

Óragén expresszió vizsgálata bőrgyógyászati biopsziás mintákon

Doktori (PhD) értekezés

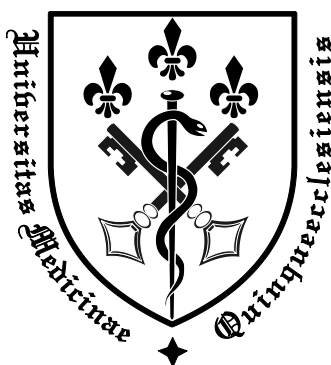
Dr. Lengyel Zsuzsanna

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Anatómiai Intézet és Bőrgyógyászati Klinika

Témavezetők: Dr. Csernus Valér és Dr. Battyáni Zita

Neuroendokrinológia és Neurohisztológia Doktori Program
Programvezető: Dr. Csernus Valér

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



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pécs
2013.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	
1.1. A napszakos ritmus és az óragének	-3-
1.2. Óragének és karcinogenezis	-7-
1.3. Cirkadián rendszer és a karcinogenezis – klinikai adatok	-11-
1.4. Kronobiológia és kemoterápia: kronoterápia	-14-
1.5. Napszakos ritmus a bőrben	-15-
1.6. Bőrtumorok és a cirkadián óra	-19-
2. CÉLKITŰZÉSEK	-22-
3. BETEGANYAG ÉS MÓDSZER	
3.1. Beteganyag, szövetbiopszia	-24-
3.2. Real-time RT-PCR	-26-
3.3. Immunhisztokémia	-26-
3.4. Adat/statisztikai elemzés	-27-
4. EREDMÉNYEK	-29-
5. MEGBESZÉLÉS	-41-
6. ÖSSZEFOGLALÁS	-46-
7. A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK	-48-
8. RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA	-49-
9. IRODALOMJEGYZÉK	-50-
10. PUBLIKÁCIÓK	-63-
11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	-70-

1. BEVEZETÉS

1.1. A napszakos ritmus és az óragének

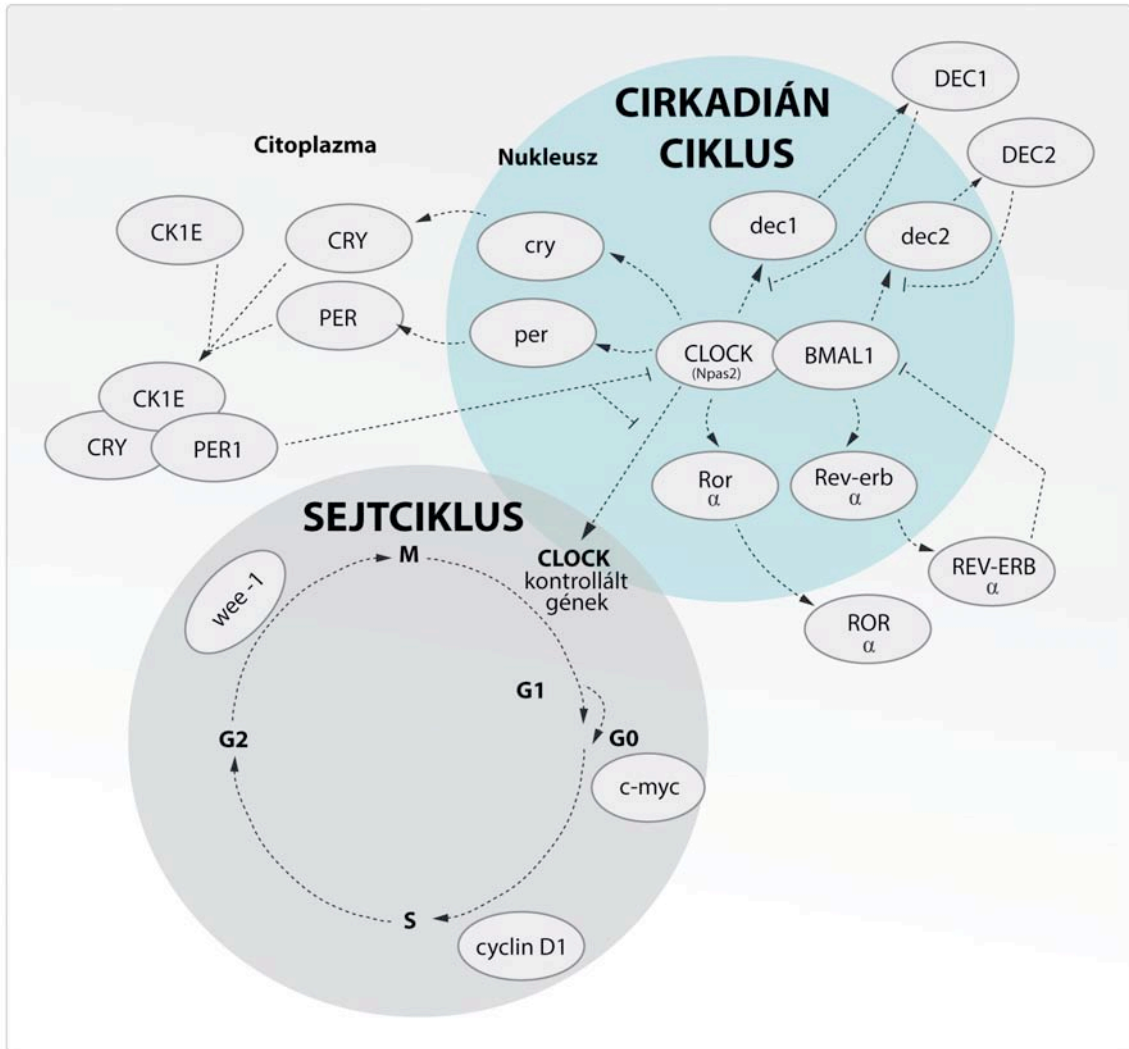
A biológiai ritmus az élő szervezetekben egy nagyjából azonos periódusidővel ismétlődő biológiai folyamat. A biológiai ritmus lehet ultradián, amelyre rövid periódusidejű oszcilláció jellemző, a megfigyelt folyamat egy nap többször megismétlődik. Az infradián ritmusok periódushossza több mint egy nap. A napszakos (cirkadián) ritmus (latin circa- körülbelül, diem- 24 órás nap) [1], egy közel 24 órás periódusidejű biológiai ritmus, mely a Föld tengely körüli forgása által kiváltott nappal-éjszaka ciklushoz igazodik. A napszakos ritmikus jelenségek az élővilágban széles körben előfordulnak: jelen vannak a prokaryotákban, egysejtű eukaryotákban, növényekben, gombákban, állatokban és az emberben [2-7]. Már az 1800-as években megjelentek írásos feljegyzések, melyek az emberi élettani folyamatokhoz és betegségekhez kapcsolódó 24 órás periódusban ismétlődő jelenségekről és azok feltételezett eredetéről szóltak [8]. Az emlősök cirkadián rendszere olyan napi ritmikus folyamatokat hoz létre, melyek alapvetőek a magatartás és az élettani folyamatok létrejöttében, úgy mint, az alvás-ébrenléti ciklus, a hormon termelés, a maghőmérséklet, egyes immunológiai folyamatok, az anyagcsere és sejtciklus szabályozás [9, 10]. Ezen, a fajnak megfelelő időtartamú napszakos ritmusok fázisát bizonyos, arra alkalmas környezeti ingerek (német *Zeitgeber*: időt meghatározó) képesek megváltoztatni. A legjelentősebb *Zeitgeber* a fény-, a hőmérséklet-, a táplálék-, a fizikai aktivitási, az alvás-ébrenléti és a szociális ingerek [9]. Emellett endokrin-metabolikus *Zeitgeber*-ként funkcionál többek között a melatonin, inzulin, glükokortikoidok és a katekolaminok is [11,12,13,14]. A *Zeitgeber* hatás függ attól, hogy a ritmust mely aktuális fázisában éri el, azaz késleltetheti vagy siettetheti a ritmus lefutását, illetve akár hatástalan is lehet. A napszakos ritmus fázisa igazodik (*entrainment*) a *Zeitgeber* ingerek meghatározott periódusidejű ciklusaihoz, ennek köszönhetően az élőlények eltérő periódusidejű endogén ritmikus folyamatai követik a fény-sötét ciklus természetes

változását. Amennyiben a környezeti ciklusok nem 24 órák, az endogén napszakos ritmus képes lehet azok követésére, szűk fajspecifikus határokon belül. Embernél ez az alkalmazkodás 22-28 órás periódus-tartományban lehetséges [5,9,15-18].

A napszakos ritmusos folyamatok vezérlését végző biológiai mechanizmusokat cirkadián biológiai óráknak nevezték el [19]. Emlőskben a cirkadián rendszert egy központi és számos perifériás óra, valamint működését befolyásoló negatív-, és pozitív visszacsatolási hurkok (feedback) alkotják. A központi óra a hypothalamus mediális zónájának elülső magjai közé tartozó nucleus suprachiasmaticusban (SCN) található [20]. A központilag generált ritmus koordinálja a periférián elhelyezkedő szervek óráit. Az elmúlt 20 évben azonosítottak számos olyan óragént, valamint általuk kontrollált transzkripciós faktorokat (óraproteineket), amelyek mind a SCN-, mind a perifériás szövetekben a napszakos ritmusos folyamatok sejt szintű működtetésében (oszcillációjában) és szabályozásában játszanak szerepet [20]. Az emlősöknél a molekuláris óra nagyfokú redundanciáját a többszörös transzkripcionális és poszt-transzlációs visszacsatolási hurkok alkotják. A ciklus pozitív szabályozói a „*circadian locomotor output cycles kapu*” (CLOCK) és a „*brain and muscle ARNT-like*” (BMAL1) óraproteinek heterodimerként a sejtmagba lépnek, majd hiszton-acetilációt és E-box promoterelemhez kötődést követően génexpressziót indukálnak [21-23]. E-box elemet tartalmaznak a period homolog (*per1*, *per2* és *per3*) és cryptochrome (*cry1* és *cry2*) gének és a CLOCK/BMAL1 indukálja az expressziójukat. Ugyanakkor a CRY és PER órafehérjék komplexet képezve, negatív szabályzóként gátolják, a CLOCK/BMAL1 által közvetített transzkripciót a sejtmagban, azaz saját génjeinek expresszióját is negatívan befolyásolják. [24, 25]. Újabb ciklus elindításában egy járulékos feedback-hurok elemei, a ROR α és a REV-ERB α fehérjék játszanak szerepet, melyek a *bmal* transzkripciót szabályozzák. Az E-boxhoz más óraproteinek is kötődnek (pl. NPAS2), valamint a CLOCK/BMAL1 funkcióját más óraproteinek is gátolják (pl: DEC1 és DEC2) [26].

A transzkripció szabályozás mellett poszt-transzkripció és poszt-transzláció mechanizmusok is részt vesznek az óra működésében. A poszt-transzlációs folyamatokban résztvevő fehérjék közül a kazein kináz 1-et (CKI) fedezték fel először, mely a PER protein foszforilációja révén, annak idő előtti degradációját idézi elő [27]. A perifériás oszcillátorok óragénkészlete a központival azonos, azonban a ritmusosan expresszált génkészlet az eltérő funkciók és igénybevétel következtében nagymértékben szövetspecifikus (**1. ábra**).

A CLOCK/BMAL1 komplex a cirkadián molekuláris oszcillátor koordinációján kívül, egyes a sejtciklus szabályozásában résztvevő génekre közvetlenül hat, mint pl: *wee1* (G2/M átmenet), *c-myc* (G0/G1 átmenet) és *cyclin D1* (G1/S átmenet) [28-31]. A *c-myc* onkogén transzkripciója fontos szerepet játszik a sejtszaporodásban és apoptózisban. *Per2* mutáns egérben a *c-myc* aktiválását és a *p53* (G1-S fázis ellenőrzőpont) alulműködését figyelték meg [24]. A *cyclin D1* (CCND1) szintén óragének által kontrollált gén, melynek szerepe tumor-kialakulásban feltételezhető, pl. emelkedett CCND1- szint ösztrogén receptor- α pozitív emlődaganat esetén rosszabb prognózissal társul [33,34]. Egér máj-, és vázizom szövetből végzett micro-array analízis során több sejtciklus és proliferációs regulátort írtak le, melyek a *p21*, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet-derived growth factor* (PDGRF) és *KIT ligand* (KITLG) expressziójának napszakos oszcillációját idézte elő [35]. A *p21* a sejtciklus egy fontos negatív szabályozója, melynek funkcióját a CLOCK/BMAL1 komplex egyik célmolekulája a Rev-Erba gátolja [29]. Az eredmények molekuláris szinten alátámasztják a sejtciklus és napszakos óra között lévő bonyolult, egymásra ható és szerteágazó kapcsolat jelenlétét.



1. ábra

A CLOCK/BMAL1 vagy a CLOCK/NPAS2 heterodimer (pozitív elemek) a „core hurok”, mely a *per*, *cry* és *dec* E-box mediálta transzkripciójért felelős, az óragének fehérje termékei ciklikusan jelennek meg a citoplazmában. Amikor a PER és CRY fehérje koncentrációja elér egy szintet, PER: CRY (negatív elemek) heterodimerek képződnek, foszforilálódnak és a sejtmagba transzlokálódnak, ahol a gátolják a CLOCK/BMAL1 vagy CLOCK/NPAS2 E-box mediálta transzkripciót (ezáltal a clock kontrollált génekét is), beleértve a saját transzkripciójukat addig, míg a szintjük a kritikus szintig csökken, hogy új transzkripciós ciklus indulhasson. A DEC a saját promoter régiójában lévő E-box-hoz kötődik, ezáltal direkt gátolja kifejeződését. A CLOCK/BMAL1 szintén befolyásolja a ROR α és a Rev-erb α szintjét, melyek a BMAL1 koncentrációját csökkentik kompetitív mechanizmuson keresztül. A circadián rendszer ciklikus működése az óragének által kontrollált gének mRNS-ek ciklikus akkumulációját idézi elő, ezáltal termelődésükben egy oszcillációs mintázat, valamint sejttípusra jellemző ritmikus fiziológias megjelenés alakul ki (pl. szteroid bioszintézis, sejtszaporodás, anyagcsere). A kazein kináz (CK) isoformái foszforilálják a PER és CRY proteinket, befolyásolva azok nukleo-citoplazmatikus elhelyezkedésüket és ezáltal a transzkripciós aktivitásukat.

