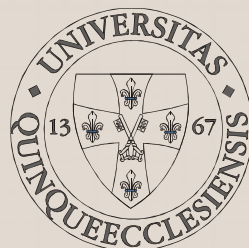


EGYETEMI DOKTORI (PH. D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

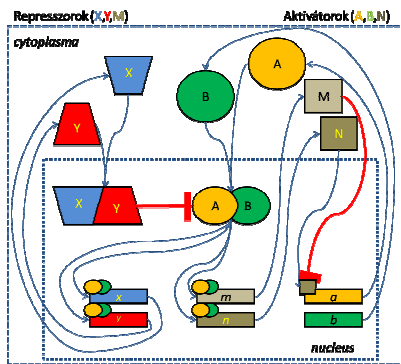
Témavezető: Dr. Csernus Valér

Pécs, 2010.

BEVEZETÉS

CIRKADIÁN RITMUSÚ BIOLÓGIAI JELENSÉGEK. Az emberi teljesítőképesség határait befolyásoló biológiai sajátosságok, 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 promótere is. A képződött PER/CRY heterodimerek interakcióba lépnek a CLOCK/BMAL transzkripciós 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-ERBα és RORα 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-erbα*, n: *Rorα*.

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. Érintettsége 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/ébredés, 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 (*photoperiodizmus*).

A MADÁR TOBOZMIRIGY, MINT A CIRKADIÁN BIOLÓGIAI ÓRA MODELLJE. Bár a melatoninszekréció cirkadián ritmusa filogenetikailag meglehetősen konzervált funkció, a toboztest (*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 *photoreceptorok* és az emlősökéhez hasonló, nyúlványok nélküli *pinealocyta*k 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-moddal 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 egészen *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 transzkripció 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	tccagctctcttggacaacc	gctgtgtctggatcatgtgt	420	800
Bmal1	AF 246957	csirke	tggcagcaaaaaggatgg	ttcgagacatagcgttgcac	370	700
Bmal2	AF 246958	csirke	atgcacaaacaaccgaacatc	caatgtttgtccattgaagc	330	900
Per1	NM 011065	egér	cggagctcttgggttgc	cccaaggagatgggactc	275	1200
Per2	AF 246956	csirke	caatggctcacacgaacact	ggagacagctgtagcttgggt	250	1050
Per3	AY 046567	csirke	cacagggtcagcagcatcag	atcatcaccaggctgadc	225	1300
Cry1	AY 034432	csirke	gaatgctggagctggatgtg	ccttctgcnacatctctgg	200	100
Cry2	AY 034433	csirke	acaagccacccctcaccatc	gatgggacacacatcacatc	150	700

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

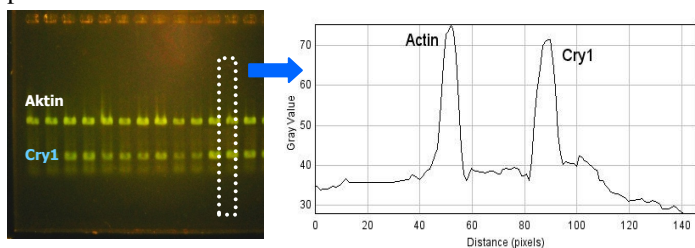
Az adatbankban elérhető szekvenciákból olyan primerpárokat választottunk, melyekkel a táblázatban feltüntetett méretű RNS és genomikus DNS szakaszok detektálhatók.

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-Reménypusztai 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 gélrt SYBR Green I-gyel festettük, majd kék fénnel 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 fotón pontozott vonallal körülhatárolt gélcsáv pixel-intenzitását mutatja.

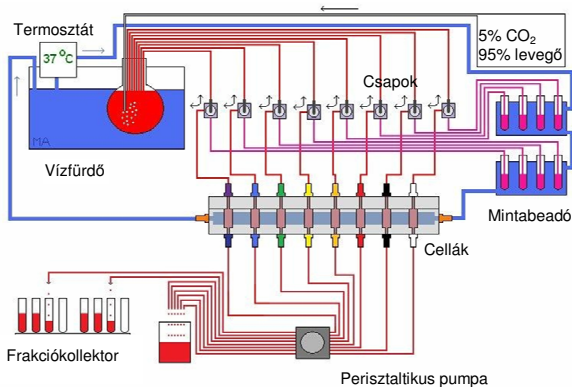
Az mRNS expresszió mennyiségi vizsgálatához cDNS- és mRNS-standardgörbéket készítettünk. Az egységnyi fluoreszcencia-változással járó kiindulási templátmennyiség-eltérés meghatározásakor csak az exponenciális tartományba eső fluoreszcencia adatokat vettük figyelembe. A PCR termékek 2-szeres relatív fluoreszcencia-különbsége 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), páratartalommal (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 csirkéből (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 teflonszövön 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 mintázására 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-paramertikus* 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 mintázására *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 mintázására szintén varianciaanalízissel (két-utas ANOVA) és kétmintás *t-próbával* (kétmintás, kétvégű, egyenlőtlen varianciájú) vizsgáltuk.

