* expresszió a 15. nap elején, 6:00-kor mutatott maximumot (160%), majd a kezdeti értékek alá csökkent (8. A). A *clock* mRNS-szint a 15. napon 10:00-kor érte el csúcserőértékét (160%, 8. C). A 15. nap végén, 22:00-kor a *cry1* expresszió minimumot mutatott (75%), majd a 16. napon folyamatosan a kezdeti értékekre emelkedett (8. A). A *clock* mRNS-szint a 16. napon enyhén emelkedett (10%, 8. C). A 18. napon azonban mind a *cry1*, mind a *clock* expresszió 22:00-kor mutatott maximumot, majd a 19. napon 6:00 és 10:00 között minimumértékre csökkent (50%-ra és 80%-ra, 8. B, D). 14:00-ra a *cry1* ismét emelkedett.

MEGBESZÉLÉS

Irodalmi adatok alapján *in vivo* LD körülmények között az E18 stádiumú csirkék tobozmirigyében a fényvel indukálható *per2* expresszió ritmusos. Adataink szerint a fényvel közvetlenül nem indukálható *cry1* óragén expressziója is ritmusos a hasonló körülmények között inkubált E17-18 stádiumú embriók tobozmirigyében (**7. ábra**). A *cry1* fázisgörbe közel megegyezett az előzőleg LD környezetben tartott 6 hetes csirkék tobozmirigyében mérttel, mind a maximumértékek ideje, mind az amplitúdó tekintetében (mindkét csoportban 200%). Mindez arra utalhat, hogy ebben a stádiumban (E17) már működik a környezeti ingerekhez szinkronizált molekuláris oszcillátor.

A tobozmirigy neuroendokrin szabályozásának szerepét az oszcillátor *elindításában* DD körülmények között inkubált csirke embriókon vizsgáltuk. A tobozmirigy *cry1* expressziója *in vivo* E13-16 között folyamatosan csökkent, míg a *clock* mRNS-szint ez idő alatt enyhén, fokozatosan növekedett (**8. A, C**, szaggatott vonal). Cirkadián ritmust egyik esetben sem mértünk a szerv szintjén, mely a sejtek közötti szinkronizáció hiányára, vagy a sejszintű oszcillátor működésének hiányára egyaránt utalhat. Az ellentétes irányú mRNS-szint változás ebben a stádiumban a *cry1* és *clock* gének eltérő transzkripció szabályozására is utalhat. Az E16-19 fejlődési szakaszban mindkét vizsgált óragén szervszintű expressziós mintázata megváltozott, mert a korábbi (E13-16), viszonylag állandó értékeket 24 órán belül jelentkező epizodikus mRNS-szint növekedés és csökkenés váltotta fel (**8. B, D**, szaggatott vonal). További eltérés, hogy a 17-19. napokon a *clock* mRNS-expressziós görbe már nem fordított, hanem hasonló lefutást mutatott a *cry1*-hez viszonyítva, ahogy az a kikelt csirkékben is tapasztalható. Mindezek arra utalhatnak, hogy a molekuláris oszcillátor elindításához, vagy a már működő oszcillátor-egységek (sejtek) szinkronizálásához szükséges transzkripció változások *in vivo* a 16. naptól jelentkeznek, melynek hátterében nem környezeti, hanem neuroendokrin és/vagy parakrin hatások állhatnak. Mindkét vizsgált gén esetében a 17-19. napon DD körülmények között megjelenő napi ritmus lényegesen alacsonyabb amplitúdó mellett volt megfigyelhető, mint 6 hetes (kikelt) csirkékben, vagy az azonos fejlődési stádiumú, LD körülmények között keltetett csirke embriókban (**7. ábra**). Az amplitúdó-különbséget az okozhatja, hogy LD környezetben a fotoreceptor sejtek és a pinealocyták feltételezhetően nagyobb hányada tud egymáshoz szinkronizálódni. A csirke tobozmirigy modellben a jelátviteli útvonalak periodikus környezeti ingerek általi *in vivo* aktiválása tehát nem a molekuláris oszcillátor elindításához szükséges, hanem elősegíti az *in vivo* nagyobb amplitúdójú ritmus kifejeződéséhez az intercelluláris szinkronizációt. Hasonló összefüggés figyelhető meg az emlős SCN működésének postnatalis fejlődésében is, ahol *in vivo* a periodikus megvilágítás nagyobb arányú szinkronizációt okoz a neuronok között, mint az DD környezetben tapasztalható. Zebraadánió tobozmirigy modellen azonban szükséges legalább egyetlen fényimpulzus az *in vivo* szinkronizált óraműködés kialakításához. Mindez megerősíti a korábbi feltételezést, hogy a madár tobozmirigy a hal tobozmirigyhez és az emlős SCN-hez viszonyítva különösen alkalmas modell a cirkadián ritmus kialakításáért felelős neuroendokrin és parakrin szabályozások vizsgálatára, mert a

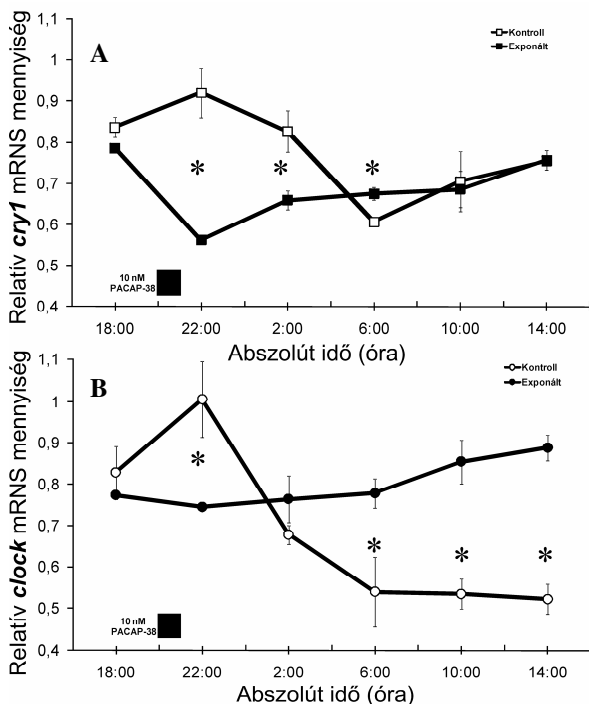
környezeti megvilágítás- vagy az anyai *zeitgeber* hiányában is elindul a sejtszintű oszcilláció, és a szerv szintjén a sejtek egymáshoz szinkronizálódhatnak.

Az *in vivo* adatokkal ellentétben *in vitro* minden vizsgált stádiumban szignifikáns változást mértünk az állandó sötétben inkubált csirke embriókból nyert tobozmirigyek óragén-expressziós mintázataiban (8. ábra, folyamatos vonal). Az *in vivo* és *in vitro* adatok eltérése a lokális (parakrin) és a neuroendokrin stimulusok különbözőségét jelzi: az epizodikusan fellépő intra- vagy intercelluláris szignálok serkentő hatását a neuroendokrin stimulusok gátolhatják. A *cry1*-gyel ellentétben a *clock* expressziós fázisgörbék *in vivo* és *in vitro* alapvetően hasonló lefutásúak, mely arra utal, hogy az E17 stádium előtt a *cry1* *in vivo* transzkripciós szabályozása inkább a neuroendokrin környezettől, míg a *clock* expresszió alapvetően csak az intra- és intercelluláris folyamatok változásaitól függ.

Az *in vitro* kísérleteink is igazolták, hogy a csirke tobozmirigy ontogenezise során a 14-17. napok között periodikus környezeti inger hiányában is lényeges változás történik az óragének transzkripciós szabályozásában. Az E13-14 stádiumokkal ellentétben az E17 tobozmirigyekben DD környezetben mind a *cry1*, mind a *clock* expressziója hasonló 24-órás mintázatot mutatott 22:00-kor mérhető maximumértékkel (8. B, D). Egymáshoz hasonlóak a *cry1* és a *clock* mRNS-expressziós fázisgörbék az LD környezethez szinkronizált kikelt csirkék tobozmirigyében is *in vitro* DD környezetben. A cirkadián molekuláris oszcillátorok már az E17 stádiumtól ugyanígy, egymáshoz szinkronizáltan működhetnek *in vitro*, periodikus fizikai vagy neuroendokrin inger hiányában is. Ez azt jelentheti, hogy nem a neuroendokrin környezet hajtja az *in vivo* ugyanebben a stádiumban jelentkező óragén-expressziós ritmust. Az azonban adataink alapján nem zárható ki, hogy neurohumorális stimulusra szükség lehet az oszcillátor elindításához.