Napszakos ritmusú szabályozások a DNS hibajavító mechanizmusokban és az apoptózis folyamatában is megtalálhatók. Mai ismereteink szerint a különböző DNS hibajavító mechanizmusok közül a NER (nucleotid excision repair) áll szoros kapcsolatban a cirkadián órával [36]. Egér agy- és májszövetben a DNS hibát felismerő protein xeroderma pigmentosum A (XPA) expressziójának napszakos oszcillációját észlelték [37,38].

A cirkadián rendszer mind a belső (intrinsic) és mind a külső (extrinsic) apoptotikus útvonalakra hatással van. A külső útvonal esetében a napszakos óra főbb molekulái a TNF α (tumor necrosis factor α) szintézisét szabályozzák ritmusosan [39]. A belső apoptotikus útvonalnál a *p53* tumorszupresszor gén és az óragének között direkt kapcsolat tételezhető fel, hiszen a BMAL1 upregulálja [40] és a CRY downregulálja [41] a *p53* expressziót, annak ellenére, hogy a *p53*-nak nincs napszakos ritmusa feltehetőleg a számtalan betöltött szerepe miatt.

A sejtciklus, a DNS hibajavító mechanizmusok és az apoptózis szabályozásában szerepet betöltő molekuláris óra a tumorkutatások egy új lehetséges területét tárta fel az elmúlt évtizedben.

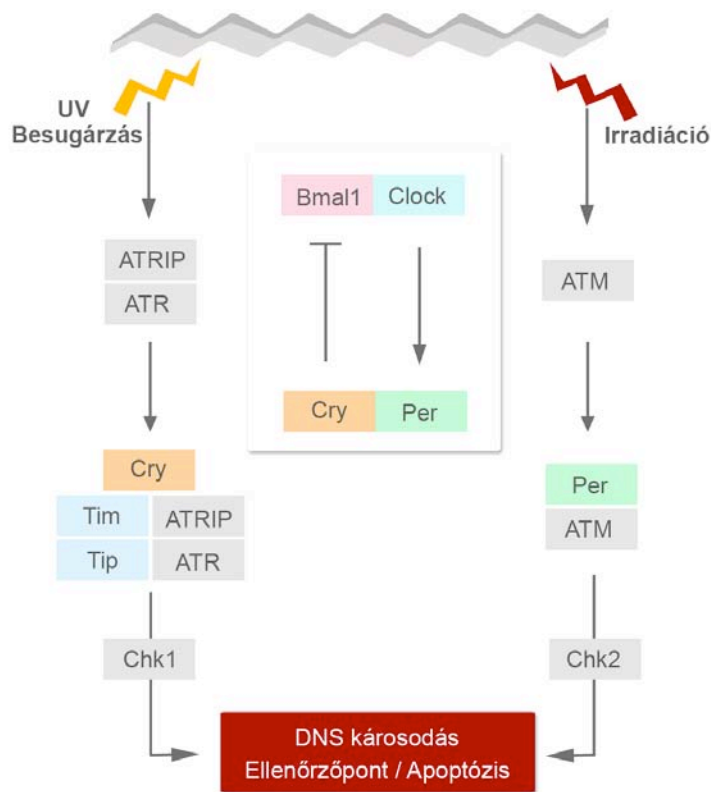
1.2. Óragének és a karcinogenezis

A cirkadián rendszer számos különböző fiziológiás folyamat szabályozásában részt vesz (lásd 1.1.), így nem meglepő, hogy sok tanulmány felveti, hogy hibás működése szerepet játszhat rosszindulatú tumor kialakulásában. Epidemiológiai adatok bizonyítják, hogy az életmód napszakos ritmusában bekövetkező károsodás magasabb daganat-kialakulási kockázattal társul. Emberi emlő- és kolorektális karcinóma vizsgálata során, a váltott műszakban dolgozók daganatkockázata magasabbnak bizonyult, mint a normális napszaki ritmusban dolgozóké [42-44]. A szabályos napszakos ritmus zavarából származó hatások vizsgálatára gyakran a krónikus jet lag-et alkalmazzák. A jet lag gyors, több időzónán átívelő utazás

következtében fellépő tünetegyüttes, melynek háttérében a gyorsan megváltozott környezeti ciklushoz késéssel adaptálódó cirkadián óra áll. Ez a jelenség a populáció kisebb hányadát érinti, ezzel szemben a krónikus ritmuszavar (krónikus jet lag), azaz a váltóműszak a Föld lakosságának megközelítőleg 20%-ának az életmódját és egészségét befolyásolja [45]. Mind az akut, mind a krónikus jet lag a napszakos ritmikus folyamatok zavarához vezet, mely a ritmusos működés megszűnését, a centrális és perifériás oszcillátorok deszinkronizálódását vagy a ciklus fáziseltolását okozza. Krónikus jet lag állapotban tartott állatoknál diethylnitrozamin okozta májdaganatok előfordulása és mérete nagyobb volt, mint a kontroll állatokéban, tehát feltételezhető, hogy a szabályos napszakos ritmus zavara a májtumor kialakulását is elősegíti, valamint annak progressziójában is szerepet játszhat [46]. Krónikus jet lag jelenlétekor molekuláris szinten a *c-myc* fokozott- és a *p53* csökkent termelését írták le. Ezen és számtalan hasonló kísérlet eredménye vezetett ahhoz, hogy 2007-ben a WHO (International Agency for Research on Cancer, IARC) a váltott műszakot a karcinogének 2A csoportjába, azaz a lehetséges rákkeltő tényezők közé sorolta [47].

Molekuláris szempontból számos tanulmány az óragének működését a tumorszupresszorokéhoz hasonlítja. A molekuláris óra egyes tagjainak tumorszupresszor funkciója egyértelmű, míg a rendszert alkotó további óragének szerepe ez irányban kevésbé ismert.

Per1 vizsgálata során az ionizációs sugárzás hatására a tumorsejtekben a gén túlprodukciónak és fokozott apoptózist észleltek, míg *per1* gátlásakor hasonló kísérleti behatások során az apoptózis mértéke csökkent. Az ionizációs sugárzás PER1 nukleáris transzlokációhoz, *c-myc* expresszió indukcióhoz és *p21* (Waf1/Cip1) csökkenéshez vezet. A PER1 direkt kapcsolatban áll a DNS kettős törés által aktivált ATM és CHK2 kinázokkal. Ezek alapján tehát a PER1, mint tumorszupresszor funkcionál, számos útvonalat, többek között a DNS hibajavító mechanizmust is aktiválja [48] (**2. ábra**).



2. ábra

A cry, a tim óragénnel együtt az UV sugárzás vagy kémiai anyagok hatására aktiválódó ATR-Chk1 jelátviteli útvonalban vesz részt. Ehhez hasonlóan a per a ATM-Chk2 jelátviteli útvonalban tölt be szerepet, mely aktivációját irradiáció vagy sugárzáshoz hasonló károsodást létrehozó anyagok okozzák. Az útvonalak aktivációja a DNS károsodás észlelés következtében a Cdc2 és Cdk2 foszforilációjához, majd emiatt a sejtciklus leállításához vezet a G2/M és a G1/S átmenetben. A DNS hibaellenőrző folyamatok a sejtciklus megállításával párhuzamosan aktiválják a DNS hibajavító mechanizmusokat. A cirkadián óra a DNS hibaellenőrző folyamatokat két módon is befolyásolja: először is az ellenőrző fehérjék transzkripciójára hat, továbbá az óraproteinek az ellenőrző folyamatok szerves részét képezik.

A sejtszaporodást befolyásoló „growth arrest and DNA damage inducible protein α ” (GADD45 α) és a „mouse double minute 2 homolog” (MDM2) gének expressziójának napszakos mintázata *per2*-mutáns egerekben [32] megszűnik. Vizsgálatokban igazolták, hogy *per2* mutáns egerekben a γ - sugárzás által okozott lymphomák előfordulása gyakoribb, mint a vad-típusú kontroll állatoknál, mely háttérben a hibásan működő *p53* közvetített apoptózis áll [32]. *Per2*^{S662G5H};*p53*^{R175H/t}, *Per2*^{S662D5H};*p53*^{R175H/t} genotípusú egereken végzett kísérlet, bizonyította, hogy a *per2* túlműködése és hiánya is fokozza a lokuszok transzformációját és

befolyásolja a normál apoptózist, tehát a tumor-kialakulás rizikójának csökkentéséhez a *per2* optimális szintje szükséges [49].

A *bmal1* mutáns állatokban a *p21* expressziója fokozódik, ritmicitás nem detektálható. *Bmal1*^{-/-} hepatocytákban szintén *p21* túlprodukciónak észlelhető csökkent proliferációs aktivitással [29]. *Bmal1*KO/K5-SOS egereknél szignifikánsan kevesebb malignóma alakult ki a tumorképződés korai-, közép-, és késői szakaszában, mint a kontroll egerekben [50]. Az eredmények a *bmal1* pro-proliferatív aktivitását igazolják, mely fontos szerepet tölt be a sejtnövekedésben és élettartamban [51].

A cryptochrome szerepe a karcinogenezisben az eddigi vizsgálatok alapján nem egyértelmű. *Cry1*^{-/-}*cry2*^{-/-} egerek túlélése ionizációs sugárzást követően nem volt rosszabb a vad típusú (WT) egereknél [52]. Abban az esetben, amikor a *cry* mutációt *p53* mutációval kombinálták, a *cry* mutációnak protektív hatását észlelték: a *p53* mutáns egerekben nem volt fiatal korban kialakuló daganat, valamint a medián élettartam közel 50%-al meghosszabbította. Továbbá, *p53*^{-/-}*cry1*^{-/-}*cry2*^{-/-} fibroblasztoknál *in vitro* genotoxikus hatás által indukált apoptózis gyakrabban fordult elő, mint a csak *p53*^{-/-} sejteknél [41]. Ez felveti, hogy a *cry* óragének egy a *p53*-tól független apoptotikus útvonalat negatívan befolyásolnak, mely *p53*^{-/-} genotípus esetén válik nyilvánvalóvá. *Cry2*^{-/-} emlődaganat sejtvonal esetében DNS hibák akkumulációját és ezzel párhuzamosan a *CCDN1* és *CDKN1A* (cyclin dependent kinase 1, másnéven *p21*) túlexpresszióját írták le, melyek a sejt szaporodásban játszanak szerepet ellentétes funkcióval. A kísérlet további érdekessége, hogy egyéb hibajavító útvonalakban (pl. apoptózis) a mutáció jelenléte ellenére sem volt különbség detektálható, azaz *cry2*^{-/-} sejt populációban emelkedett DNS hibaszámot figyeltek meg, de ez nem társult csökkent túléléssel vagy megnövekedett apoptotikus rátával. Tehát ha a *cry2* expressziója csökken, akkor az a DNS hibák számát növeli, és mivel ez nem társul fokozott sejthalállal, ill. apoptózissal, tumor kialakulásához vezethet [26].

A *cry* óragénhez hasonlóan a *clock* mutáns egerekben a rosszindulató neoplazmák kialakulása sem a normál élettartam alatt, sem az ionizációs sugárzás hatására nem fokozódtak, ill nem alakultak ki. A genotoxikus behatások az élettartam rövidülését és a korai öregedés különböző tüneteit idézték elő [53].

Összegezve a molekuláris genetikai adatokat, az óragének szerepe rosszindulatú tumor-kialakulásában feltételezhető, hiszen számos olyan folyamatban vesznek részt, melyek meghibásodása tumor kialakulásához vezethet (pl. sejtciklus szabályozása, DNS hibajavítás).

1.3. Cirkadián rendszer és a karcinogenezis – klinikai adatok

Emberi tumor biopsziás mintákon végzett vizsgálatok során az óragének expressziójának downregulációját észlelték különböző tumorokban pl: emlő-, endometrium-, prosztata-, vastagbél-, máj-, fej-nyaki laphám-, tüdő karcinóma (**1. táblázat**), összehasonlítva a mellette lévő nem tumoros szövetrel [54-65].

Ezen eredmények magyarázatára szolgálhat az, hogy mutáns vagy epigenetikusan downregulált CLOCK fehérje a *per1*, *per2* és *cry1* óragének expressziójának csökkenéséhez vezet, mely a napszakos ritmus megszakadását idézi elő és ennek következtében a tumoros sejtek túléléséhez vezet. Kolorektális karcinóma esetében a *clock* gén mutációit is vizsgálták, a szerzők a funkcionális CLOCK hiányát észlelték, mely egy tumorképződésre hajlamos fenotípust idéz elő [66]. Ez az eredmény azonban a molekuláris genetikai adatoknak ellentmond, hiszen a *clock* mutáns egéknél sem a normál élettartam alatt, sem az ionizációs sugárzást követően tumor-kialakulást nem detektáltak [11].

A vizsgálatok értékelése folyamán figyelembe kell venni, hogy az emberi tumor biopsziákon végzett kísérletek során az óragének expressziójáról nyert leíró adatok nem adnak választ arra, hogy a talált eltérés a malignus transzformáció oka-e vagy következménye. Az epigenetikus downreguláció hátterében a megváltozott neurohumorális vagy metabolikus környezet is

állhat, melyet a szervezet tumorelles védekező (helyi vagy szisztémás) mechanizmusai hoznak létre.

Azon klinikai vizsgálatokat áttekintve, melyek heterogén sejtösszetételű tumoros szövetben vizsgálták az óragének mRNS mennyiségét, elmondhatjuk, hogy a tumoros és mellette elhelyezkedő nem tumoros szövet között általában körülbelül 0,5-szeres különbséget találtak **(1. táblázat)**.