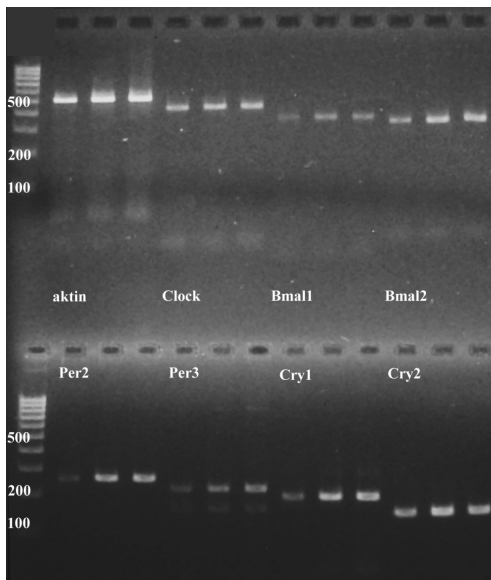
Szignifikancia-határnak $p=0,05$ -öt tekintettük minden statisztikai próbánál.

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 egy lépéses szemikvantitatív RT-PCR módszerben. A *cry2* és *clock* PCR termékek szekvenciáját ekkor ellenőriztük, melyek 99%-ban azonosnak bizonyultak a tervezéshez használt templátokkal. A többi génével ellentétben *per1* expressziót nem sikerült reprodukálható módon kimutatnunk, és továbbra sincs irodalmi adat a madár *per1* gén létezéséről.



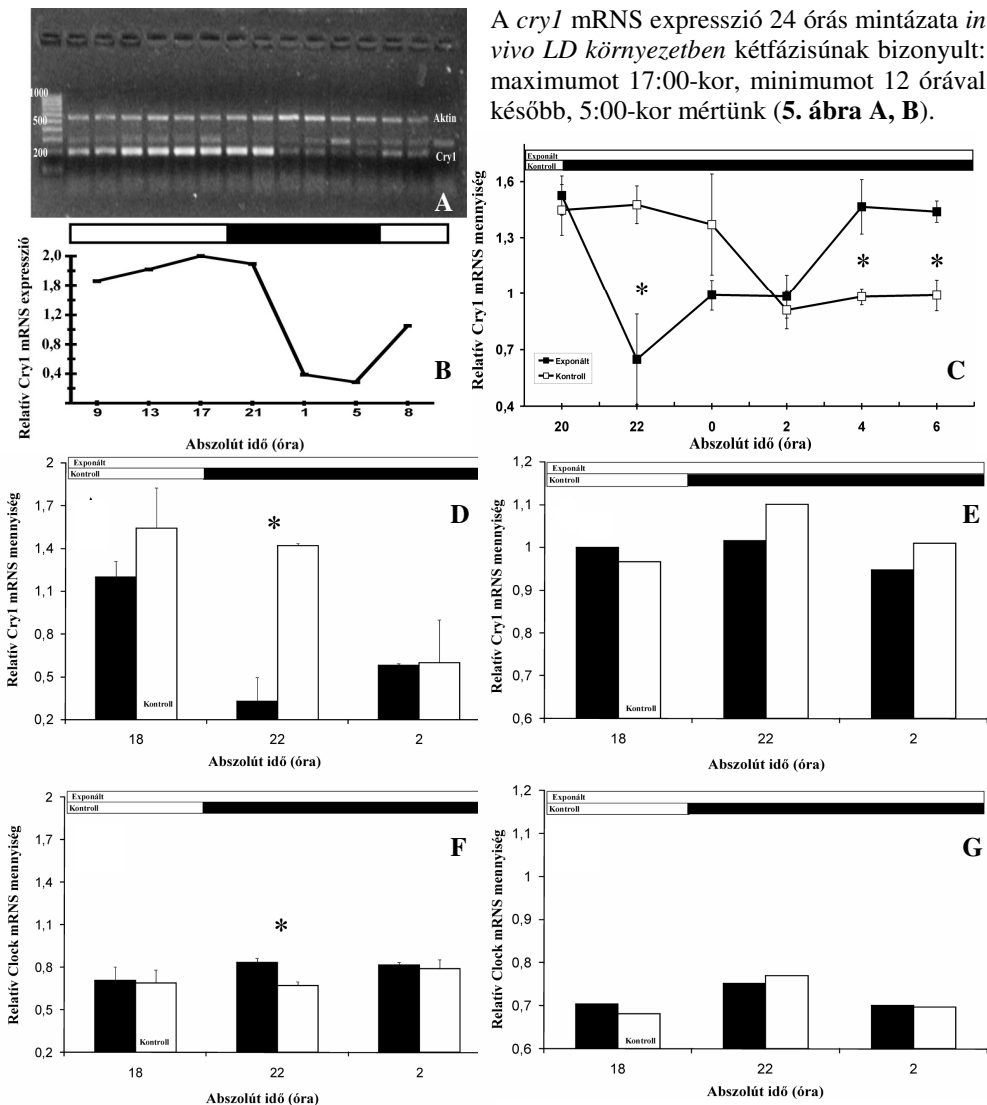
4. ábra. Csirke tobozmirigy RNS minták RT-PCR reakciótermékei, agaróz gélen, etidium-bromid festéssel.