PACAP-38 HATÁSA A *CRY1* ÉS A *CLOCK* EXPRESSZIÓ 24 ÓRÁS MINTÁZATAIRA CSIRKE EMBRIÓK TOBOZMIRIGYÉBEN

9. ábra. 10 nM PACAP-38 kezelés hatása *in vitro* a *cry1* (A) és *clock* (B) mRNS szint változása állandó sötétben inkubált csirke embriók tobozmirigyében. Az adatpontok minden időpont-ban a relatív mRNS expresszió átlagát ábrázolják (+/-SEM) a kontroll (üres) és exponált (teli) csoportokban. A kontroll-hoz képest mért szignifikáns eltérést * jelöli.



EREDMÉNYEK

A 17. embrionális napig DD környezetben inkubált csirke embriókból nyert tobozmirigyeket *in vitro* DD környezetbe helyeztük, és a 18. napon 20:00-kor 1 órán át 10nM PACAP-38 kezelést alkalmaztunk a szövetmintákon.

A kezelést követő 2. órában mind a *cry1*, mind a *clock* expresszió csökkent a kontrollhoz képest (60% és 75%, **9. ábra**). Később, 6:00-tól a *cry1* expresszió a kontroll értékek tartományában változott, a *clock* mRNS-szintek meg is haladták azokat (150%).

MEGBESZÉLÉS

Az állandó sötétben inkubált csirke embriók (E17) tobozmirigyében az emlős SCN-ben hatásosnak leírt 10 nM dózisu, és hasonló időben alkalmazott PACAP-38 kezelés mind a *cry1*, mind a *clock* mRNS szinteket csökkentette a kezelést követő 2 órán belül (**9. ábra**). Bár más dózisu és időzítésu kezelés hatásait nem vizsgáltuk, kísérletünkben mindkét, ellentétes funkciójú óraprotein 24-órás génexpressziós mintázata megváltozott, vagyis a PACAP-nak csirke tobozmirigyben is fontos szerepe lehet a molekuláris oszcillátorok szinkronizációjában. Ugyancsak erre utal, hogy a csirke tobozmirigyben is jelen vannak PAC₁ és VPAC₁ receptorok, az emlős SCN-ben leírtakhoz hasonló jelátviteli útvonalak, valamint PACAP-immunpozitív rostvégződéses is, melyek a *ggl. trigeminale*-ből erednek.

A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK

- (1) *In vivo* csirke tobozmirigy modellben a pineális fotorecepció által váratlanul kiváltott intracelluláris hatásokat a *cry2*, míg a retina felől érkező váratlan neuroendokrin stimulusokat a *cry1* és a *clock* transzkripciósz változásai tükrözik.
- (2) A *cry1* és *clock* génexpresszió szabályozása csirke tobozmirigyben a retina felől érkező váratlan neuroendokrin stimulusok hatására gyorsan (2 órán belül) alkalmazkodhat. A *cry1* és *cry2* óragének fény általi indukciója a *period* génekével ellentétben közvetett.
- (3) A molekuláris oszcillátor elindításához szükséges, a fejlődő csirke tobozmirigyében *in vivo* a 16. embrionális naptól jelentkező transzkripciósz változásokat olyan neuroendokrin és/vagy parakrin hatások okozzák, melyek a fizikai környezet (fény, hőmérséklet) periodikus változásaitól függetlenek.
- (4) A cirkadián oszcillátorok szinkronizációjában fontos szerepe lehet a PACAP-nak a csirke tobozmirigy óramodellben is.

PUBLIKÁCIÓK

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ FOLYÓIRATCIKKEK

- (1) Csernus Valér, Faluhelyi Nándor és Nagy András Dávid: Features of the circadian clock in the avian pineals. - *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1040: 281-287. 2005. [IF: 1.971]
- (2) Csernus Valér, Nagy András Dávid és Faluhelyi Nándor: Development of the rhythmic melatonin secretion in the embryonic chicken pineal gland. - *Gen. Comp. Endocrinol.* 152: 144-147. 2007. [IF: 2.562]
- (3) Nagy András Dávid és Csernus Valér: *Cry1* expression in the chicken pineal gland: effects of changes in the light/dark conditions. - *Gen. Comp. Endocrinol.* 152: 148-153. 2007. [IF: 2.562]
- (4) Nagy András Dávid és Csernus Valér: The role of PACAP in the circadian regulation of clock gene expression in the chicken pineal gland. - *Peptides* 28: 1767-1774. 2007. [IF: 2.368]
- (5) Nagy András Dávid, Kommedal Siri, Seomangal Karishma és Csernus Valér: Circadian Expression of clock genes *clock* and *cry1* in the embryonic chicken pineal gland. - *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1163: 484-487. 2009. [IF: 2.303-2008]
- (6) Nagy András Dávid, Seomangal Karishma, Kommedal Siri és Csernus Valér: Expression of *cry2* in the chicken pineal gland: effects of changes in the light/dark conditions. - *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1163: 488-490. 2009. [IF: 2.303-2008]

EGYÉB FOLYÓIRATCIKKEK

Rácz Boglárka, Horváth Gabriella, Faluhelyi Nándor, Nagy András Dávid, Tamás Andrea, Kiss Péter, Gaszner Balázs, Gallyas Ferenc, Tóth Gábor, Csernus Valér és Reglődi Dóra: Effects of PACAP on the circadian changes of signaling pathways in chicken pinealocytes. - *J Mol Neurosci* 36: 220-6. 2008. [IF: 2.06]

KÖNYVFEJEZETEK

Csernus V., Nagy A. D., Faluhelyi N.: The control of MT release from mammalian and avian pineal glands. - In: *Melatonin: from Molecules to Therapy*. S. R. Pandi-Perumal, D.P. Cardinali (eds.). Nova Science Publishers Inc., New York (2006).

TUDOMÁNYOS ELŐADÁSOK NEMZETKÖZI KONGRESSZUSOKON: 13

TUDOMÁNYOS ELŐADÁSOK HAZAI KONGRESSZUSOKON: 14

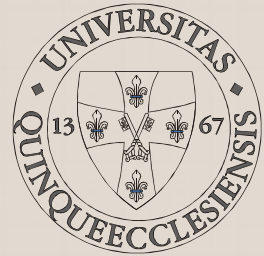
SZEMINÁRIUMOK, WORKSHOPOK, KONGRESSZUS-SZERVEZÉS: 5

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS. A témavezetőm által biztosított lehetőség és szakmai vezetés nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Köszönöm a PTE ÁOK Anatómiai-, Orvosi Biológia-, Immunológia-, Patológia-, Mikrobiológia-, Közegészségtan- és Laboratóriumi Medicina Intézetek érintett dolgozóinak értékes módszertani javaslatait, szakmai és formai kritikáit. Köszönöm a kellemes munkahelyi légkört, az asszisztencia segítőkészségét és a TDK hallgatók lelkesedését. Mindezekre szükség volt a sikeres szerepléshez hazai és nemzetközi szakmai megmérettetéseken.

PH. D. THESIS (SUMMARY)

**CLOCK GENE EXPRESSION STUDIES
ON THE CHICK PINEAL CLOCK MODEL**

Dr. András Dávid Nagy



University of Pécs, Faculty of Medicine, Department of Anatomy

Theoretical Medical Sciences Doctoral School

Leader: Dr. László Lénárd

Neuroendocrinology and Neurohistology Doctoral Program

Leader: Dr. Valér Csernus

Advisor: Dr. Valér Csernus

Pécs, 2010.

INTRODUCTION

CIRCADIAN BIOLOGICAL RHYTHMS. There is an increasing need for knowledge about endogenous timing mechanisms affecting the boundaries of human performance: health and disease. Biological rhythms are phenomena recurring in a living organism with a typical period length by which periodical changes in the environment (light, temperature, food availability, stress, *etc.*) can be anticipated. *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). Circadian rhythms are ubiquitous in biology showing the following rules: (1) it is endogenous: the rhythm still keeps running with a period length close to but never exactly 24 h in an artificially nonperiodic environment of *constant* darkness, temperature and humidity (referred as DD). (2) Within one period, the actual stage (phase) of the rhythm can be easily shifted with a proper environmental stimulus (*zeitgeber*: german „time giver”).