Gén	Tumor biopszia	A génextpressziós változás mértéke a tumoros mintában a nem tumoros biopsziás mintához viszonyítva	Referencia
Per1	Familiáris emlő karcinóma	0,225	[61]
	Sporadikus emlő karcinóma	0,45	[61]
	Hepatocelluláris karcinóma	0,167	[57]
	Fej-nyaki laphámrák	0,159	[56]
	Hasnyálmirigyrák	0,076	[63]
	Melanoma	0,609	[64]
	Nem kissejtes tüdődaganat	≤0,5 a minták 61%-ban	[29]
	Veserák	N.S.	[65]
Per2	Familiáris emlő karcinóma	0,53	[61]
	Sporadikus emlő karcinóma	0,73	[61]
	Kolorektális karcinóma	N.S.	[60]
	Hepatocelluláris karcinóma	0,237	[57]
	Fej-nyaki laphámrák	0,182	[56]
	Veserák	0,757	[65]
	Melanoma	0,604	[64]
Per3	Kolorektális karcinóma	0,357	[59]
	Hepatocelluláris karcinóma	0,2	[57]
	Fej-nyaki laphámrák	0,199	[56]
	Veserák	N.S.	[65]
Clock	Hepatocelluláris karcinóma	N.S.	[57]
	Fej-nyaki laphámrák	N.S.	[56]
	Melanoma	0,523	[64]
	Veserák	N.S.	[65]
Cry1	Hepatocelluláris karcinóma	N.S.	[57]
	Fej-nyaki laphámrák	0,294	[56]
	Veserák	N.S.	[65]
	Melanoma	N.S.	[64]
Cry2	Hepatocelluláris karcinóma	0,408	[57]
	Fej-nyaki laphámrák	0,109	[56]
	Veserák	N.S.	[65]
Bmal1	Hepatocelluláris karcinóma	N.S.	[57]
	Fej-nyaki laphámrák	0,197	[56]
	Veserák	N.S.	[65]
Tim	Hepatocelluláris karcinóma	0,185	[57]
	Fej-nyaki laphámrák	N.S.	[56]
	Veserák	0,833	[65]

1. táblázat Óragén expressziós értékek néhány tumoros mintában a szomszédos nem tumoros szövetmintához viszonyítva (N.S.: nem szignifikáns)

1.4. Kronobiológia és kemoterápia: kronoterápia

A cirkadián rendszer területén nyert ismeretek felhasználása és annak terápiaiban történő alkalmazása néhány évtizede áll az érdeklődés központjában. Az alaphipotézis szerint a gyógyszer a nap egy bizonyos időpontjában történő adásával optimális hatást érhetünk el, minimális mellékhatások mellett. Ezt a kezelési módot kronoterápiának, amennyiben daganatellenes szereket alkalmazunk kronokemoterápiának nevezzük [67].

Egy III. fázisú vizsgálatban, kolorektális karcinómában szenvedő betegeknél 5-FU, leukovorin és oxaliplatin „kronomodulált” adását hasonlították össze a standard adási móddal, ahol nőknél nem, de férfi betegek esetében a kronomodulált adás túlélési előnnyel társult [68]. Összeségében e területen végzett klinikai vizsgálatok eddig azonban szerény eredményt mutattak, ill a két legnagyobb randomizált [69,70] vizsgálat a terápia hatásosságában a kronomoduláció előnyét nem tudta bizonyítani. Így egyelőre a kronokemoterápia onkológusok által rutinszerűen még nem alkalmazott módszer. Az eddigi sikertelenség oka lehet a szervezet biológiai komplexitásából adódó további ritmusosan szabályozott folyamatok kölcsönhatásainak hiányos ismerete (pl. immunrendszer daganatra adott válaszméchanizmusainak napszaki ingadozása, sejtciklus napi ritmusa, máj gyógyszermetabolizációjának ritmusos ingadozása). A megfelelő állatkísérletes modelleken végzett és klinikai vizsgálatokkal igazolt újszerű kutatások a jövőben az onkoterápia individuális „időzítését” tehetik lehetővé.

1.5. Napszakos ritmus a bőrben

A bőr az emberi szervezet borító rétege a külvilág felé, melyet folyamatosan érnek a napi ingadozást mutató környezeti hatások. Jól ismert, hogy az emberi bőrben bizonyos biofizikai és élettani folyamatok napi ritmussal bírnak, ilyen pl. faggyútermelés, bőr-barrier funkció [71,72]. A bőr permeabilitása az esti és éjszakai órákban fokozottabb, mint reggel, valamint hasonló napszakos ingadozás figyelhető meg a bőr vérkeringésében is [71].

Korábbi *in vitro* tanulmányokban leírták az óragének expresszióját a bőrben jelenlévő sejtekben, mint a keratinocytákban, fibroblasztokban, melanocytákban és melanoma sejtekben [73-77] (2. táblázat). További *in vitro* kísérletek az óragének napszakos ritmusos expresszióját is bizonyították, igazolván a perifériás óraműködést a bőrt alkotó különböző sejtípusokban [73,75,77-80]. Egy emberi vizsgálat során 8 önkéntestől nyert szövetmintákon a *per1*, *cry1*, és *bmall* ritmusos expresszióját találták, kora reggeli (korai aktivitás), késői délutáni és éjszakai (késői aktivitás) csúcsokkal, míg a *clock* és *tim* ritmicitást nem mutatott [73].

Emberi hasfali bőrmintából nyert melanocyta, keratinocyta és fibroblaszt sejt kultúrákon végzett vizsgálat során az óragének ritmusos expressziója volt detektálható. Figyelemre méltó, hogy az *in vitro* dexamethason szinkronizálást követően a mRNS szintű oszcilláció amplitúdója és fázisa is az adott sejtípusra jellegzetes volt. A legmagasabb amplitúdójú oszcilláció a keratinocytákban volt mérhető, ezt követték csökkenő sorrendben a fibroblasztok, majd a melanocyták. Ez a rangsor az oszcilláció mértékén kívül jól reprezentálja ezen sejtípusok arányát is a bőrben [75]. Az emberi epidermiszből nyert mintákon végzett micro-array analízis során több száz transzkriptum napszakhoz kötött regulációját találták. A szerzők a közel 300 transzkriptumból a Krüppel-like factor 9 (Klf9)-al foglalkoztak részletesebben, mivel mint cirkadián transzkripcionális regulátort azonosították. A Klf9 expresszióját a glükokortikoidok nagymértékben befolyásolják, valamint fehérje terméke erős antiproliferatív

hatású. A Klf9 target génjei, melyeknek a sejtszaporodásban és érésben is szerepük van, szintén ritmikus expressziót mutatnak az epidermiszben [81]. Állatkísérletben igazolták, hogy a bőrben az azonnali-, és késői típusú hiperszenzitív allergiás reakciók (pl. anaphylaxiás reakció és kontakt hiperszenzitivitás bőrtünetei) esetében a tünetek napszakos megjelenést mutatnak a fiziológiás kortikoszterin ritmusnak megfelelően [82,83]. A bőrbetegségek közül a betegnek kifejezett szociális problémákat okozó pikkelysömör, mely a lakosság 2,5%-t érinti [84], az új kutatási eredmények alapján immun-mediált betegségcsoportba sorolható. Kialakulásában igen fontos szerepet játszanak a különböző gyulladáshoz vezető mediátorok, melyek közül jól ismert a TNF α fokozott jelenléte, hasonlóan az arthritishez. Cry1^{-/-}Cry2^{-/-} egérenél arthritises tünetek fejlődnek ki, maximális ízületi duzzanattal, továbbá a betegség kialakulásában szerepet játszó gyulladáshoz vezető citokinek fokozott termelődése észlelhető (pl. TNF α) [85]. Ezen kísérletet alapul véve és azt, hogy az arthritis és a psoriasis pathomechanizmusában ugyanazon gyulladáshoz vezető mediátoroknak van szerepük, a pikkelysömör és a cirkadián óra között is feltételezhető egy kapcsolat megléte. A keratinocyták proliferáció zavarásával járó bőrbetegségek esetében a fent említett Klf9 további vizsgálata igen ígéretes lehet, mivel ismert ezen faktor antiproliferatív hatása az epidermiszben, ill. kortikoszteroidok által vezérelt expressziója.

Az óragének szerepét a bőrben történő sejtszaporodás molekuláris szintű szabályozásában egy állatkísérletes tanulmány igazolta, ahol a CLOCK/BMAL1 komplex célgénjeinek upregulációját észlelték egér szőrtüsző telogén/korai anagén fázisában [79]. A közlemény alapján elmondhatjuk, hogy a CLOCK/BMAL1 által vezérelt cirkadián transzkripcionális aktiváció a bőrben normális, szinkronizált környezeti hatások esetében a pro-proliferatív útvonalakkal áll kapcsolatban.

Ezt a feltételezést támasztja alá a következő tudományos vizsgálat is, ahol *bmal1* hiányos K5-SOS egerekben (Krt5 promóter által regulált SOS onkogén, mely Ras aktivátor) kevesebb

bőrtumor képződött. A daganatképződés ezekben az állatokban elsősorban nem a hibás Wnt jelátviteli útvonalhoz kötött, mely útvonal egyébként a laphámsejtes karcinóma kialakulásában játszik fontos szerepet [50].

Összefoglalva elmondható, hogy a bőr funkcionális, perifériás cirkadián óramechanizmusokat tartalmaz (**2. táblázat**), és ezáltal alkalmas modellnek tekinthető a cirkadián rendszer és tumor-kialakulás kapcsolatának tanulmányozására.

2. táblázat Irodalmi áttekintés az óragének expressziójáról bőrben

Közlés időpontja/Referencia	Minta	Eredmények
2000.07. [77]	Keratinocytá- (HaCaT), melanocytá-, fibroblaszt-, melanoma A375 sejtvonalak	<i>Clock</i> és <i>per1</i> expressziójának igazolása mRNS és fehérje szinten a bőrt alkotó különböző típusú sejtekben.
2001.02. [73]	Emberi bőr biopszia	<i>Clock</i> , <i>tim</i> , <i>cry1</i> , <i>bmal1</i> , <i>per1</i> expresszió napi ritmitásának detektálása <i>in vivo</i> .
2002.08. [74]	Emberi keratinocytá sejtvonal	Alacsony dózisú UVB besugárzás a <i>clock</i> , <i>per1</i> , <i>bmal1</i> expressziójában változást okoz.
2008.11. [80]	C57BL6 vad típusú és <i>Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}</i> egerek	SCN ablációt követően a bőr óragének oszcillációja megszűnik.
2009.07. [79]	C57BL6 vad típusú, <i>Clock^{-/-}</i> , és <i>Bmal1^{-/-}</i> egerek	A CLOCK–regulált gének a hajciklus fázisainak megfelelően változnak. Mutáns egér esetében anagén fáziskésés igazolható. <i>Bmal1^{-/-}</i> egérben p21 fokozott termelődése van.
2010.09. [76]	HaCaT keratinocytá	<i>In vitro</i> igazolt az óragének és az általuk kontrollált gének (bőr fiziológiás folyamataiban fontos gének pl: <i>Insig2a</i> , <i>c-myc</i> , <i>Ldl receptor</i> , <i>Hmgcr</i>) ritmikus expressziója.
2011.11. [88]	Hím, ivarérett SKH-1 egerek	A xeroderma pigmentosum group A (XPA) fehérje és a nukleotid excíziós javítás mértéke napi ritmitást mutat a bőrben. Reggel 4 órakor történt besugárzás esetén kb. ötször több bőrtumor (invazív laphámsejtes karcinóma) alakul ki az egérben, mint a délután 4 órás besugárzás esetén.
2011.11. [50]	<i>Bmal1^{-/-}/K5-SOS</i> egerek	A <i>bmal1^{-/-}/K5-SOS</i> egerek bőrén kevesebb bőrdaganat alakul ki, mint a K5-SOS egereken.
2012.05. [75]	Emberi melanocytá, keratinocytá és fibroblaszt tenyészet	<i>In vitro</i> a bőrt alkotó sejtekben igazolt az óragének expressziójának ritmitása, ill. az oszcilláció amplitúdója az adott sejt típusra jellemző.
2012.05. [81]	Önkéntesektől nyert emberi epidermális biopsziák	Az emberi epidermiszben több száz gén kifejeződése mutat napi ingadozását mRNS szinten (microarray eredmények).
2012.12. [64]	Önkéntesektől (naevus és mellette lévő normál bőr) és melanomás betegektől (melanoma és szomszédos nem tumoros) nyert szövetminták	A tumoros szövetmintában (melanoma) a <i>per1</i> , <i>per2</i> , <i>clock</i> expressziójának csökkenése a szomszédos nem tumoros szövethez képest. A <i>clock</i> mRNS és CLOCK fehérje termelődésének emelkedése a melanomás szövetmintákban a nem malignus naevus mintákhoz viszonyítva.

1.6. Bőrtumorok és a cirkadián óra

Annak ellenére, hogy a bőrtumorok incidenciája a legmagasabb az összes daganat közül (USA-ban évente kb. 1 millió új esetet diagnosztizálnak) [86], kevés vizsgálat foglalkozott eddig a cirkadián rendszer esetleges szerepével a bőrtumorok kialakulásában. A bőrtumorok közel 96%-át az úgynevezett nem-melanoma tumorok alkotják, melyek közé tartozik a laphámsejtes karcinóma (squamous cell carcinomas (SCCs)) és a bazálsejtes karcinóma (BCC), míg a maradék 4%-ot a melanoma adja [86]. Magyarországon az adatok hasonló megoszlást mutatnak, a nem-melanoma bőrtumorok az összes daganatot egyesítő lista élén állnak. A melanoma előfordulási gyakorisága évről-évre növekszik, incidenciája kb. 21/ 100 000 lakosra nézve [87].

Lahámsejtes karcinómával foglalkozó tanulmányban a DNS hibajavításban résztvevő enzim, a XPA expressziójának napszakos ritmicitását detektálták egérbőrben. A XPA expressziója napszakos ritmust mutat, a legmagasabb koncentrációját a kora esti órákban, a legalacsonyabbat a kora reggeli órákban éri el [88]. A kora reggeli órákban történő UVB besugárzásban részesülő egereknél az SCC előfordulása ötször gyakoribb, ill. a tumorok növekedési sebessége is gyorsabb volt, mint az esti órákban megegyező dózisu UVB sugárzást elszennvedő állatoknál [88]. Ezen éjszaka aktív (nokturnális) állatmodellen nyert eredmények alapján - bár a krónikus ritmuszavar hatását nem tesztelték- fontos szerepet tulajdonítanak a cirkadián órának az UVB sugárzás okozta karcinogenitás elleni védelemben. Az ember esetében a szerzők javasolják a késői napszakban (délután/este) a munkához, terápiához, stb kapcsolódó UV expozíció kerülését, az UV sugárzás karcinogén hatásának minimalizálása céljából. Az embernél a XPA expressziójának maximuma reggel 7 órakor mérhető [89]. Ez a nokturnális életmódú laboratóriumi állatokban tapasztaltakhoz képest éppen ellentétes fázisu génszabályozást jelent, ami megfelel annak, hogy az ember diurnális (nappali) aktivitású élőlény [77, 89].