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-EXPRESSZIÓRA 6 HETES CSIRKÉK TOBOZMIRIGYÉBEN

EREDMÉNYEK

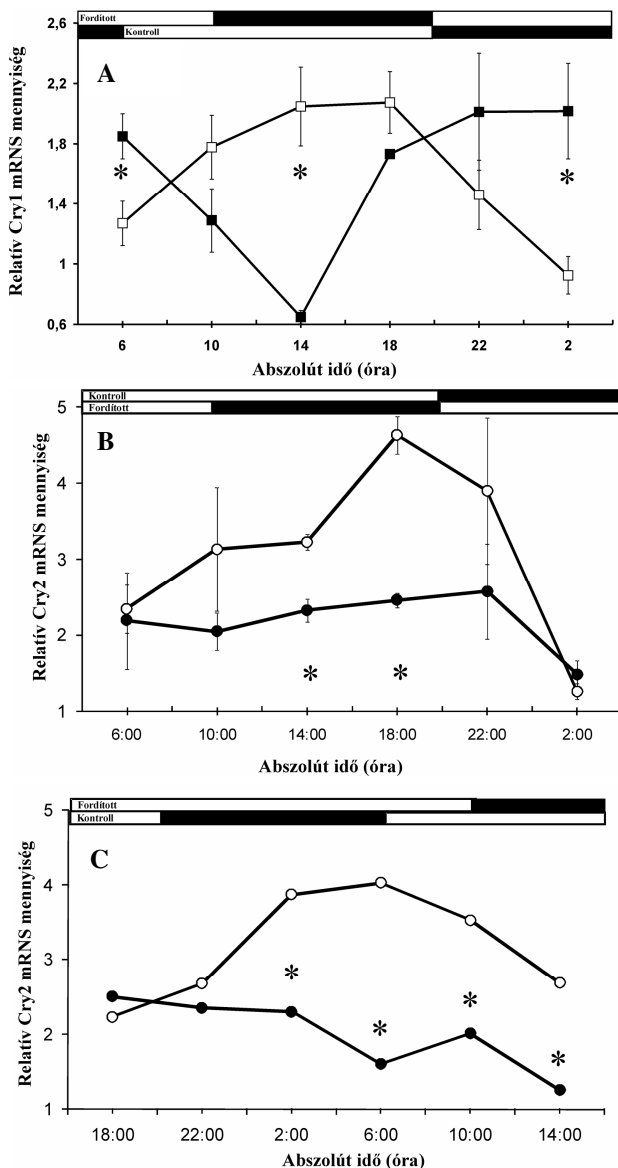


5. ábra. A fény hatása csirke tobozmirigy *cry1* (A-E) és *clock* (F-G) mRNS szintjeinek változására *in vivo* (A-D, F) és *in vitro* (E, G). A vízszintes sávok a környezeti fényviszonyokat jelzik (üres: fény, teli: sötét). Az adatpontok és oszlopok minden időpontban a relatív mRNS expresszió átlagát (+/- 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 mennyisége 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* viszont 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.

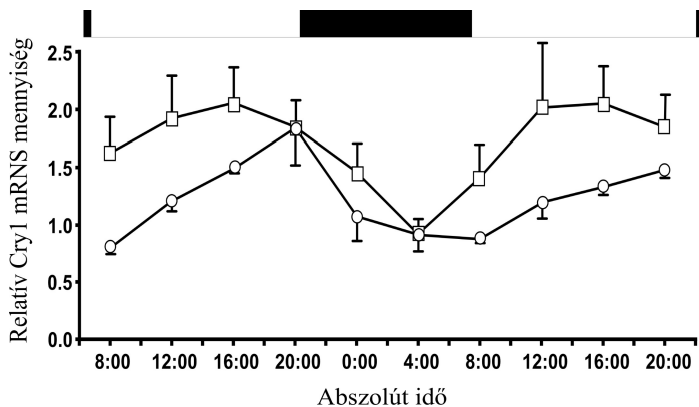
Fordított megvilágítási ciklus (DL) hatására a *cry1* expresszió mintázata *in vivo* 24 órán belül megfordult úgy, hogy a magasabb *cry* mRNS szint továbbra is a megvilágítási szakaszt reprezentálja (**6. A**). A fény *in vivo* *cry1* expressziót fokozó hatása nem közvetlen, mert az első éjszakai megvilágítás 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* génexpresszió 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 pinealocyta 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