THE CIRCADIAN CLOCK. Biological mechanisms driving circadian rhythms were referred to *biological clocks* from the 1960's. *Circadian clocks* work with remarkable precision, having all the components of the pacemaking oscillator within a cell. Repetition is controlled in *eukaryotes* at the transcriptional level with negative feed-back. It became clear only in the 1990's that the feed-back loop consists of only two complexes made up of activator or repressor clock proteins encoded by the *clock genes*. CLOCK/BMAL heterodimers enter the nucleus and bind to *E-box* promoter elements, thereby inducing

transcription. E-boxes are found in both *per* genes and *cry* genes, of which the protein products form heterodimers interacting with the CLOCK/BMAL complex in an inhibitory way. The inhibition is turned off by degradation of clock proteins which allows the initiation of a new cycle. This involves a secondary feed-back loop regulated by REV-ERB α and ROR α proteins (**Figure 1**).

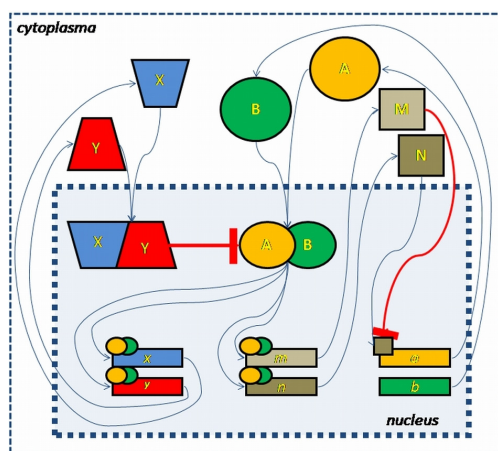


Figure 1. The molecular model of the circadian biological oscillator within a cell. Molecular interactions are discussed in the text. Key clock genes in vertebrates (rodents): a: *bmal*, b: *clock*, x: *per*, y: *cry*, m: *Rev-erb α* , n: *Ror α* .

THE ROLE OF THE CIRCADIAN CLOCK IN PHYSIOLOGY. The timer function of circadian oscillators is used not only by homeostatic regulatory systems, but also by the cardiovascular-, endocrine- and the immune system. Circadian rhythm is presented in a broad spectrum of physiological parameters as daily fluctuations with an average of 20-30% changes in the amplitude. Up to 90% of cell-specific genes may show 24 h rhythmic pattern in their expression. Furthermore, fundamental cellular processes (*e.g.* cell cycle) are under the control of the molecular oscillator, suggesting a more general

„housekeeping” role for the circadian clock in biology. Its involvement in the development and outcome of several endemic diseases has already been proven.

REGULATION OF THE CIRCADIAN CLOCK IN MAMMALS. The most obvious environmental stimulus in this process is the alteration of light/dark cycles. For decoding, *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGC)* play a key role, which project to non-image-forming brain areas. The *retinohypothalamic tract (RHT)* ends on the *suprachiasmatic nucleus (SCN)*, the ablation of which results in disruption of rhythmicity in key physiological functions. In mammals, the SCN is the primary pacemaker for circadian rhythms. Unlike other cellular oscillators (*e.g. fibroblast, hepatocyte*), SCN neurons oscillate and keep being synchronised to each other even in the absence of any *zeitgeber*, due to abundant intercellular connections. Light exposure at night induces in *retinorecipient* SCN neurons the expression of *c-fos*, *c-jun* and *per* genes resulting in phase-shift of all SCN-driven rhythms in physiological processes. The phase-dependency of this effect is controlled at the level of signalling. In the control of the light evoked signaltransduction of the SCN (Glu – NMDA-R - Ca²⁺_i - CaMK IV – b-Raf – MEK1 – ERK1 – MSK – CREB – CRE – *per*), PACAP plays a key role as a neuromodulator released from the RHT. After adjusted to the environmental light/dark cycle, the phase-signal is transmitted by SCN neurons to nearby hypothalamic centres (homeostats: body temperature, energy balance, sleep/wake, locomotor activity/inactivity; autonomic nervous system; *hypothalamo-hypophyseal* system). A characteristic phase-delay is seen between clock gene expression rhythms in SCN neurons *vs.* SCN-driven peripheral oscillators which is caused by tissue specific differences in receptors and signalling pathways. Among the SCN-driven endocrine organs, the pineal gland has a special role in the systemic control of circadian rhythms: (1) it serves with a special circulating *zeitgeber* signal (*melatonin*, „darkness hormone”) and (2) it is needed in the regulation of photoperiod dependent biological processes (*e.g.* seasonal breeders).

THE AVIAN PINEAL GLAND, AS A CIRCADIAN CLOCK MODEL. Although the 24 h rhythm of melatonin-secretion is a phylogenetically well conserved function, the *pineal body* shows significant species-specific morphological and functional differences. The avian pineal gland seems to be particularly useful for modelling circadian regulatory mechanisms, since it shows all the advantageous features listed below: (1) It is localised in the close proximity of the calvaria, where the bone is thin and translucent. (2) The presence of both cone-like *photoreceptor cells* and *pinealocytes* indicates a phylogenetic change in the differentiation of pineal progenitor cells, in which the appearance of *pinealopetal* nerve fibres play a key role during ontogenesis. (3) The amplitude of melatonin-release can be influenced *in vitro* both by direct light exposure and by adrenergic (α_2) stimuli. (4) Unlike the pineal gland of mammals and other non-mammalian vertebrates, the avian pineal gland oscillates *in vitro* under DD conditions for >5 cycles, which makes it comparable with the mammalian SCN oscillator. (5) *Pinelectomy* in birds, but not in mammals may result in disruption of many circadian rhythms. (6) In contrast to the mammalian SCN, the avian pineal gland provides an *in vitro* model with both intact histomorphological structure and a complete isolation from the neuroendocrine/paracrine effects of nearby tissues. (7) The pineal gland of chicken can be obtained as a whole and can be subjected

for *in vitro* experimentation from as early as pre-hatch (embryonic) stages, thus making it an ideal model for studying environmental and genetical factors which are needed to develop and synchronise circadian rhythms independently from the maternal humoral environment.

By the late 1990's the mammalian SCN model has become accessible with a broad spectrum of genetical and molecular biological methods. In 1999, as I joined the student research group of the Anatomy Department (Medical School, University of Pécs), our aim was to proof the old hypothesis at the level of clock gene expression, *i.e.* the chicken pineal model is comparable to the mammalian SCN model with some features being more advantageous for the description of basic mechanisms of circadian rhythmic regulatory processes.

AIMS

- (1) At the beginning of our work we aimed to identify the clock genes of chicken.
- (2) To determine the 24 h pattern of clock gene mRNA expression in the chicken pineal gland, we planned to study chickens kept under normal light/dark (LD) conditions.
- (3) We planned *in vivo* and *in vitro* experiments in order to collect data about the role of pineal photoreceptors of the chicken in the control of clock gene expression by comparing the effects of different light/dark cycles.
- (4) The circadian rhythm of melatonin synthesis in the chicken pineal gland is controlled at the transcriptional level from the 17th embryonic day under LD conditions. To clarify if this developmental event was related to synchronised oscillation of the molecular clock, we compared the 24 h pattern of pineal clock gene mRNA expression between chicken embryos incubated under LD and 6 weeks old chickens kept under LD cycles.
- (5) Cellular oscillators may work in the chicken pineal gland already before hatching; however, it was not clear if environmental stimuli would be necessary to establish synchrony. To clarify this at the level of clock gene expression, we planned *in vivo* and *in vitro* experiments on chicken embryos incubated under constant darkness (DD).
- (6) It was speculated earlier that like in the case of the mammalian SCN, also avian pineal oscillators may use PACAP to establish synchrony. However, data collected before did not support this idea. In our study we wanted to answer the question, if a similarly timed and dosed *in vitro* PACAP treatment, which is comparable to what was reported in mammals to be effective, would have any effect on the 24 h pattern of clock gene mRNA expression in the pineal gland of chicken embryos incubated under DD conditions.