Ezzel szemben korunk egyik legagresszívabb daganatának, a melanoma malignumnak a kialakulásában, nem csak az UV besugárzás játsza a legfőbb rizikótényezőt. A melanin-képző rendszernek a bőr homeosztázis fenntartásában számos feladata van, melyet a keringésből, idegvégződésből a melanocytákon ható, vagy helyileg termelődő számtalan hormon és molekuláris faktor együttesen befolyásol [90]. Melanomás egerek vizsgálata során a cirkadián rendszer deszinkronizációja megváltozott neurohumorális és metabolikus környezetet hozott létre, mely agresszív tumor növekedéshez vezetett [91]. Ehhez hasonlóan, metasztatikus melanomában szenvedő betegek, akiknél a vérmintából vizsgált immunológiai paraméterek (pl. IL9, IL17) nem mutattak periodicitást, csökkent betegségmentes túlélést mutattak, azokhoz a betegekhez képest, akiknél ezek a paraméterek egy kiszámítható ritmust követtek [92]. A szisztémás immunitás túlműködéses és alulműködéses állapotainak ritmusos váltakozását neuroendokrin moduláció okozhatja. [93]. Ezek alapján a bőr homeosztázisában szerepet játszó neurohumorális, metabolikus vagy immunológiai faktorok napszakos ritmusának zavara a melanoma növekedésének kedvezhet.

A szabályos napszakos ritmus megszűnésének a SCC-, és melanoma előfordulásának gyakoriságára gyakorolt hatása, a számos állatkísérlet ellenére a mai napig nem ismert. A bőrtumorok és a cirkadián rendszer deszinkronizációjának kapcsolatát tanulmányozó epidemiológiai vizsgálatok eredményei is igen ellentmondásosak. Néhány vizsgálat a tengerentúli repülőjáratokon dolgozók melanoma kialakulásának fokozott veszélyére hívja fel a figyelmet, de az emelkedett rizikó háttérében kiváltó okot nem sikerült tisztázniuk (pl: napszakos ritmus zavara vagy légköri sugárzás) [94,95]. A másik oldalon számos, a váltott műszakban dolgozók, ill légikísérők között végzett tanulmány megkérdőjelezi a napszakos ritmus felborulása és a bőrtumorok közötti kapcsolat lehetőségét [96,97]. Ezt támasztja alá egy friss közlemény, ahol az éjszakai műszakban dolgozók között a melanoma rizikó 44%-os csökkenését írták le [98].

Összefoglalva a melanoma esetében az eredmények igen ellentmondásosak, hiszen amíg az epidemiológiai vizsgálatok egy része a szabályos napszakos ritmus megszűnésekor a melanoma előfordulás csökkenéséről számol be, addig kísérletek bizonyítják azt is, hogy ezen állapot a tumor progresszióknak kedvez. A fokozott növekedés és szaporodás elsősorban a már transzformált sejtekben észlelhetőek, melyek a felborult napszakos ritmus által okozott metabolikus és neurohumorális diszregulációra elégtelen apoptotikus válasszal reagálnak. A melanoma kialakulásában a mai napig nem sikerült olyan hormont azonosítani, mely szerepe kizárólagos és nélkülözhetetlen lenne. Éppen ezért új hormonális faktorok irányába történő kutatás helyett, a sejtm metabolizmus napszakos szabályozásának részletesebb kutatása a bőrben ígéretes eredményeket hozhat.

Ezt a gondolatmenetet követve a továbbiakban a CLOCK óraprotein szerepének vizsgálatával foglalkoztunk klinikai vizsgálatokban. A CLOCK protein része a cirkadián óra „core” komplexének, valamint kapocsként működik a cirkadián oszcilláció és a sejtm metabolizmus szabályozása között. A CLOCK továbbá rendelkezik HAT (histon acetyltransferase) aktivitással, mely az órarendszer által szabályozott gének promoter régiójában található kromatint szelektíven remodellálja, valamint proliferációs és metabolikus útvonalakban (pl. glikolitikus és glukoneogenikus enzimek) fontos szerepet játszó non-hiszton fehérjékre [99,100] is hatással van. Bizonyított, hogy *clock* mutáns egerek túlsúlyossá válnak, bennük hiperglikémia, dislipidémia és máj elzsírosodás alakul ki, azaz metabolikus X szindrómájuk lesz [101].

A CLOCK fehérje működésének egy másik fontos aspektusa, a SIRT1-el (histon deacetylase sirtuin 1) történő interakciója, mely semlegesíti a CLOCK fehérje HAT aktivitását. A SIRT1 a CLOCK/BMAL1-el egy szabályzó komplexet képez az óragének által kontrollált gének promoter régiójában [102] és befolyásolják a CLOCK közvetített acetyláció

amplitúdóját/mértékét és a transzkripciós ciklusokat. Számos tumor kialakulásában (pl. prosztata- [103], emlő- [104] és kolorektális karcinóma [105]) is igazolták a SIRT1 szerepét.

A felsorolt adatok arra utalnak, hogy a cirkadián órafelhérjék közül a CLOCK kulcsszerepet játszhat a sejtmetabolizmus ritmikus szabályozásában, mely működése malignitás kialakulása során megváltozhat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Számos *in vitro* tanulmány bizonyította a cirkadián rendszer szerepét a sejtciklus, a DNS hibajavító mechanizmusok és az apoptózis szabályozásában, melynek megbomlása tumorképződéshez vezethet. Klinikai vizsgálatok is történtek, melyek során a tumoros szövetből és a szomszédos nem tumoros szövetből nyertek biopsziás anyagot és a bennük mért mRNS óragén expresszió mennyiségét hasonlították össze. A közlemények egybehangzóan az óragének csökkent expresszióját írták le a tumoros szövetekben. Sok esetben feltételezték, hogy a *per* óragén mRNS csökkenése vezethet a tumor kialakulásához, hiszen molekuláris szinten bizonyított a tumorszupresszor hatása. Azonban ezeknél az eredmények értékelésénél figyelembe kell venni, hogy a legtöbb klinikai kísérletben nem tértek ki a sejtösszetételbeli különbségre a tumoros és nem tumoros minták között, valamint, hogy a mRNS mennyiség csökkenésének a mértéke a két minta között mérsékelt volt. Ez felveti annak lehetőségét is, hogy a detektált különbséget a két minta közötti sejtösszetételi különbség adja. A kérdés tisztázása céljából fontos, hogy a transzkripcionális eltéréseket ne csak a tumorsejtekben, hanem egyidejűleg a tumor szövetben lévő nem tumoros sejtek által alkotott kompartmentekben (pl. lymphocytás infiltráció) is megvizsgáljuk. A bőr a heterogén összetétele és könnyű elérhetősége miatt ideális modellként szolgál ilyen hisztomorfológiai vizsgálatok kivitelezése céljából.

- (1) A munkánk kezdetén egyetlen olyan klinikai vizsgálat volt, mely emberi bőrből származó szövetmintákban igazolta az óragének jelenlétét és ritmicitását [73]. Arra vonatkozó adat nem volt, hogy a bőrben patológiás állapot (betegség) jelenlétekor, mi esetünkben bőrtumor, az óragének expresszálódnak-e. Melanoma malignum és mellette lévő nem tumoros bőrből történő mintavételt terveztünk óragén expresszió meghatározásra mRNAs és fehérje szinten is.
- (2) Korábban számos emberi vizsgálat történt különböző típusú daganatoknál, kivéve melanoma, ahol a tumorból származó minta óragén expressziójának mértékét hasonlították a mellette lévő nem tumoros szövetmintához [54-65] **(1. táblázat)**. A vizsgálatok során az óragének mRNS szintjének közel 50% csökkenését észlelték a tumoros mintában a kontroll szövetmintához viszonyítva. A vizsgálatunkban hasonló összehasonlítást terveztünk mRNS és fehérje szinten.
- (3) Egy daganat túlélésének megítélésében fontos szerepet játszanak a prognosztikai faktorok. Vizsgálatunkban a melanoma malignum jól ismert klinikai és hisztopatológiai prognosztikai faktorainak az óragének expressziójának mértékével történő összehasonlítását terveztük, esetleges új biomarker identifikálása reményében.
- (4) Annak tisztázására, hogy az óragének expressziójában észlelt különbségek esetleg csupán a sejtösszetétel differenciájának a következményei lehetnek, a melanomához hasonló melanocyter eredetű, de benignus elváltozásból (naevus) és mellette lévő normál bőrből történő mintavételt terveztünk. Ennek során először az óragének expressziójának jelenlétét vizsgáltuk, ill. a meglévő adatok alapján a hasonlóan melanocyter eredetű képletek és a két tünetmentes bőr óragén expressziós adatainak összevetését terveztük.

BETEGANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Beteganyag, szövetbiopszia

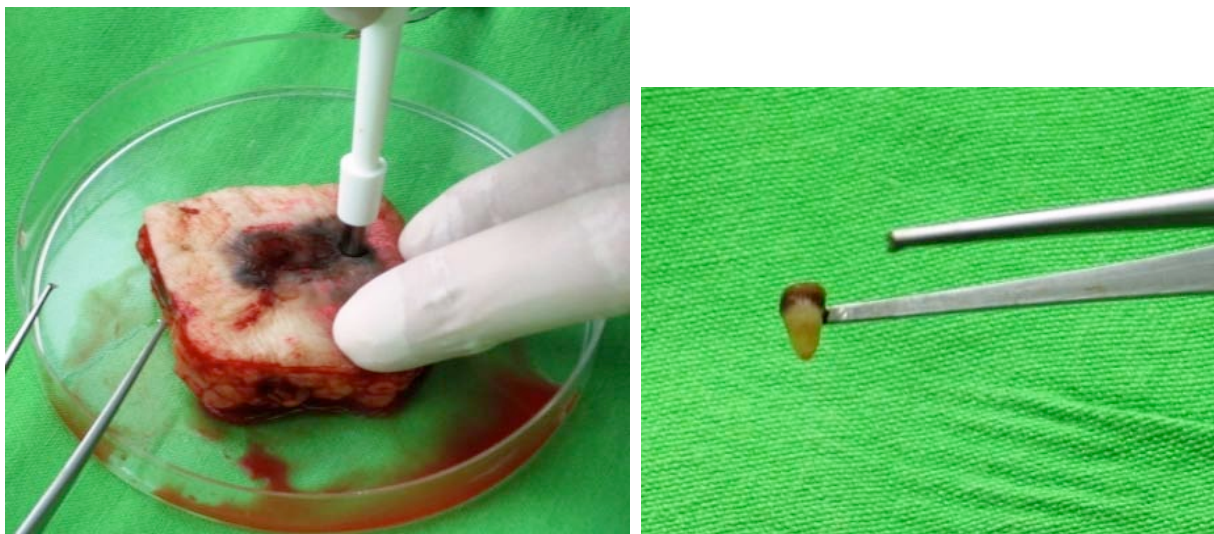
A vizsgálat során a PTE ÁOK Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinikán 32 esetben vettünk szövetmintát azon betegeinktől, ahol a melanoma malignum klinikai diagnózisa felmerült (betegek átlag életkora: 63 év, minimum: 24 év, maximum: 88 év). A műtét időpontjában egyik betegnél sem volt detektálható regionális és/vagy távoli áttét. A primer tumor minden esetben reggel 9 és 12 óra között került kimetszésre a melanoma ellátásnak megfelelő protokoll szerint. Ezt követően a tumorból és a mellette lévő nem tumoros bőrből (ez átlagban kb. a tumortól 2 cm-re helyezkedett el) 3-3 mm-es punch biopsziát vettünk (**1. kép**). Továbbá 10 önkéntestől 1-1 nem tumoros, melanocyter bőrelváltozásból, azaz naevusokból és a mellettük elhelyezkedő normál bőrből (naevustól kb. 1 cm-re) szintén történt mintavétel a fenn említetteknek megfelelően. A naevusokban dermatoszkópos vizsgálat során atípiát nem volt detektálható. A bőr alatti zsírszövetet (szubkutisz) a punch biopsziákról steril szikével leválasztottuk, majd a mintát azonnal TRI reagensben (SigmaT9424) homogenizáltuk és a RT-PCR analízisig -70°C -on tároltuk. Minden esetben a primér elváltozás szövettani vizsgálata megtörtént, mely igazolta a tumor diagnózisát, ill. típusát. A minták sejttözetételének meghatározása a Pécsi Tudományegyetem, Pathológiai Intézet, II. Sz. Diagnosztikai Laborjában alkalmazott rutin hisztopatológiai protokoll alapján történt (haematoxylin-eosin festést, S-100, HMB45A, Melan-A és tyrosinase immunfestés). Ezen festéseken kívül mind a malignus és nem malignus mintákon CLOCK és PER1 immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk.

A rutin hisztopatológiai vizsgálat során a 32 betegből 26 esetben igazolódott a melanoma malignum diagnózisa. A szövettanilag igazolt melanomák közül négy esetben RT-PCR nem volt kivitelezhető a magas melanin tartalom miatt, mely a fluorescens vizsgálattal interferált [106]. A minták tumorvastagság szerinti megoszlása, és az *American Joint Committee on*

Cancer Staging alapján történő (T) besorolása a következőképpen alakult: a 22 melanomából, 3 minta *in situ* melanoma ($T_{in situ}$), 7 eset <1 mm (T_1), további 7 eset 1-2 mm (T_2), 4 minta 2-4 mm (T_3), és 1 minta 4 mm-nél vastagabb (T_4) volt. Szövetteni beosztás alapján a melanomák nagyrésze felszínesen terjedő melanomának (n=18), két esetben lentigo maligna melanomának, és egy-egy esetben acrolentiginosus, ill. noduláris melanoma malignumnak bizonyult. A 10 anyajegyes minta közül 7 compound-, és 3 junctionális naevusnak megfelelő szövetteni képet mutatott.