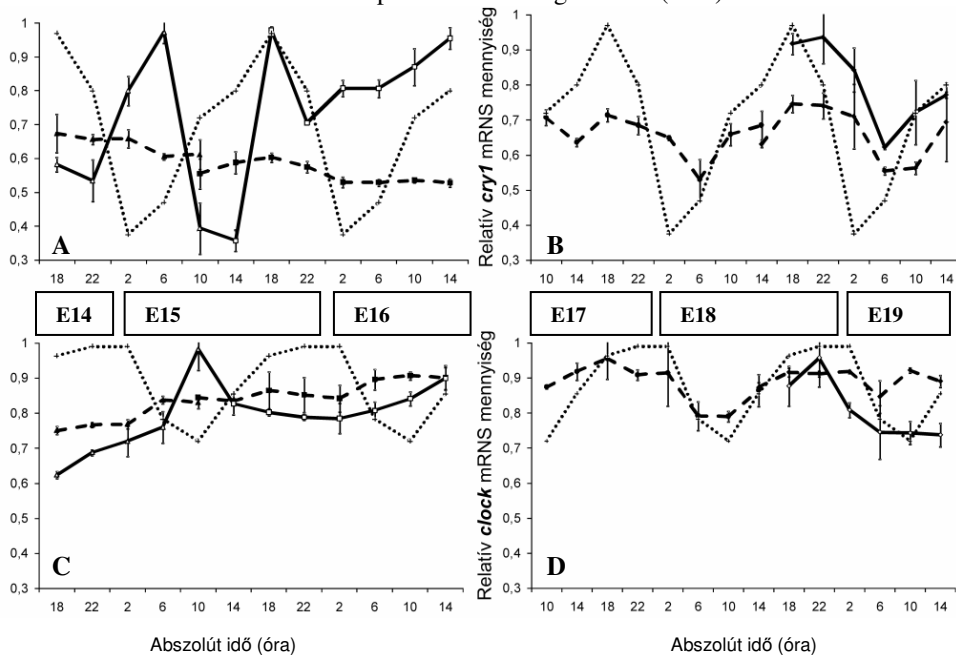
EREDMÉNYEK

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 csirkénél 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 mértünk 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 négyyszögek 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 fénnel indukálható *per2* expresszió ritmusos. Adataink szerint a fénnel 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 transzkripciószabályozására 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 transzkripciósz 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

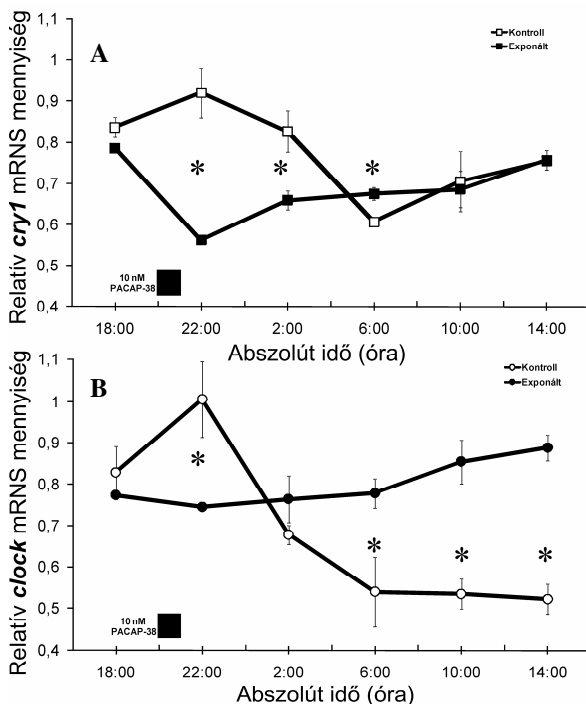
környezeti megvilágítás- vagy az anyai *zeitgeber* hiányában is elindul a sejtszintű oszcilláció, és a szerv szintjén a sejtek egymáshoz szinkronizálódhatnak.

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* transzkripció 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 ontogeneze során a 14-17. napok között periodikus környezeti inger hiányában is lényeges változás történik az óragének transzkripció 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 rostvégződés is, melyek a *ggl. trigeminale*-ból 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* transzkripció 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* généével ellentétben közvetett.
- (3) A molekuláris oszcillátor elindításához szükséges, a fejlődő csirke tobozmirigyében *in vivo* a 16. embrionális naptól jelentkező transzkripció 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.