MATERIALS AND METHODS

OLIGONUCLEOTIDE PCR PRIMERS. At the beginning of our work there was no clock gene sequence known in birds, yet. Our attention was caught by the gene of the photosensitive clock protein CRY1: we were searching for homologue sequences based on the mouse *cry1* mRNA in a chick EST library (<http://www.chick.manchester.ac.uk>). Later, we used avian sequences for the examination of *per1*, *per2*, *per3*, *cry2*, *clock*, *bmal1* and *bmal2* clock genes, as these could be attained from GeneBank only later (**Table 1**). The oligonucleotide primerpairs were designed to overlap intronic sequences in the mouse genes. Furthermore, the size of RT-PCR products were set to 100-500 bp, and the size of genomic PCR products at least 100 bp longer. *Cry1* specific RT-PCR products were sequenced in the Pathology Department in 2001, while *cry2* and *clock* RT-PCR products were sequenced in the Laboratory Medicine Department in 2008.

Clock genes	GeneBank ID codes	Species	forward primer sequence	Reverse primer sequence	Predicted product size	Intron size
<i>clock</i>	AF 246959	chicken	tcccagctctctggacaacc	gctgttgctggatcatgtgt	420	800
<i>bmal1</i>	AF 246957	chicken	tggcagaccaaggatgg	ttcagacatagcgttgcac	370	700
<i>bmal2</i>	AF 246958	chicken	atgcacaacaaccgaacatc	caatgttgctccattggaage	330	900
<i>per1</i>	NM 011065	mouse	cggagctctctgggttc	cccaggggatgggactc	275	1200
<i>per2</i>	AF 246956	chicken	caatggctcacacgaacct	gggacagctgtagctgtggt	250	1050
<i>per3</i>	AY 046567	chicken	cacaggttcagcagcatcag	atcatcaccaggctgactc	225	1300
<i>cry1</i>	AY 034432	chicken	gaatgctggaagctgatgtg	ccttctggacactctctgg	200	100
<i>cry2</i>	AY 034433	chicken	acaagccaccctcacctac	gatgggaccccatcacatc	150	700

Table 1. PCR primers for the detection of chicken clock gene mRNA and genomic DNA.

Those primer pairs were selected which would amplify RNA and genomic DNA fragments with the sizes (basepairs, bp) indicated above.

REAGENTS. For total RNA extraction of tissue specimens, TRI reagent was used (Sigma T9424). Applied Biosystems' MuLV reverse-transcriptase (N8080018) was used in the RT reaction and Sigma's RedTaq (D4309) for the PCR. The agarose gel-electrophoresis was run in TAE buffer. Ethidium-bromide (Sigma E1385) or SYBR Green I (Sigma S9430) was used for nucleic acid staining.

ANIMALS, TISSUE SAMPLING. Chicken mRNA and genomic DNA samples were obtained from pineal glands of white *Leghorn* chickens (Pécs-Reménypuszta Poultry Processing Ltd.). All efforts were made to minimize animal suffering. Chickens were decapitated right before collecting pineal samples.

SEMIQUANTITATIVE RT-PCR. To normalize the efficiency of RT reactions and the differences in initial RNA contents, an internal standard of β -actin gene was used. One-

step RT-PCR protocol was optimized for the processing of pineal RNA samples. The reaction parameters were as follows: first strand synthesis 42°C 15 min, denaturation 94°C 5 min, amplification for 26 cycles (94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min), and final extension of 72°C 7 min. The protocol was set for *clock*, *cry1* and *cry2* primers with 1,5 mM of Mg²⁺ concentrations. RT-PCR products were separated with gel-electrophoresis of 5 µl of the reaction mixture. The agarose gel was stained with SYBR Green followed by transillumination with blue light (Dark Reader, Clare Chemical, USA). For the detection of emitted fluorescent signals we constructed a gel documentation system (tent, Canon A510 LCD camera, amber filter - Clare Chemical). SYBR Green fluorescence of PCR products were determined from the mean of background-subtracted pixel intensities of DNA bands (Figure 2). Fluorescence of *clock* gene RT-PCR products were normalized to those of β -actin: the obtained relative values were subjected to statistical analysis.

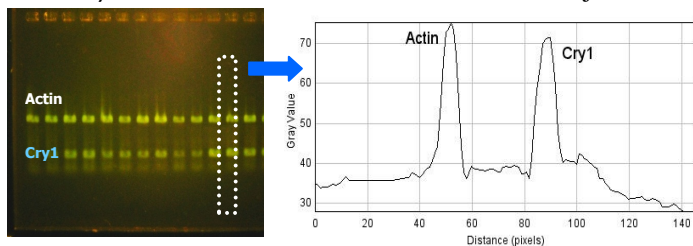


Figure 2. Semi-quantitative analysis of *cry1* RT-PCR products. The SYBR stained agarose gel shows *actin* and *cry1* fragments amplified from chicken pineal RNA samples. The histogram shows pixel intensity of the dotted line on the gel-photo.

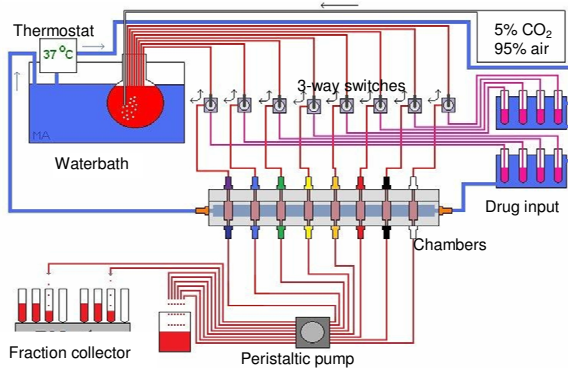
To approximate changes in mRNA expression, standard curves for RT-PCR products were obtained. Data for fold changes in initial template amounts were calculated from extrapolating raw fluorescence of products of 2-fold serial dilutions of cDNA and RNA within the exponential range. A two-fold increase in relative SYBR Green fluorescence of PCR products correlated with at least a 1.4-fold (*clock*) or 2.4-fold (*cry1*) increase in initial amounts of cDNA transcripts. Two-fold increase in SYBR Green fluorescence of RT-PCR products correlated with at least 2.2-fold (*clock*) or 3-fold (*cry1*) increase in initial amounts of total RNA. SYBR Green fluorescence of experimental samples were adjusted to cDNA standards and also corrected with the size differences of fragments. As a result, transformed data were plotted on charts to show the mean approximated values of initial *clock* gene mRNA contents in each experimental group.

IN VIVO EXPERIMENTS. Fertilized eggs of Leghorn chickens were obtained (Bóly Hatchery Ltd.), then they were incubated until hatching under LD (14h light/10h dark) or DD environment at a constant temperature (37,8°C), humidity (55-70%), and automatical egg rocking (every 2 h, Hemel Brutmaschine A70). Hatchlings were kept under LD conditions for 6 weeks with *ad lib.* access to maize and water. Light was provided by white fluorescent lamps which produced light intensities of 400 Lux in the egg incubator and 600 Lux for hatchlings. In each experimental group, 3-3 chickens of the same developmental stage were decapitated in every 2 or 4 h. Samples were collected throughout 12, 24 or 36 h.

IN VITRO EXPERIMENTS. Chickens were decapitated on the first day of the experiment at 12:00. Pineal glands of 6 weeks old chickens (n=6) were chopped into 3-4 parts, then the

mixture of all tissue fragments were divided to 6 groups which were placed into 6 chambers of the multi-channel perfusion system (**Figure 3**). Pineal glands of chicken embryos (n=18) were placed in the 6 perfused chambers as whole (n=3 per chamber). The flow rate of tissue culture medium (*Sigma* Medium 199) was 4 ml/h at 37,8°C under LD (14h 225 Lux, 10h darkness) or DD conditions. Sampling started 30 h after the beginning of the experiment (*i.e.* second day at 18:00). Every 4 hours, tissue samples of one chamber were collected: the mixture of gland particles of post-hatch chicken were homogenized as one sample per chamber, while embryonic glands were collected as n=3 samples per chamber. In the PACAP-experiments, 10 nM PACAP-38 (*Sigma* A1439) was used on chambers #2-#6 for 60 minutes starting 2 h before the second sampling timepoint (20:00-21:00).

Figure 3. *Perfusion system (draft).* The medium flows through a Teflon pipe with 1 mm inner diameter from the warmed container via the 3 way switch to the chamber (Ann Arbor Plastics), then through the peristaltic pump to the effluent container. Melatonin RIA of effluent medium was not always performed and those data are not discussed in this work. The drawing was made by Attila Matkovits.