A vizsgálat protokollját a Pécsi Orvostudományi és Egészségtudományi Központ Regionális Kutatás-Etikai Bizottsága (approval number: 3280/a) jóváhagyta és a kivitelezése minden tekintetben megfelelt a Helsinki Nyilatkozatnak és az *International Conference on Harmonization* által meghatározott helyes klinikai gyakorlat irányelveinek (Good Clinical Practice).

A vizsgálatba történő bevonás előtt – részletes tájékoztatást követően - a beleegyező nyilatkozatot minden résztvevő (vagy törvényes képviselő) aláírta.



1. kép

A melanoma malignum sebészi excízióját követő punch biopszia kivitelezése és a feldolgozott szövetminta látható a szubkutisz leválasztása előtt

3.2. Real-time RT-PCR

A teljes RNS extrakció a TRI reagens gyártó cég előírásának megfelelően történt (SigmaT9424). Az extraktum nukleinsav tartalmát 260 nm-en mért abszorbancia alapján (Ultraspec 2100 készülékkel) számoltuk. A gyártó leírásának megfelelően állítottuk elő a cDNS-t (Applied Biosystems, SuperScript RT enzyme, 4374966), 50 µL reakció elegyben 500 ng RNS volt. Real-time PCR kivitelezése során a 15 µL reakció elegy 3 µL cDNS oldatot, valamint a vizsgálni kívánt primereket tartalmazta (Applied Biosystems' TaqMan): *per1* (Hs00242988_m1), *per2* (Hs00256143_m1), *clock* (Hs01546767_m1), *cryl* (Hs01597805_g1). Belső kontrollként *β-actin*-t (Hs99999903_m1) és *hprt1*-t (Hs99999909_m1) alkalmaztuk. Bármely belső kontroll használata esetén az egészséges-, és tumoros bőr között különbséget alig vagy nem lehetett detektálni [107]. A reakció elegy összeállítása a gyártó előírásának megfelelően történt (Applied Biosystems, 4370048). Az óragén-expresszió változásának méréséhez StepOne Real-Time PCR készüléket (Applied Biosystems) használtuk (templát szintézis 50°C-on 2 perc, denaturáció 95°C-on 10 perc, amplifikáció 40 ciklusban (95°C 15s, 60°C 1 perc).

3.3. Immunhisztokémia

A paraffinba ágyazott szövettani blokkokból 4 µm-es metszeteket készítettünk, majd a deparaffinálást és rehidrációt (3 x 10 perc xylol, 3 x 3 perc ethanol), követően TBS pH 7,6 (Tris Buffered Saline) pufferben mostuk. Az antigének feltárására a metszeteket 10 mM, pH 6, 0 citrát pufferrel (HISTOLS® Citrate puffer, cat# 30010; Histopathológiai Kft) mikrohullámú sütőben (750W) 3 x 5 percig inkubáltuk.

Az egyes periódusok között szigorúan ellenőriztük a puffer szintjét. A kezelést követően a szobahőmérsékletre hűlt mintákat TBS-ben mostuk, ezt követően az endogén peroxidázt gátoltuk (Peroxidase blocking, cat#30012, Histopathology Ltd.). Ezen előkezelések után a mintákat TBS pufferben 5 percig rehidráltuk. A következő lépés során a metszeteket normál

szérummal (Background Blocking Protein Solution, cat#30013, Histopathology Ltd.), kezeltük a háttérfestődés gátlására 10 percig. A felesleges szérum eltávolítása után (leöntés), a metszetek inkubálása következett az elsődleges, fajlagos, monoklonális ellenanyaggal: anti-KAT13D/CLOCK (abcam; cat# ab65033) és anti-PER1 (abcam; cat# ab3443), a megfelelő hígítási koncentrációban alkalmazva (Dako, cat# S2022).

Az elsődleges ellenanyagokkal az inkubációs idő: 60 perc volt. A 3x 5 perc TBS pufferes mosás után, a metszeteket szobahőmérsékleten 30 percig, biotinhoz kapcsolt másodlagos ellenanyaggal (HISTOLS® -R Detection System, anti-rabbit, cat #30011.R; Histopathology Ltd.) inkubáltuk. Ismételt 3x5 perces mosás után LSAB (Labeled Streptavidin-Biotin) 45 perces inkubálás következett. Ezt 3x 5 perc mosás követte, a reakció láthatóvá tétele 3 amino – 9 etil - karbasol oldattal történt (HISTOLS® -Resistant AEC, cat# 30015.K, Histopathology Ltd.), rendszeres mikroszkópos kontroll mellett. Magfestést Mayer féle haematoxylinnel végeztük.

Negatív kontroll esetében az inkubációt az antitest hígításához használt pufferrel végeztük, az elsődleges ellenanyagok nélkül. Az immunhisztokémia során vizsgált óraproteinek (CLOCK és PER1) kiválasztása a RT-qPCR eredményeink alapján történt.

3.4. Adat/statisztikai elemzés

A bőrbioptiás mintákban mért óragén mRNS különbségek számszerűsítésére a $\Delta\Delta C_T$ módszert használtuk, a PCR reakciók amplifikációs hatékonyságának normalizálására szolgáló beállítások után.

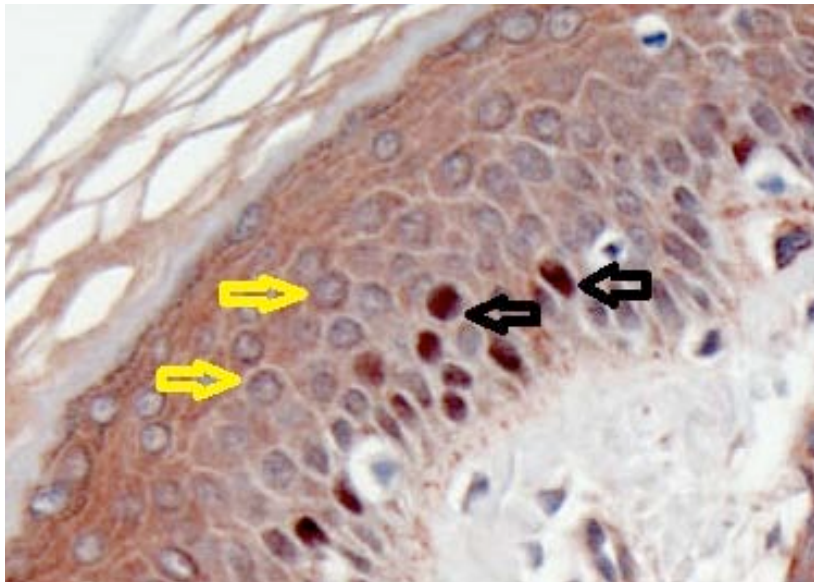
A bőrmintán végzett immunhisztokémiai reakció értékeléséhez az erősen nukleáris immunpozitivitást mutató sejtek számát, majd átlagát határoztuk meg a biopsziás anyag három metszetében. Minden metszetben három egymástól független terület került lefényképezésre egy Spot RT színes kamerával ellátott (Nikon, Tokyo, Japan) Nikon Microphot FXA mikroszkóppal 400x nagyításon szakképzett patológus által. A metszetek

értékelése nem-szerkesztett digitális színes képeken történt, az adott metszet szövettani diagnózisa és paramétereinek ismerete nélkül. Az értékelés során erős nukleáris immunpozitív sejtnak minősült az a sejt, melynek a magja barna volt és teljesen elfedte a haematoxylin festés kék színét (**2. kép**).

A különböző szöveti minták (melanoma, szomszédos nem tumoros bőr, naevus, és mellette lévő normál bőr) eredményeinek összehasonlítására, ill. a melanoma klinikopatológiai jellemzőivel lévő esetleges kapcsolat elemzésére Student két mintás tesztet alkalmaztunk (két oldalú, nem egyenlő varianciájú). A kétmintás t-próba jelen alacsony esetszámú vizsgálatban alkalmas volt az intervallumskálán értelmezett adatok átlagainak összehasonlítására.

A statisztikai elemzéshez SigmaStat for Windows Statistical Software, 3.5 verzióját (Systat Software Inc., San Jose, California) használtuk.

A statisztikai próbánál a szignifikancia-határának $p=0,05$ -öt tekintettük.

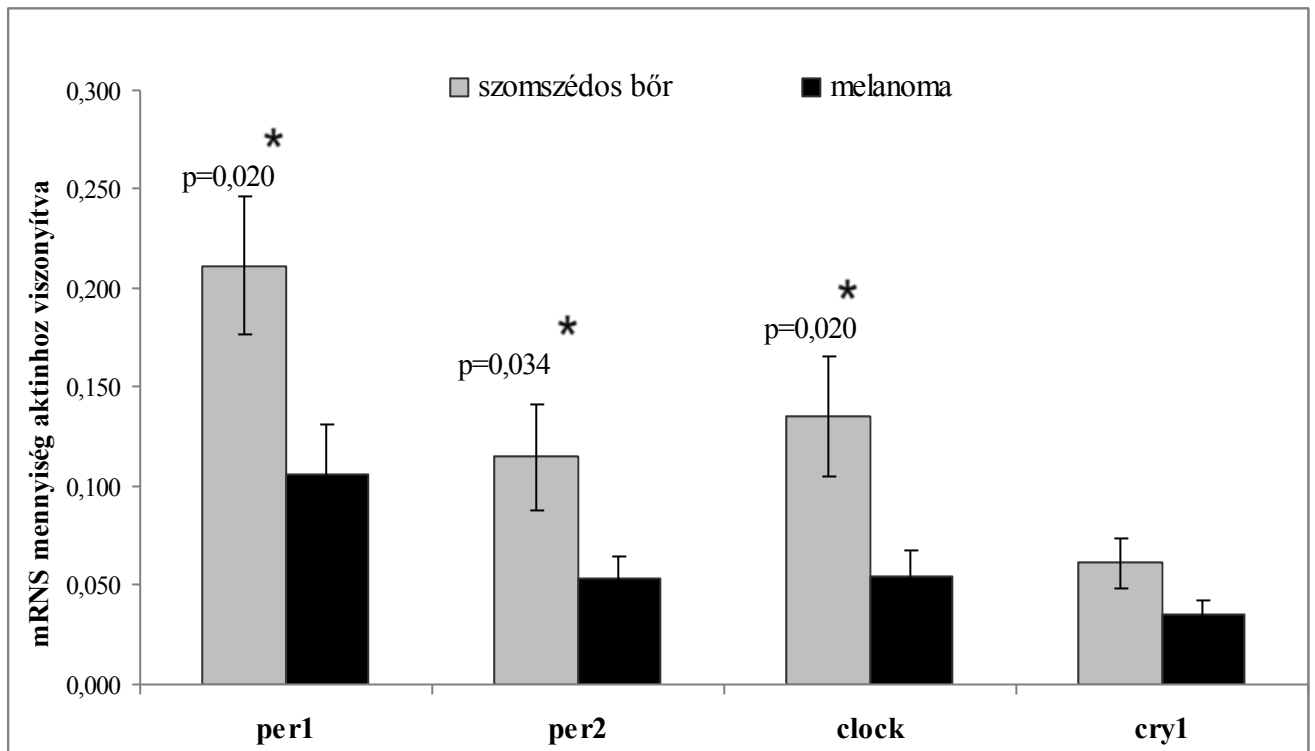


2. kép

Immunreaktív (fekete nyíl)-, és nem jelölődő (sárga nyíl) sejtek

4. EREDMÉNYEK

Per1, per2, clock és *cry1* expressziója melanomás betegek bőrbioptziás mintáin



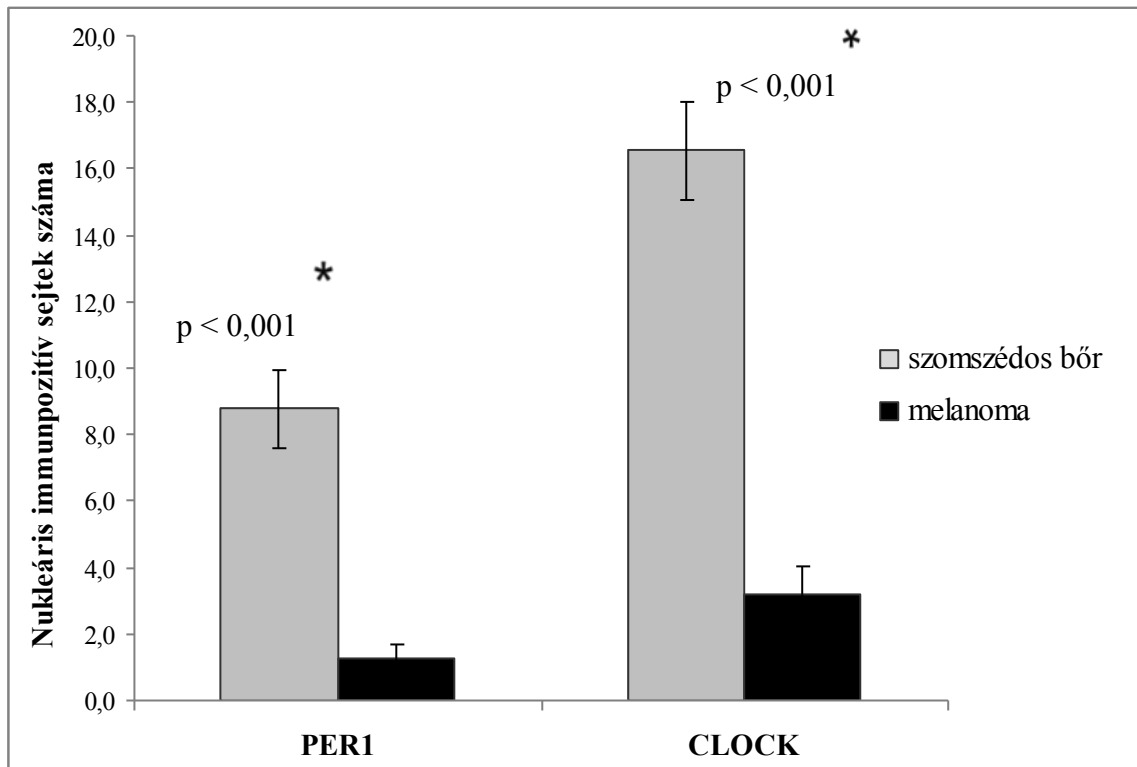
3. ábra

Óragének mRNS expressziója melanoma malignumban szomszédos nem tumoros bőrhöz viszonyítva

Vizsgálatunk során az óragének mRNS expressziójának csökkenését észleltük a melanomás szövetmintákban a mellette lévő normál bőrhöz viszonyítva (3. ábra). *Per1*, *per2*, *clock* és *cry1* expresszió szignifikánsan csökkent 22 melanomás mintából 18, 20, 17 és 15 esetben. Átlagban *per1*, *per2*, és *clock* expresszió szignifikáns csökkenést mutatott (p értékek: 0,020, 0,034, 0,020), míg *cry1* expressziója nem bizonyult annak (p=0,081). A csökkenés mértékének aránya hasonló volt a *per1*, *per2* és *clock* esetében is: 39%, 40%, 48%.