STATISTICAL ANALYSIS. For standard curves, differences in SYBR fluorescence of (RT)-PCR products of serial diluted templates were determined with *Student's t-test* (one sample, homoscedastic, one tailed). In the *in vivo* experiments, differences between samples collected in different time points were assessed with one-way ANOVA followed by *Tukey's post hoc* test. The effects of different light/dark cycles on the 24 h pattern of clock gene expression was analysed with two-way ANOVA followed by *Student's t-test* (two sample, unequal variances, two tailed). In the *in vitro* experiments on pineal glands of 6 weeks old chickens, differences between samples were assessed with *non-parametric* tests. Differences between samples collected in different time points were assessed with *Wilcoxon's rank sum test*, and the effects of different light/dark cycles on the 24 h pattern of clock gene expression was analysed with *Mann-Whitney's u-test*. Differences between samples collected from chicken embryos *in vitro* in different time points were assessed with one-way ANOVA followed by *Tukey's post hoc* test. The effects of PACAP-38 treatment on the 24 h pattern of clock gene expression was analysed with two-way ANOVA followed by *Student's t-test* (two sample, unequal variances, two tailed).

In all our statistics, $p < 0.05$ values were considered to be significant.

IDENTIFICATION OF CLOCK GENES IN THE CHICKEN PINEAL GLAND

RESULTS

With the PCR primers designed by us we were successful in all cases in obtaining discrete sized RT-PCR products from chicken pineal RNA samples (**Figure 4**). The length of the products was similar to the predicted values. mRNA-s of *bmal1*, *bmal2*, *per2*, *cry1* and *cry2* genes were detectable under all RT-PCR parameters tested, but *clock*, *per1* and *per3* products were seen only under certain PCR conditions. Secondary DNA bands were detected with *per1*, *per3* and *cry1* primers, where that of *cry1* was similar in size with the predicted genomic fragment. By sequencing both *cry1* products obtained from cDNA or genomic DNA, we have found 86% identity between the chicken and the mouse *cry1* gene fragment, which was in agreement with our expectations. The intronic sequence showed

98% identity with that of the chicken *cry1* gene which was published later and showed no homology with the mouse *cry1* gene. Next to *cry1*, our primers for *cry2* and *clock* worked also with a high reproducibility in the one-step semi-quantitative RT-PCR. The sequence of *cry2* and *clock* PCR products showed 99% identity with the templates used in primer design. In contrast to all other genes tested, the expression of *per1* could be detected only with very low reproducibility in our system, and there is still no data about chicken *per1* in the literature.

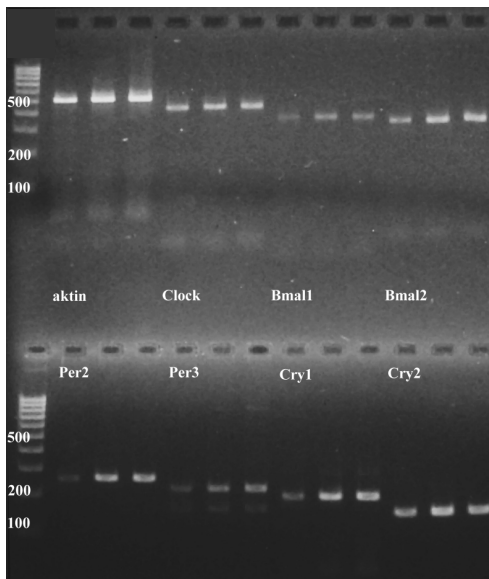


Figure 4. RT-PCR products of chicken pineal RNA samples amplified with clock gene specific primers, on agarose gel stained with ethidium-bromide.

DISCUSSION

Our results are in agreement with all reports published meanwhile, and show evidence for the expression of chicken homologues of the clock genes in the pineal gland. Furthermore, the binding of chicken CLOCK/BMAL complexes to E-boxes, their transcriptional activator role, and its inhibition with co-expressed chicken CRY1 were also proven *in vitro*. All of these data suggest that the autonomic oscillations in chicken pineal oscillators are driven probably by a similar feedback mechanism of clock gene expression which was already described in the mammalian SCN.

THE EFFECTS OF LIGHT ON THE CLOCK GENE MRNA EXPRESSION IN THE PINEAL GLAND OF 6 WEEKS OLD CHICKEN

RESULTS

The *cry1* mRNA expression showed a biphasic 24 h pattern *in vivo* in LD conditions with maximum at 17:00 and minimum 12 h apart, at 5:00 (Figure 5., A, B).

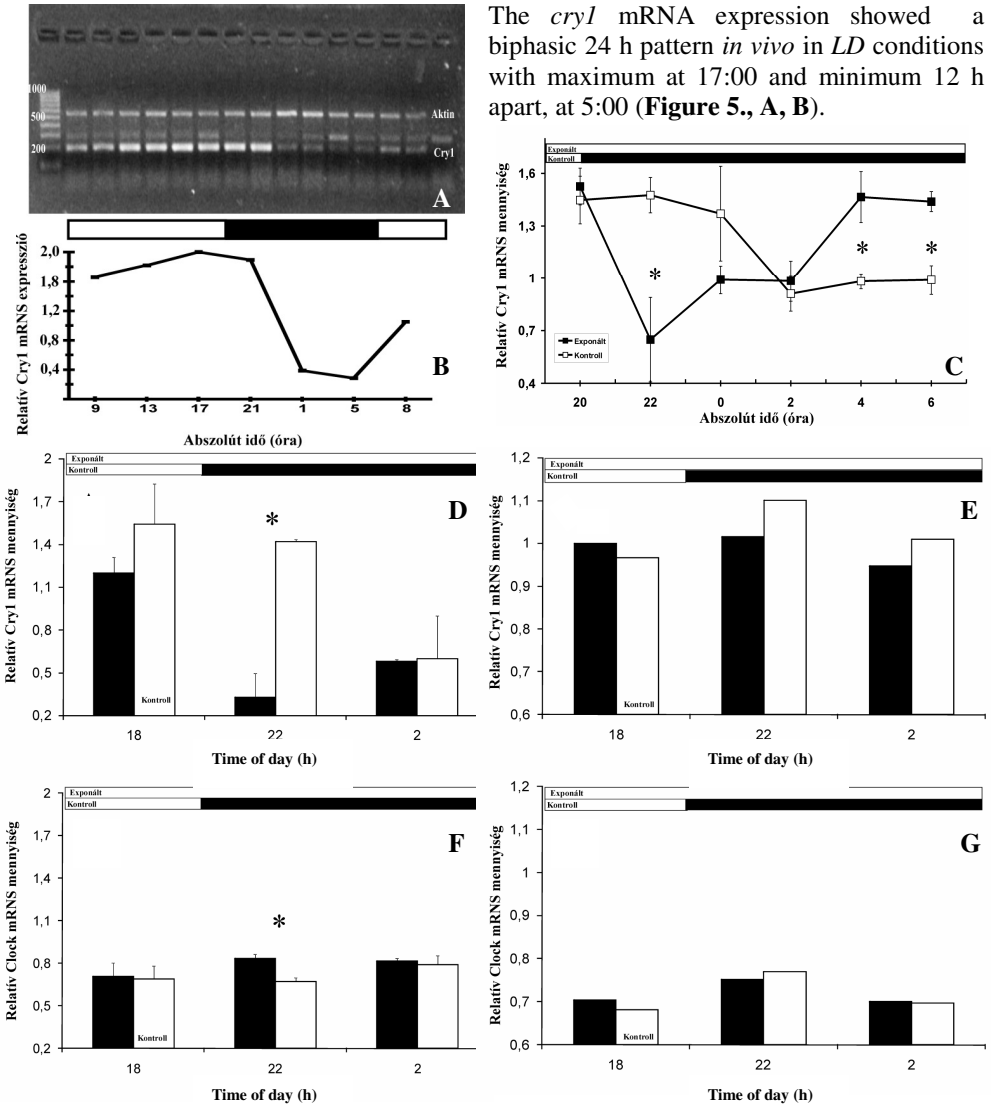


Figure 5. The effects of light on *cry1* (A-E) or clock (F-G) mRNA contents in the chicken pineal gland *in vivo* (A-D, F) and *in vitro* (E, G). Horizontal bars show environmental light/dark conditions (open: light, closed: dark). Data points and columns show the mean (+/- SEM, C, D, F) of relative mRNA expression in the exposed (closed) and control (empty) groups (C-G). Significant differences from control values are shown with *.