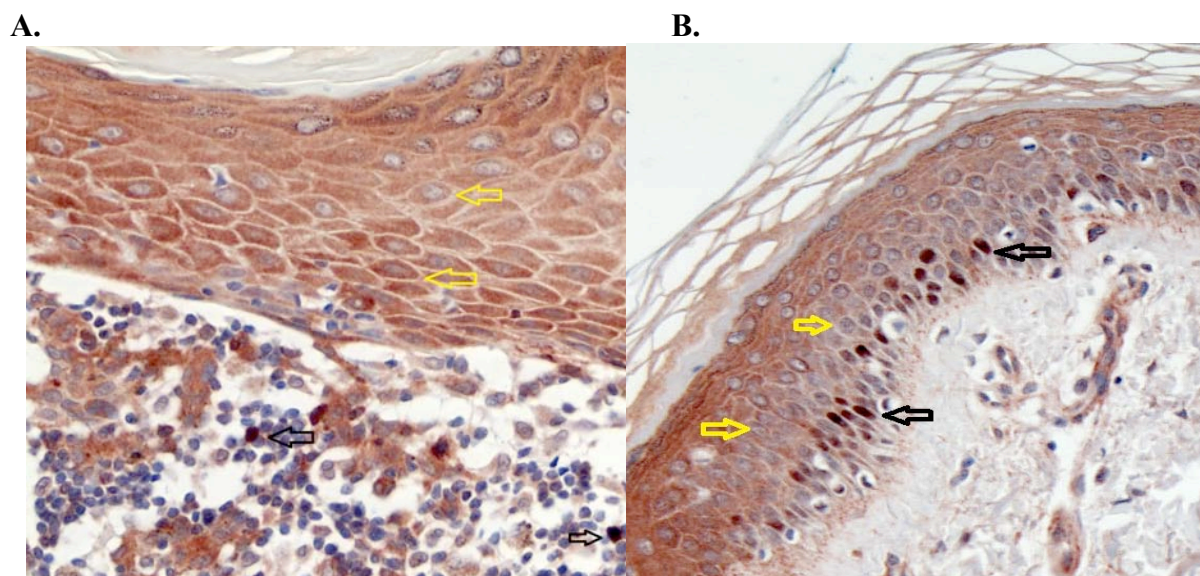
Mind a PER1, mind a CLOCK nukleáris immunpozítív sejtek száma egyértelmű csökkenést mutatott a tumoros mintákban a normál bőrhöz képest (p<0,001, 4. ábra). A csökkenés

szignifikáns volt 20 betegnél 22 mintából. A változás nagysága átlagosan 85% volt a PER1 és 81% a CLOCK fehérje esetében.



4. ábra

PER1 és CLOCK immunpozitív sejtek száma tumoros és mellette lévő nem tumoros szövetben



3. kép

Melanoma malignum- (A) és szomszédos nem tumoros (B) bőrbíopszia CLOCK immunhisztokémiai festődése (immunpozitív sejt: fekete nyíl, immunnegatív: sárga nyíl)

A PER1 vagy CLOCK antitesttel nukleárisan festődő sejtek túlnyomó része keratinocyta volt a tumor- és a normál bőrmintákban is (**3,5,6 képek**). A melanocyta és melanoma sejtek elhanyagolható mértékben festődtek a két alkalmazott antitesttel (**3,5,6 képek**).

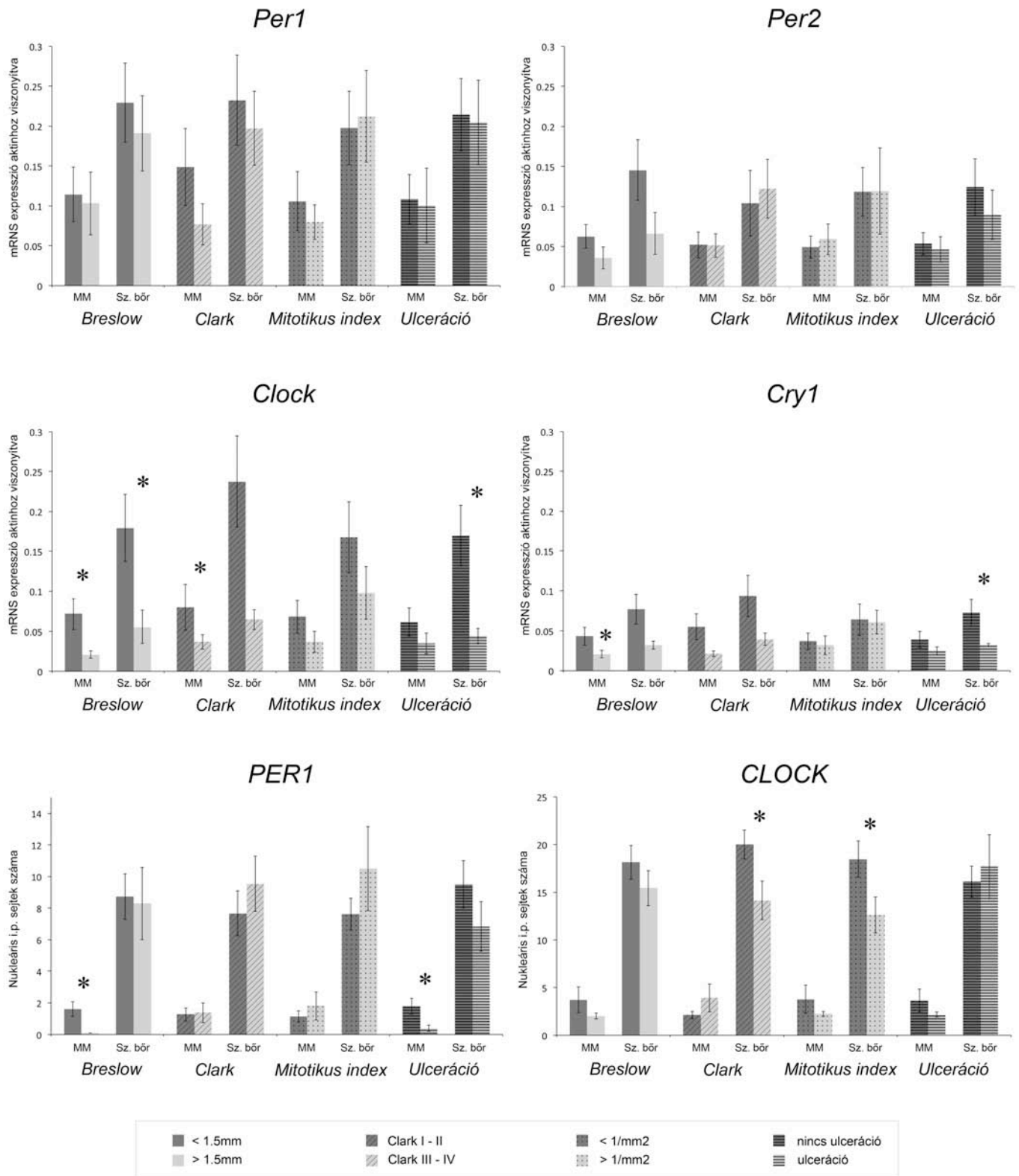
Mivel a PER1 és CLOCK fehérjék befolyásolják a transzkripciót, a nukleárisan pozitív immunsejtek száma a funkcionális molekuláris órával rendelkező sejtek számát tükrözheti. Az immunpozitív sejtek számát látóterenként határoztuk meg, a látóterenkénti összsejtszám figyelmen kívül hagyásával. Ezáltal az általunk immunpozitív sejtek számában detektált 5-6x csökkenés egy sejtgazdagabb tumoros mintában a melletti lévő normál bőrhöz történő hasonlításakor még nagyobb csökkenést jelenhet a funkcionális órával rendelkező sejtek arányában.

Melanoma malignum hisztopatológiai jellemzői és a cirkadián óragének közötti összefüggések vizsgálata

A melanomás bőrminták vizsgálata során a PER1 fehérje expressziója és a Breslow tumorvastagság, ill az ulceráció meglétével reciprok összefüggést találtunk ($p=0,006$, ill $0,018$, **5. ábra**), azaz vastagabb tumor esetében nagyobb mértékű csökkenés látható a PER1 immunpozitív sejtek számában a melanomás biopsziákban. Ezt a megfigyelést azonban csak fehérjeszinten sikerült igazolni, mRNS szinten sem a *per1*, sem a *per2* nem mutatott összefüggést egyik vizsgált hisztopatológiai jellemzővel sem.

Ezzel szemben, a *clock* expresszió több prognosztikai faktorról mutatott korrelációt mind mRNS és fehérjeszinten (**5. ábra**). mRNS szinten a melanomás szövetmintákban a Breslow tumorvastagsággal szignifikáns reciprok összefüggés volt detektálható ($p=0,023$). Továbbá azt találtuk, hogy a tumor melletti nem tumoros szövetmintákban a *clock* expresszió szintén fordítottan arányos kapcsolatban áll a Breslow tumorvastagsággal ($p=0,018$), a Clark szinttel ($p=0,017$) és az ulceráció jelenlétével ($p=0,005$). Ez azt jelenti, hogy a vastagabb tumoroknál a szomszédos nem tumoros bőrben a *clock* mRNS expresszió alacsonyabb, mint a vékonyabb

tumorok esetében. Fehérjeszinten hasonló volt megfigyelhető, a tumor magasabb Clark értékéhez ($p=0,032$) és mitotikus rátájához ($p=0,046$) a szomszédos, nem tumoros bőrben a CLOCK immunpozitív sejtek számának nagyobb mértékű csökkenése társult. A *cry1* óragén expressziója hasonló reciprok összefüggéseket mutatott a Breslow tumorvastagsággal ($p=0,034$) és az ulcerációval ($p=0,029$) a nem tumoros bőrben.

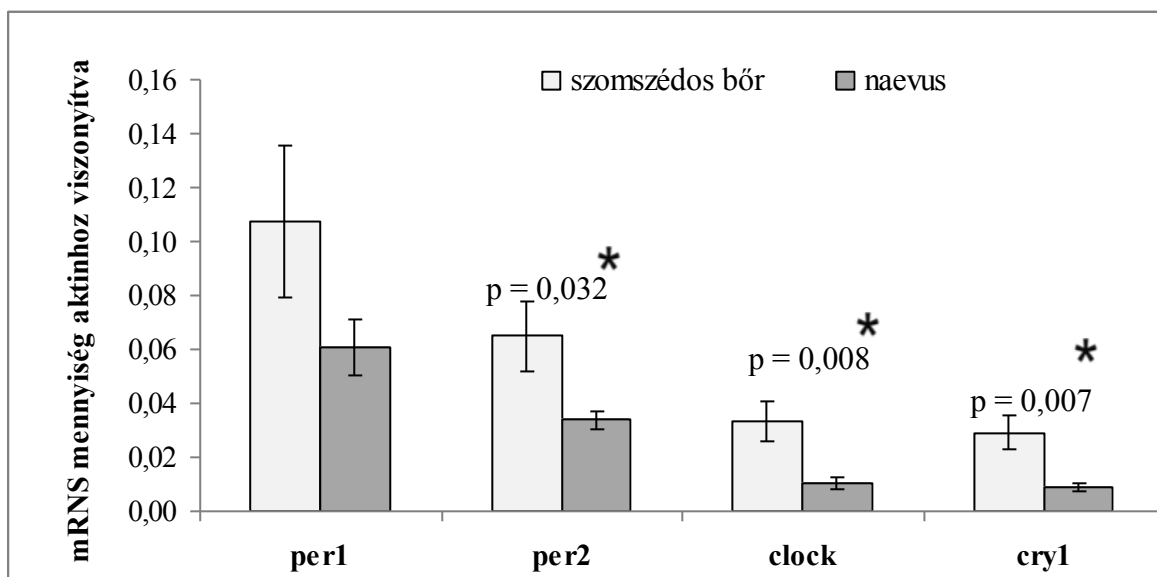


5. ábra

Óragének expressziójának és a melanoma hisztopatológiai jellemzőinek összehasonlítása

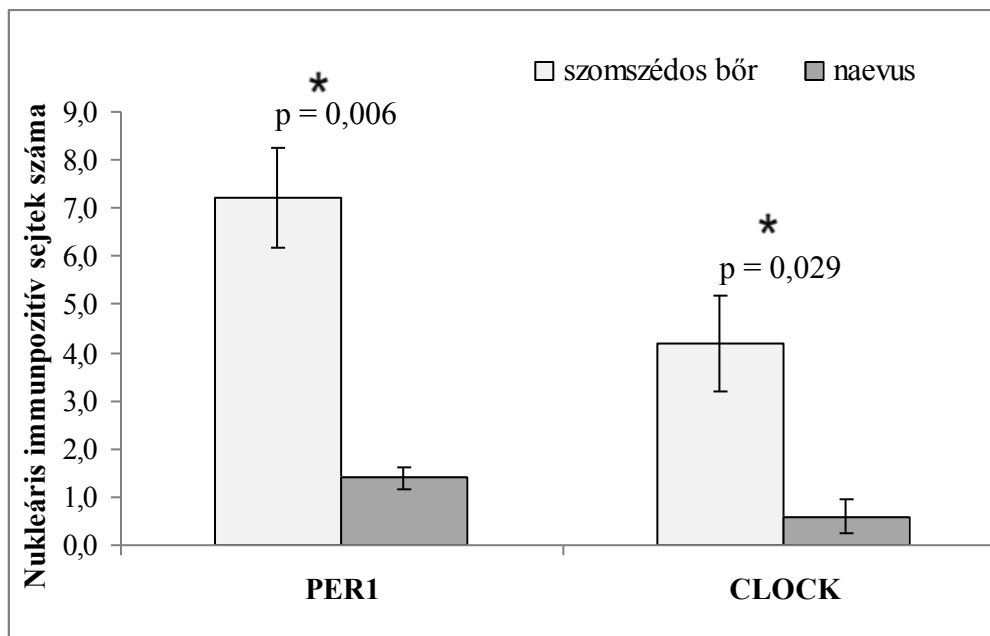
***Per1, per2, clock* és *cry1* expressziója naevus biopsziás mintákon**

Az óragén expresszió mRNS mennyiségének csökkenését detektáltuk a naevus mintákon összehasonlítva a szomszédos egészséges bőrrrel (**6. ábra**). A *per1*, a *per2*, a *clock* és a *cry1* expressziója szignifikánsan csökkent 10 mintából 8, 7, 8, és 9 esetben. Átlagosan a *per2*, a *clock* és a *cry1* mutatott szignifikáns csökkenést (p értékek: 0,032, 0,008, 0,007), ezzel ellentétben a *per1* mRNS expresszió csökkenése nem volt szignifikáns (p=0,145). A csökkenés aránya a *per2*-nél, a *clock*-nál és a *cry1*-nél 28%, 60% és 57% volt (**6. ábra**).



6. ábra

Óragének mRNS expressziója naevusban a szomszédos normál bőrhöz viszonyítva



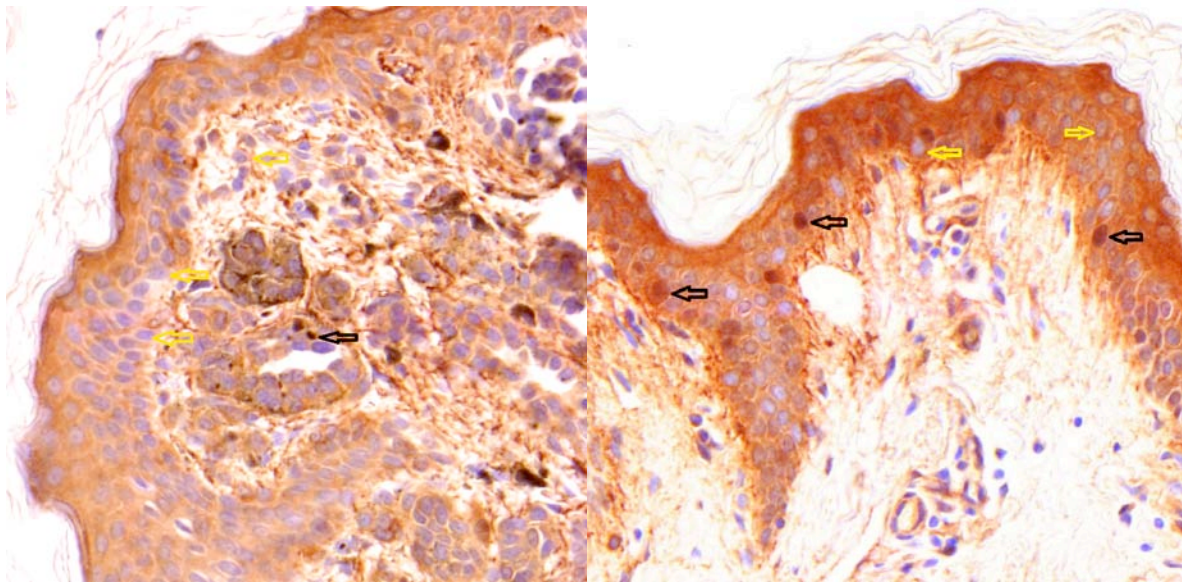
7. ábra

PER1 és CLOCK immunpozitív sejtek száma naevus és szomszédos normál bőrben

A naevus mintákban az immunpozitív sejtek száma kevesebb volt, mint a szomszédos normál bőrben (7. ábra). A melanoma mintákon észleltekhöz hasonlóan a melanocyták csekély mértékben festődtek a PER1 vagy CLOCK antitesttel, míg a keratinocyták erős pozitív reakciót adtak (4-6. képek). A 10 naevus mintából PER1 festődésnél 8, CLOCK festődésnél 6 esetben volt szignifikáns a csökkenés. A szomszédos normál bőrhöz viszonyítva mindkét fehérje mennyisége szignifikánsan csökkent (PER1/p=0,006; CLOCK/p=0,029). A csökkenés nagysága 81% volt a PER1, és 86% a CLOCK esetében.

A.

B.



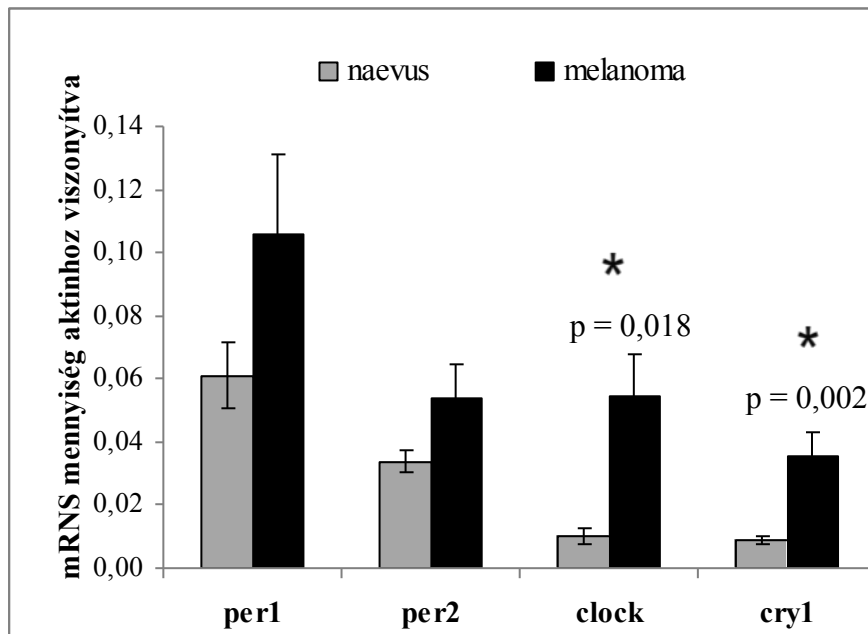
4. kép

Naevus- (A) és szomszédos nem tumoros (B) bőrbíopszia CLOCK immunhisztokémiai festődése (immunpozitív sejt: fekete nyíl, immunnegatív: sárga nyíl)

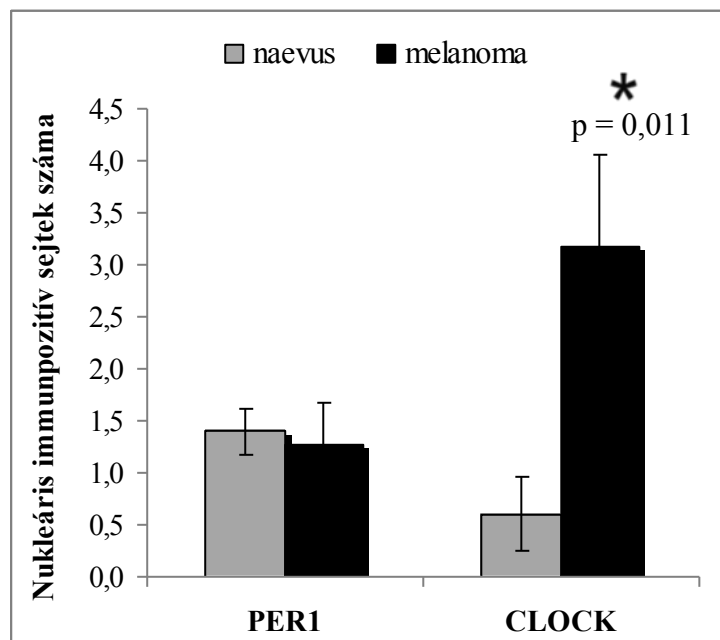
Naevus- és melanoma mintákon vizsgált óragén expresszió összehasonlítása

A nem malignus naevus mintákhoz képest a melanomában (8. ábra), a *clock* és a *cry1* expressziója mRNS szinten emelkedett volt (5,24x, $p=0,018$; ill. 3,98x, $p=0,002$). A *per1* és *per2* nem mutatott jelentősebb különbséget ($p=0,74$ és $p=0,54$). Fehérje szinten is detektálható volt a CLOCK immunpozitív sejtek számának növekedése a rosszindulatú elváltozásban (5,3x, $p=0,011$), míg a PER1 pozitív sejtek száma nem különbözött szignifikánsan ($p=0,91$).

A.



B.



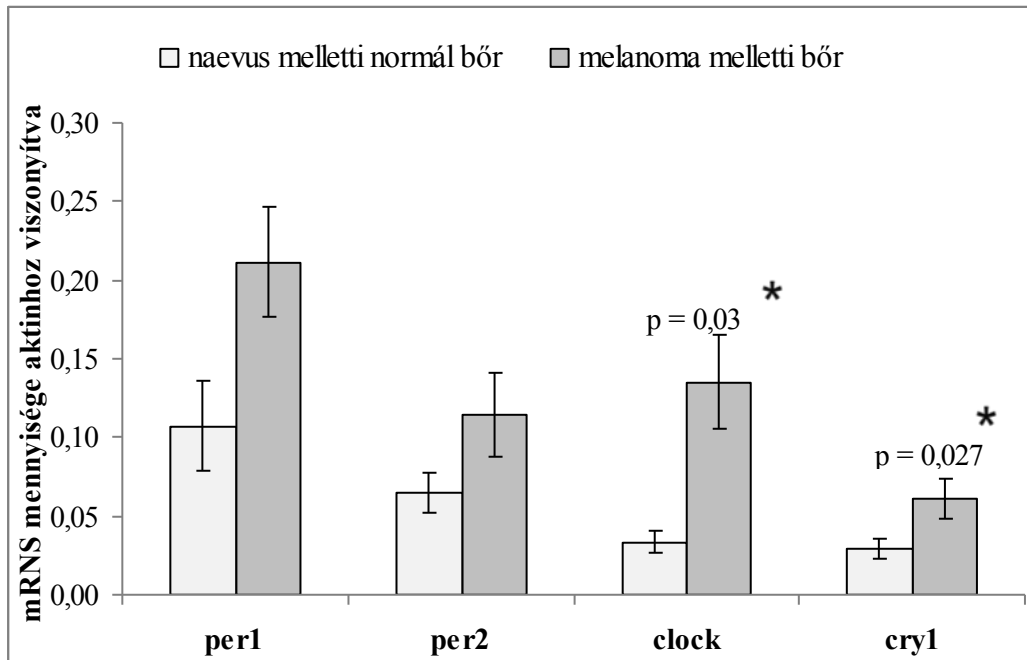
8. ábra

Naevus és melanoma minták óragén expressziójának összehasonlítása mRNS (A) és fehérje (B) szinten

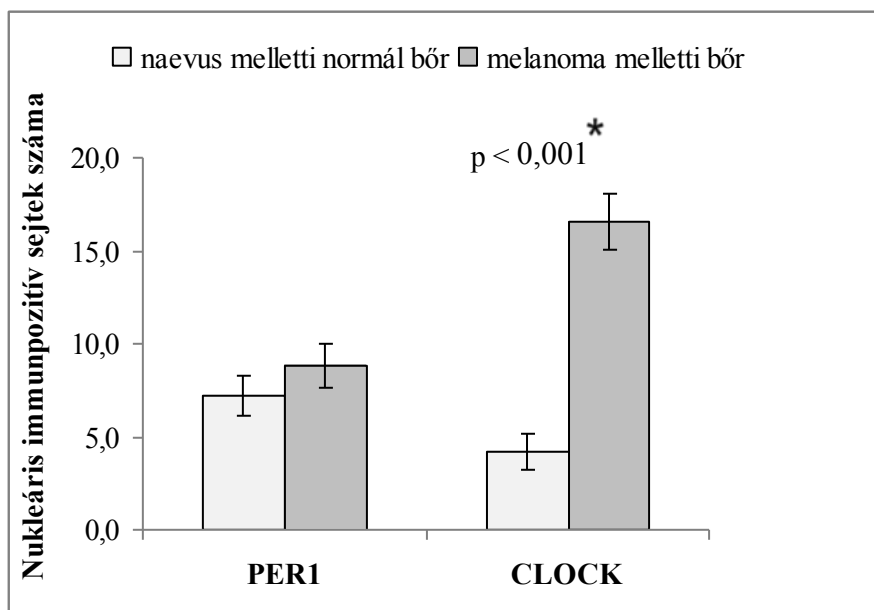
A *cry1* és a *clock* mRNS szint szignifikánsan emelkedett volt a tumor melletti nem tumoros bőrben, összehasonlítva a benignus lézió melletti bőrrel (9. ábra) (2,1x, $p=0,027$; és 4,0x, $p=0,003$). A *per1* és *per2* expressziója ez esetben sem különbözött szignifikánsan a két mintában

(p értékek: 0,8 és 0,9). Fehérje szinten a tumor melletti bőrben észleltük a CLOCK immunpozitív sejtek számának növekedését (3,94x, $p < 0,001$), míg a PER1 immunpozitív sejtek száma szignifikánsan nem változott.

A.