Overnight light exposure *in vivo* resulted in a decrease of *cry1* mRNA levels at 22:00 (50%) and increase at 4:00 (50%) and 6:00 (140%, **Figure 5. C-D**); while *clock* expression at 22:00 was increased (115 %, **Figure 5. F**) if compared to control.

In contrast, *in vitro* overnight light exposure did not alter either *cry1* or *clock* expression (**Figure 5. E, G**).

Reversed light/dark cycle (10h dark/14h light, DL) *in vivo* resulted in an increase of *cry1* mRNA expression at 6:00 (140%), a decrease at 14:00 (30%), and again an increase at 2:00 (200%) if compared to control (**Figure 6. A**). *Cry2* expression in the DL group did not change between 6:00-22:00, but decreased by 18:00-2:00 to 70% (**Figure 6. B**). If compared to control, decreased *cry2* mRNA levels were measured between 14:00-18:00 (70% and 50%, **Figure 6. B**).

Reversed light/dark cycle *in vitro* resulted in a steady decrease of *cry2* mRNA contents throughout the experiment (to 50%, **Figure 6. C**). In the control group, the 24 h pattern of *cry2* expression showed an increase by 6:00 (in darkness) followed by a decrease. If compared to control, *cry2* mRNA levels in the DL group were decreased between 2:00-14:00 (40%-70%).

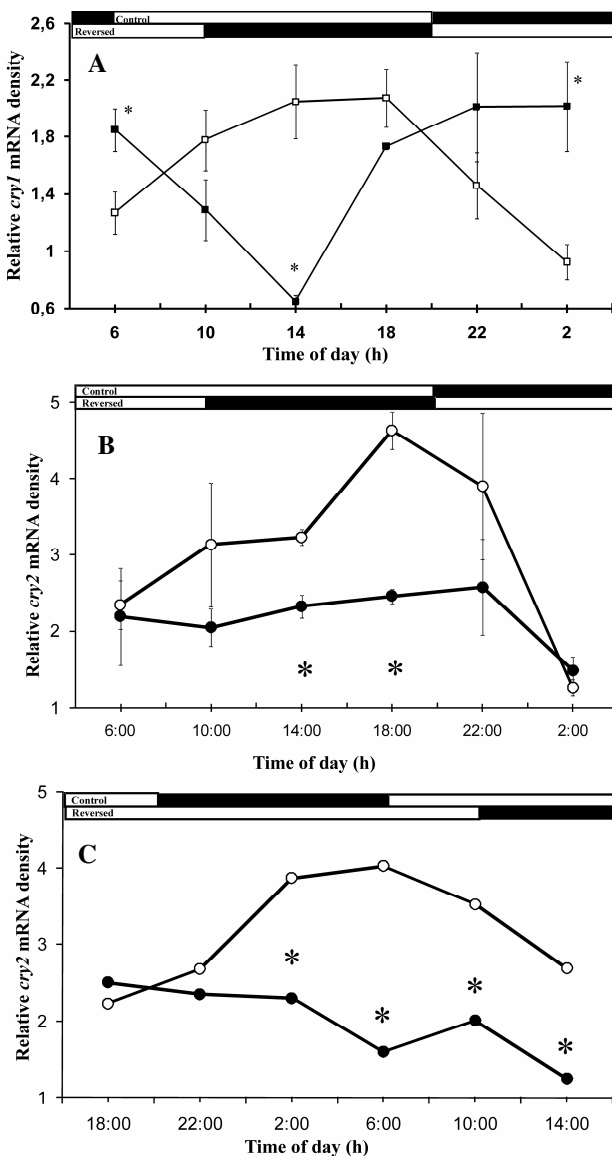


Figure 6. The effects of reversed light/dark cycle on the 24 h alterations of *cry1* (A) and *cry2* (B-C) mRNA contents of chicken pineal glands *in vivo* (A-B) and *in vitro* (C). Figure labelling is identical to that of figure 5.

DISCUSSION

Under *LD* conditions, the expression pattern of clock genes in the chicken pineal is similar not to the mammalian pineal but to the mammalian SCN. Maximal *cry1* mRNA contents are seen *in vitro* around the midpoint of the light phase (data from the literature) or *in vivo* around the light-to-dark transition (**Figure 5. A-C**), indicating that *cry1* expression is induced by light via both retinal and pineal photoreceptors. The delay of the *in vivo* pattern compared to that of seen *in vitro* suggests a modulatory role for the neurohumoral environment. This delay is 180° in the case of *cry2*: the *in vivo* pattern of *cry2* mRNA expression, which is similar to *cry1* (**Figure 6. A-B**, control), is driven by neurohumoral stimuli, while *in vitro* the 180° delayed *cry2* phase curve (**Figure 6. C**, control) reflects the effects of signalling pathways related exclusively to pineal oscillators and photoreceptors. The 24 h pattern of *clock* mRNA expression is also similar to that of *cry1* *in vivo* in LD, however, with much smaller amplitude (data from the literature).

Light exposure at night causes a transient drop of *cry1* mRNA levels in 2 hours *in vivo* (**Figure 5. C-D**). Similar to that seen in the mammalian SCN clock, the light dependent induction of *cry1* gene in the chicken pineal model can be exclusively indirect. mRNA levels of *clock* were also altered, however, in an opposite way (**Figure 5. F**), showing that unanticipated light stimulus (*i.e.* at night) evokes various transcriptional regulatory events also in the chicken pineal gland which leads to different responses in the expression of the clock genes. In contrast, a similar light exposure did not alter the expression of *cry1* és *clock* *in vitro* within 6 h (**Figure 5. E, G**), suggesting that neurohumoral stimuli are necessary for a rapid adaptation to the changes in environmental LD conditions. On the other hand, *cry2* did show alteration during *in vitro* light exposure at night (**Figure 6. C**, 18:00-6:00), further supporting the idea that in spite of the similar *in vivo* pattern of *cry1* and *cry2* mRNA expression, they are controlled by pineal photoreceptors with different mechanisms.

Under reversed light/dark cycle (DL) the pattern of *cry1* expression was inverted within 24 h *in vivo*, with still elevated mRNA levels during the illuminated phase (**Figure 6. A**). The indirect way of light dependent induction of *cry1* is supported not only by the transient drop during the first cycle of light phase at night (22:00, **Figure 5. C-D**), but also by an increase in the last hours of the first dark phase during the day (18:00, **Figure 6. A**). These data suggest that *in vivo* an unanticipated exposure to light influences those signalling pathways, which are able not only to alter *cry1* expression, but also to reset the phase curve of the molecular oscillator in the chicken pineal gland within 24 h to the new LD conditions.

The *cry2* expression showed opposite light dependent changes *in vitro* (**Figure 6. C**) if compared to *in vivo* data (**Figure 6. B**): in the same time interval (22:00-6:00) lower mRNA levels were measured during light (DL), than during darkness (LD, **Figure 6. C**). This suggests again that pineal photoreceptors and neurohumoral stimuli use different pathways to regulate *cry2* expression.

Unlike *cry1*, the rhythm of *cry2* expression was not inverted during the first 24 h of reversed LD conditions (**Figure 6. B**). Lower *cry2* mRNA contents were measured at the

same timepoint in both groups (DL vs. LD, 2:00, **Figure 6. B**), regardless to the lighting schedule (light vs. dark). This shows that unanticipated light may evoke various signalling mechanisms with opposite effects: neuroendocrine stimuli may induce (*in vivo*, **Figure 6. B**) and pineal photoreceptors may repress *cry2* expression (*in vitro*, **Figure 6. C**). The interaction of both mechanisms may corrupt the regulatory role of the 180° phase shifted molecular oscillator on *cry2* transcription during the first reversed LD cycles, which means not a *cry1*-like rapid adaptation for the *cry2* mRNA rhythm (**Figure 6. A-B**). Our speculation about the causes of this adaptational delay of the *cry2* rhythm *in vivo* was supported by our *in vitro* DL data: the *cry2* expression showed a steady decrease throughout the whole first cycle of reversed LD conditions if compared to control (**Figure 6. C**), which indicates a role for pineal photoreceptors in *cry2* repression. Based on our results, we hypothesise that unanticipated light exposure affects the chicken pineal clock *in vivo* through (1) pineal photoreceptors which can be monitored at the level of *cry2*, and through (2) the retina via neuroendocrine stimuli which can be examined at the level of *cry1* and *clock* mRNA expression.

THE DEVELOPMENT OF THE RHYTHMIC PATTERN OF CLOCK GENE EXPRESSION IN THE EMBRYONIC CHICKEN PINEAL GLAND

RESULTS

The *cry1* mRNA expression showed a biphasic 24 h pattern *in vivo* in the pineal gland of chicken embryos incubated in LD conditions: with maximum at 20:00 and minimum 12 h apart, at 8:00 (**Figure 7**). We found similar results in 6 weeks old chickens: maximum was seen at 16:00 and minimum was measured at 4:00.

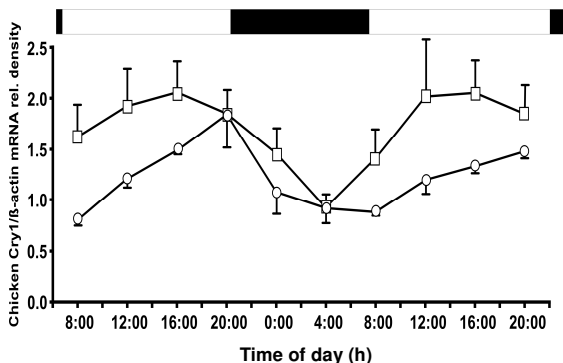


Figure 7. Chicken pineal *cry1* mRNA expression *in vivo* under LD. Horizontal bars show environmental light/dark conditions (open: light, closed: dark). Data points show the mean (+ or - SEM) of relative mRNA expression in groups of embryos (circles) and 6 weeks old chickens (squares).

In chicken embryos incubated under *DD* conditions *in vivo*, *cry1* expression showed between embryonic days 13-16 a steady decrease, while *clock* mRNA was detected from day 14 with a steady increase (Figure 8. A, B). *Cry1* mRNA started to increase by day 17. By the beginning of day 18, both *cry1* and *clock* expression decreased (by 6:00), which was followed by an increase (Figure 8. C, D). By the beginning of day 19 there was again a decrease seen in *cry1* mRNA contents (at 6:00), again followed by an increase (Figure 8. B). Data on clock expression did not show significant changes on day 19 (Figure 8. D).

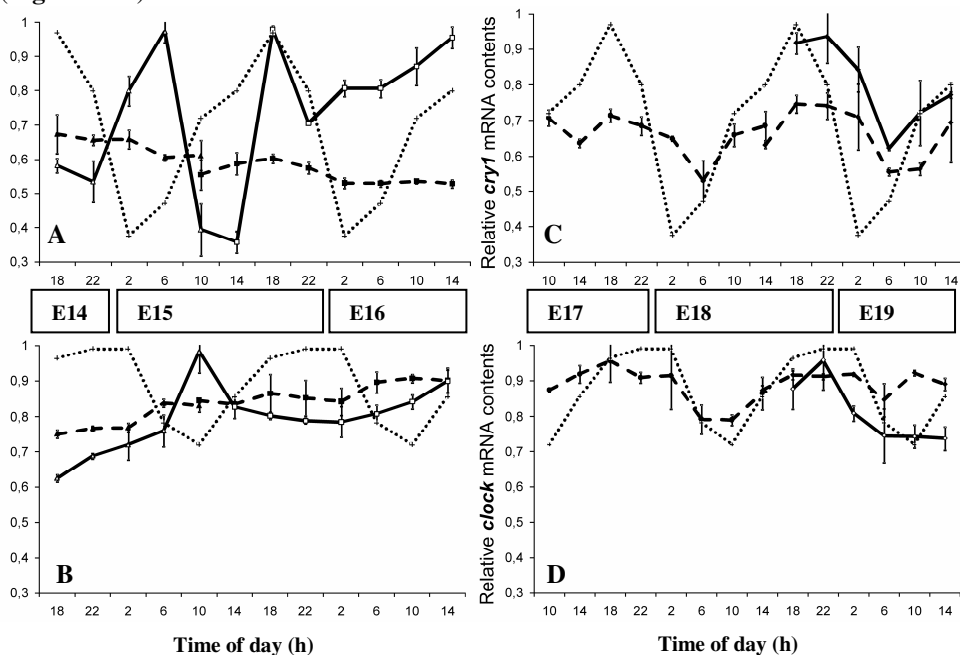


Figure 8. *Cry1* (A, C) and *clock* (B, D) mRNA contents of pineal glands of chicken embryos incubated under *DD* conditions. Dashed and continuous lines show *in vivo* and *in vitro* data, respectively. Data points show the mean (+/- SEM) of relative mRNA expression. The dotted line shows *in vivo* data obtained from 6 weeks old chickens kept in LD conditions. Quadrangles show the embryonal stage (e.g. E15 = day 15 of embryonal development).

In chicken embryos incubated under *DD* conditions *in vitro*, *cry1* expression showed on day 15 a peak at 6:00 and 18:00 (Figure 8. A), while the expression of *clock* peaked at 10:00 (Figure 8. B). On day 16 both *cry1* and *clock* mRNA levels showed a steady increase (Figure 8. A, B). On day 18 both *cry1* and *clock* expression peaked at 22:00, followed by a drop on the following day at 6:00 (Figure 8. C, D).

DISCUSSION

Recent data have shown that the pineal expression of the directly light-inducible *per2* is rhythmic in E18 stage chicken embryos incubated under LD *in vivo*. According to our results, the expression of the not directly light-inducible *cry1* is also rhythmic under similar experimental conditions (**Figure 7**). The *cry1* phase curve was very similar to that seen in 6 weeks old chicken regarding both the time of peak values and the amplitude. These data suggest that by the stage of E17 there has already developed a functional molecular oscillator which works synchronized to environmental zeitgebers.

The role of the neurohumoral environment in initiating circadian oscillations of the pineal clock was investigated in chicken embryos incubated under DD conditions. Between E13-16 stages *in vivo*, pineal *cry1* expression was continuously decreasing while *clock* mRNA levels increasing (**Figure 8. A, B**, dashed lines). No daily rhythm was seen at the tissue level which may refer either to a lack of synchrony among oscillatory units or to the complete absence of any oscillation at this stage. Furthermore, the opposite changes in *cry1* and *clock* mRNA amounts suggest different transcriptional regulation.

Between E16-19 stages, the expression pattern of both genes has changed at the tissue level: in contrast to the almost steady levels before E13, episodic increase and decrease of mRNA contents were seen within a 24 hour period (**Figure 8. C, D**, dashed lines). Furthermore, *clock* mRNA expression showed from day 17th not an opposite, but rather a parallel phase curve if compared to that of *cry1* which resembles the typical phase-relationship between the two genes' expression patterns seen in 6 weeks old chickens. These data suggest that changes in the transcriptional regulation of clock genes develop around the E16 stage which either starts or synchronises the oscillators to each other. This developmental event is under neuroendocrine or paracrine control and needs no environmental stimuli.

For both genes the mRNA rhythm seen between E17-19 under DD showed lower amplitudes if compared either to those of 6 weeks old chickens or to those of E17 embryos incubated under LD (**Figure 7**). This suggests that under LD there is a higher proportion of pinealocytes and photoreceptors which become synchronised to each other. Based on our data we speculate that signalling pathways activated by periodic environmental stimuli are needed not to start the oscillation rather to enhance a more extensive intercellular synchronisation which is needed to produce a high amplitude rhythm at the tissue level. The same role of LD environment was demonstrated during postnatal development of the mammalian SCN neurons. Interestingly, oscillatory units in the zebrafish pineal clock model are unable to work synchronized unless there is at least one single light pulse during ontogenesis. In the light of these data it becomes more obvious that the avian pineal gland serves as a special clock model for the study of neuroendocrine and paracrine factors responsible for the development of circadian rhythms. Unlike in fish, synchronised oscillation may start in the absence of light stimuli, and unlike in mammals, it starts in the absence of maternal zeitgebers.

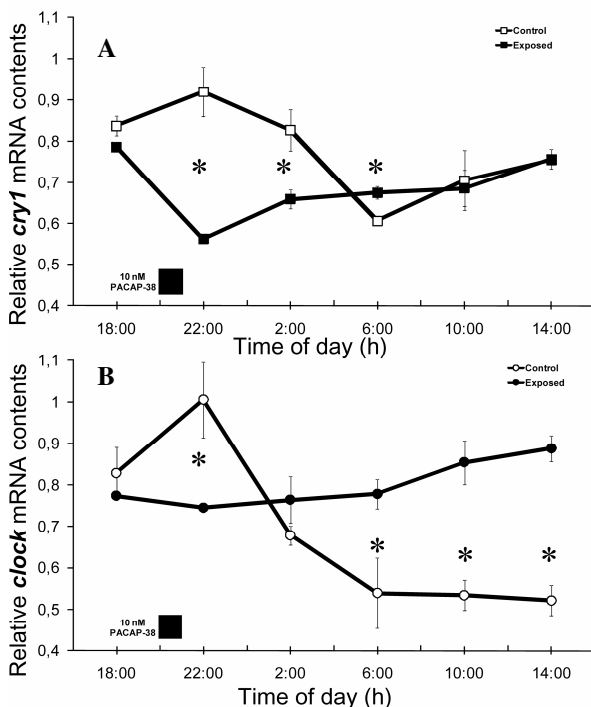
In contrast to our *in vivo* results, we found *in vitro* in all developmental stages significant episodic alterations of clock gene expression in the pineal glands taken from chicken

embryos incubated under DD (**Figure 8**, continuous line). Differences between *in vivo* and *in vitro* data may reflect the different effects of local (paracrine) and neuroendocrine stimuli. The activatory effects of episodically occurring intra- or intercellular signals may be masked by neuroendocrine stimuli. Unlike *cry1*, phase curves of *clock* expression are similar *in vivo* and *in vitro*, suggesting that *clock* transcription is regulated mainly by the changes in intra- or intercellular processes.

Our *in vitro* experiments have also proven that during the ontogenesis of the chick pineal gland, key changes occur between E14-17 stages in the transcriptional regulation of clock genes, even in the absence of periodic environmental stimuli. Unlike the phase curves on day 13 or 14, in E17 pineals both genes showed similar 24 h mRNA patterns with peak values at 22:00 (**Figure 8. C, D**). Furthermore, their phase-relationships were similar to what was seen *in vitro* under DD conditions in the pineal glands of 6 weeks old chicken previously kept in LD (data from the literature). These data support that circadian molecular oscillators may start working synchronised already from stage E17 also *in vitro* in the absence of any periodic environmental or neuroendocrine stimulus. This suggests that the *in vivo* rhythm of clock gene expression developing at the same stage (E17) is driven not by the neuroendocrine environment. However, based on our data it can not be excluded if an episodic, light-independent neurohumoral stimulus would be needed to initiate or evoke molecular oscillations.

THE EFFECTS OF PACAP-38 ON *CRY1* AND *CLOCK* EXPRESSION IN THE CHICKEN PINEAL GLAND

Figure 9. Effects of 10 nM PACAP-38 treatment *in vitro* on the 24 h patterns of *cry1* (A) and *clock* (B) mRNA expression in pineal glands of chicken embryos incubated in DD. Data points show the mean (+/- SEM) of relative mRNA expression in the control (empty) and exposed (closed) groups. The black box shows the time period of 60 min for PACAP exposure. Significant differences from control values are shown with *.



RESULTS

Pineal glands of E17 chicken embryos previously incubated in DD were placed to *in vitro* DD environment, where tissue samples were treated with 10nM PACAP-38 for 60 min on day 18 at 20:00.

By 22:00, both *cry1* and *clock* expression was decreased if compared to control (**Figure 9**). After 6:00, *cry1* mRNA contents were not much different from control values, while *clock* mRNA levels exceeded that of the controls.

DISCUSSION

The PACAP treatment, which was similar in dose and timing to what was effectively used in the mammalian SCN model, resulted in a decrease of both *cry1* and *clock* mRNA contents in the pineals within 2 h after the onset of exposure (**Figure 9**). Although we did not test the effects of other doses or schedules of PACAP treatment, the fact that both genes showed similar response in their mRNA contents suggest that PACAP may indeed have some role in synchronising molecular oscillators also in the chicken pineal clock model. Previous data on the presence of PAC₁ and VPAC₁ receptors, signalling pathways similar to the mammalian SCN, and PACAP-immunopositive nerve fibres originating from the *trigeminal ganglion* and terminating on the pineal gland further support our hypothesis.

NOVEL FINDINGS

- (1) Effects of *in vivo* unanticipated light exposure mediated by pineal photoreceptors can be monitored at the level of *cry2*, and those mediated by the retina via neuroendocrine stimuli can be examined at the level of *cry1* and *clock* mRNA expression in the chicken pineal clock model.
- (2) The transcriptional regulation of *cry1* and *clock* genes can adapt rapidly (within 2 h) to unanticipated light-dependent neuroendocrine stimuli. Unlike *period* genes, the light-dependent induction of *cry1* and *cry2* clock genes is indirect also in the chicken pineal clock model.
- (3) From day 16 of embryonic development, neuroendocrine and/or paracrine stimuli are responsible for the changes in the transcriptional regulation of clock genes securing synchronised oscillations in the developing chicken pineal clock. The periodic alterations of the physical environment (light, temperature) are not necessary in this process.
- (4) PACAP may have a role in synchronising molecular oscillators also in the chicken pineal clock model.

PUBLICATIONS

ARTICLES RELATED TO THE THESIS

- (1) Valér Csernus, Nándor Faluhelyi and *András Dávid Nagy*: Features of the circadian clock in the avian pineals. - *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1040: 281-287. 2005. [IF: 1.971]
- (2) Valér Csernus, *András Dávid Nagy* and Nándor Faluhelyi: Development of the rhythmic melatonin secretion in the embryonic chicken pineal gland. – *Gen. Comp. Endocrinol.* 152: 144-147. 2007. [IF: 2.562]
- (3) *András Dávid Nagy* and Valér Csernus: *Cry1* expression in the chicken pineal gland: effects of changes in the light/dark conditions. - *Gen. Comp. Endocrinol.* 152: 148-153. 2007. [IF: 2.562]
- (4) *András Dávid Nagy* and Valér Csernus: The role of PACAP in the circadian regulation of clock gene expression in the chicken pineal gland. - *Peptides* 28: 1767-1774. 2007. [IF: 2.368]
- (5) *András Dávid Nagy*, Siri Kommedal, Karishma Seomangal and Valér Csernus: Circadian Expression of clock genes *clock* and *cry1* in the embryonic chicken pineal gland. - *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1163: 484-487. 2009. [IF: 2.303-2008]
- (6) *András Dávid Nagy*, Karishma Seomangal, Siri Kommedal and Valér Csernus: Expression of *cry2* in the chicken pineal gland: effects of changes in the light/dark conditions. - *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1163: 488-490. 2009. [IF: 2.303-2008]

OTHER ARTICLES

Boglárika Rácz, Gabriella Horváth, Nándor Faluhelyi, *András Dávid Nagy*, Andrea Tamás, Péter Kiss, Balázs Gaszner, Ferenc Gallyas, Gábor Tóth, Valér Csernus and Dóra Reglódi: Effects of PACAP on the circadian changes of signaling pathways in chicken pinealocytes. – *J Mol Neurosci* 36: 220-6. 2008. [IF: 2.06]

BOOK CHAPTERS

Csernus V., *Nagy A. D.*, Faluhelyi N.: The control of MT release from mammalian and avian pineal glands. - In: *Melatonin: from Molecules to Therapy*. S. R. Pandi-Perumal, D.P. Cardinali (eds.). Nova Science Publishers Inc., New York (2006).

ABSTRACTS PUBLISHED ON INTERNATIONAL CONGRESSES: 13

ABSTRACTS PUBLISHED ON NATIONAL CONGRESSES: 14

SEMINARS, WORKSHOPS, CONGRESS ORGANIZING ACTIVITY: 5

ACKNOWLEDGEMENTS. This work couldn't have been realized without the professional guidance of my advisor. I would like to thank for the invaluable advices and critics of colleagues in the Departments of Anatomy, Medical Biology, Immunology, Pathology, Microbiology, Public Health, Laboratory Medicine at our University. I would like to highlight the impact of the cheerful workplace environment, the kind help of laboratory technicians, and the enthusiasm of my undergraduate students in the success of our results presented on national and international scientific competitions.