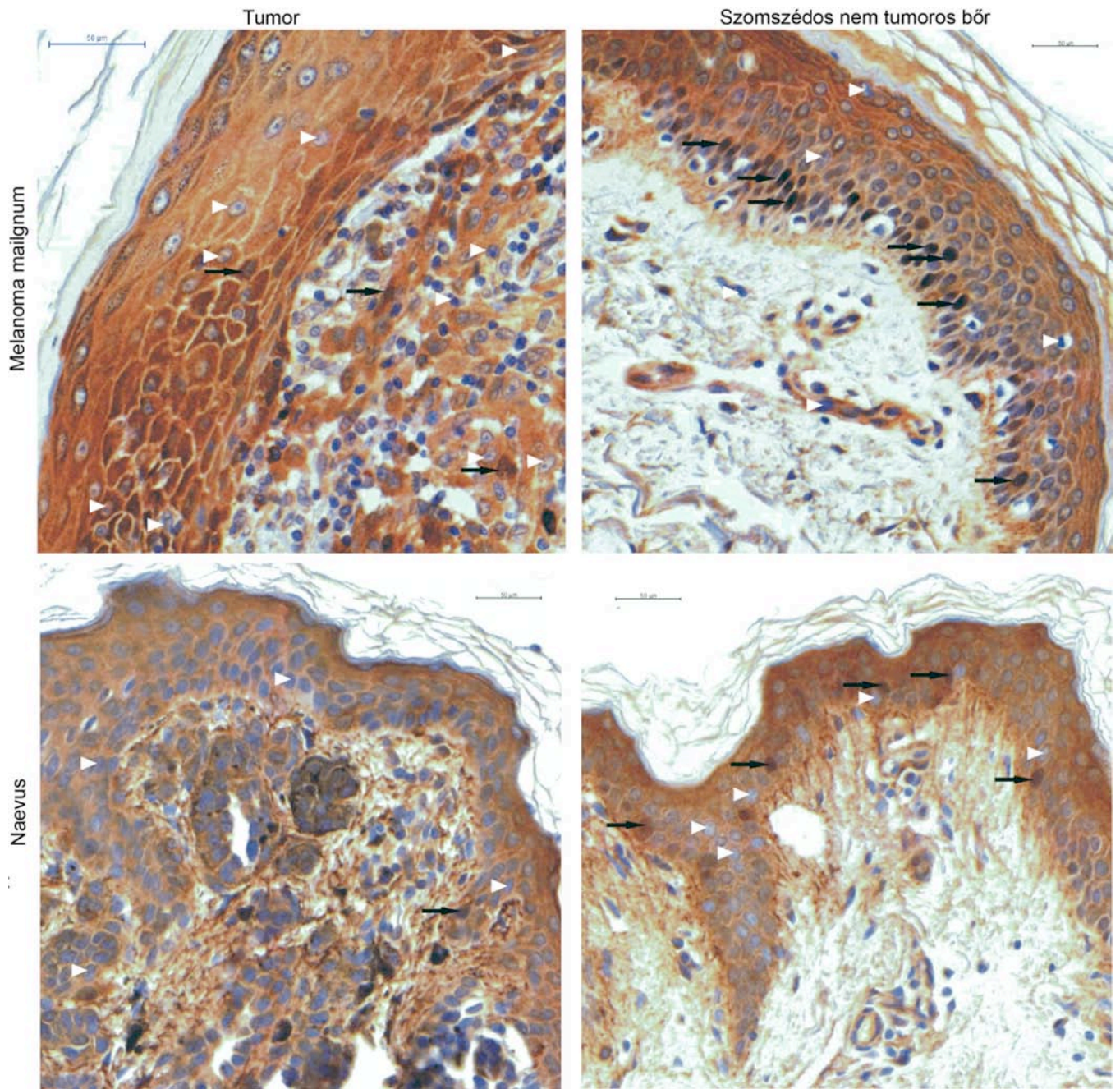


B.



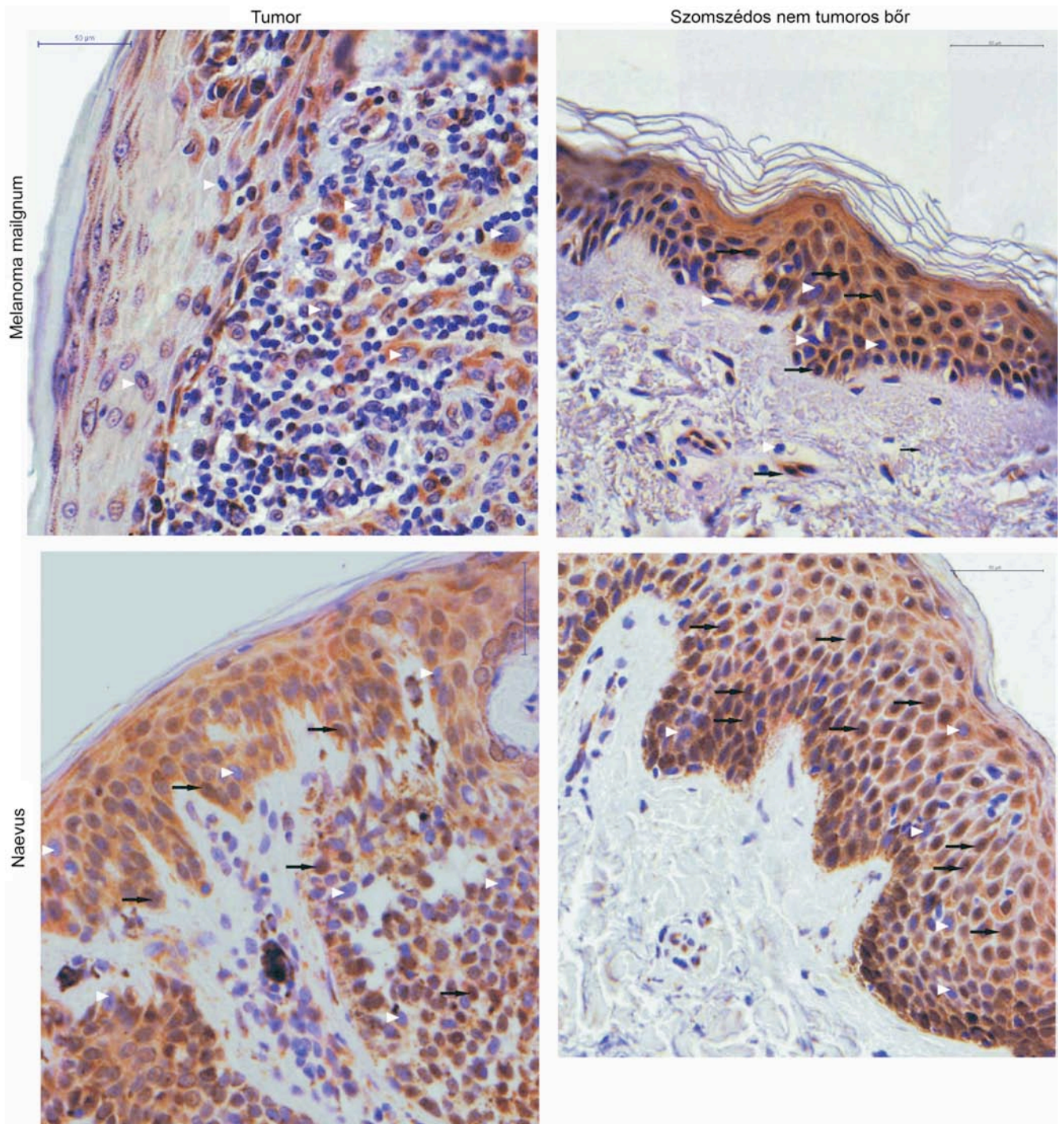
9. ábra

Naevus melletti normál bőr- és melanoma melletti nem tumoros bőrminták óragén expressziójának összehasonlítása mRNS (A) és fehérje (B) szinten



5. kép

CLOCK immunfestés a vizsgált bőrmintákon. Az immunpozitív sejtek elsősorban a bazális epidermiszben helyezkedtek el (fekete nyíl). A tumorban alig volt CLOCK immunpozitív sejt, mind a tumoros és nem tumoros sejtek között. Az immunnegatív sejteket fehér nyíllal jelöltük.



6. kép

PER1 immunfestés a vizsgált bőrmintákon. Az immunpozitív sejtek elsősorban a bazális epidermiszben helyezkedtek el (fekete nyíl). A tumorban kevés PER1 immunpozitív sejt volt, mind a tumoros és nem tumoros sejtek között. Az immunnegatív sejteket fehér nyíllal jelöltük.

5. MEGBESZÉLÉS

A humán melanoma szövetminták vizsgálata során nyert eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy a melanomában az óragének expressziója szignifikánsan csökkent a szomszédos nem tumoros szövethez képest (**3. ábra**). Az adataink megegyeznek a korábban más tumorfajtán pl. emlő-, endometrium-, prosztata-, vastagbél-, máj-, fej-nyaki laphám-, tüdő karcinóma, elvégzett hasonló felépítésű kísérletek eredményeivel, azaz, a szomszédos nem tumoros szövethez történő viszonyítás során a tumoros szövetekben észlelték az alulműködést [54-65] (**1. táblázat**). Figyelembe véve az óragének fiziológias folyamatokban játszott szerepét (apoptózis, DNS hibajavítás, sejtciklus szabályozása) az óragének downregulációja vagy a tumorképződés következménye vagy annak okozója lehet. A molekuláris adatokat áttekintve a *period* gének tumorszupresszorként viselkednek [32,36, 48,100,] azáltal, hogy bizonyos sejtciklus gének és az apoptózis szabályozásában résztvesznek, valamint kapcsolatban vannak a DNS károsodás által aktivált ellenőrzőfehérjékkel. A sejtciklus szabályozásában résztvevő *c-myc* protoonkogén is az óragének által szabályozott gének közé tartozik, melynek aktiválódását írták le *per2* mutáns egérben és ezzel párhuzamosan a *p53* alulműködését figyelték meg [32], azaz *per2* csökkent expressziója esetében fokozott a sejtproliferáció és a *p53* mediálta apoptózis is zavart szenved. Az óragén expresszió csökkenés által egy általános sejtciklus diszreguláció keletkezik azáltal, hogy a sejtproliferációban és tumor szupresszióban résztvevő, cirkadián expressziós mintázatot mutató gének (*cyclin D, Mdm2, Gad45a, cyclinA*) [32] szabályozása zavart szenved.

Tanulmányunkban az óragének mRNS expresszió csökkenésének a mértéke *per1* esetében az emlő karcinóma és *per2* esetében a vese-, és emlő karcinómához volt hasonló [61,64,65]. Szignifikáns *clock* csökkenést a nem tumoros szövethez viszonyítva melanomán kívül az irodalmi adatokat áttekintve nem írtak le [64] (**1. táblázat**). Az óragén-expresszió csökkenésének mértéke tulajdonképpen nem teljesen meggyőző a különféle dagantos

biopsziák összehasonlításában (**1. táblázat**), ami felveti az óragének eltérő transzkripcionális szabályozását szöveti szinten a tumorsejtek és nem tumoros sejtek között. Az immunhisztokémiai vizsgálataink során PER1 vagy CLOCK nukleáris immunfestődést adó sejtek nagy többségben az epidermális keratinocyták voltak (**3-6. képek**) mind a tumoros mind a nem tumoros szövetmintákban. Mindkét szövetmintában (tumoros és nem tumoros) kevés nukleáris jelölést észleltünk a melanoma/melanocytá részben. Ez a megfigyelésünk összhangban van azzal az irodalmi adattal, ahol az azonos bőrbíopsziából tenyésztett elsődleges sejt kultúrákon a melanocytákban az óragének gyengébb expresszióját detektálták a keratinocytákhoz képest [40]. Mind a melanoma, mind a naevus biopsziás mintáink esetében elsősorban a keratinocytákban észleltük az óraprotein expresszió lényeges csökkenését. Mindez igazolja a felvetésünket, hogy az óragének transzkripcionális szabályozása szöveti szinten eltérő a tumorsejtek és nem tumoros sejtek között ugyanazon biopsziás anyagon.

Az óragén expressziós adatok és a melanoma malignum hisztopatológiai jellemzőinek összevetése során a tumorvastagság és/vagy ulceráció jelenléte és a PER1 immunpozitivitás között fordított arányú összefüggést észleltünk. Hasonló összefüggést közöltek emlő-, és fejnyaki laphám karcinóma esetében [56,61].

Az észlelt összefüggés *per1* esetében mRNS szinten hiányzott, mely arra enged következtetni, hogy a PER1 immunpozitív sejtek számában bekövetkezett erőteljes csökkenés hátterében a poszt-transzkripcionális folyamatoknak van szerepe a vastag tumorok esetében (**5. ábra**). A vastagabb, előrehaladottabb, metabolizmusában is megváltozott tumorok esetében a *per1*-expressziót mutató sejtekhez a PER1 fehérje egy csökkentett transzlációs aránya társulhat.

A *clock* és *cry1* expresszió fehérje és mRNS szinten is fordított arányú összefüggést mutatott a melanoma prognosztikai faktoraival. Kiemelendő azonban, hogy a prognosztikai faktorokkal észlelt statisztikailag igazolható eltérések nagyrésze nem a tumoros mintával, hanem a szomszédos nem tumoros bőrrel volt kapcsolatban. A melanomás szövetmintákban

detektált óragén kifejeződési mintázat és a melanoma prognosztikai faktorai között csak néhány esetben találtunk egyértelmű összefüggést. A nyilvánvaló összefüggések hiánya a tumor és a prognosztikai faktorok között felvette annak lehetőségét, hogy a mérsékelt óragén expresszió csökkenés hátterében nem csak a malignus transzformáció áll.

Annak tisztázására, hogy a mérsékelt óragén downregulációt okozhatja-e a biopsziás minták közötti sejttöszetelési különbség, további nem malignus, eltérő sejttöszetelésű (ha a normál bőrhöz viszonyítottuk) bőrmintákat vizsgáltunk. A nem malignus naevus sejttöszetésele durván megközelíti a melanoma sejttöszetelését a melanocytá sejtek számának arányában. A naevus biopsziákban, a mellette lévő normál bőrhöz képest szintén az óragének expressziójának csökkenése volt látható (**6. ábra**), csakúgy mint a melanomában (**3. ábra**). Ezen eredmények alapján felmerül, hogy a tumorokban észlelt mérsékelt óragén expresszió csökkenés a tumor és a mellette lévő normál bőr sejttöszetelésének különbségéből adódik, a tumor jelenlététől függetlenül. Emberi szövetmintából tenyésztett melanocytá, keratinocytá és fibroblaszt sejtkultúrákon végzett vizsgálat során azt észlelték, hogy az óragének expressziójának amplitúdója és a mRNS szint oszcillációjának fázisa az adott sejttípusra volt jellemző [75]. A legnagyobb amplitúdót a keratinocyták mutatták, majd ezt követték a fibroblasztok és a leggyengébb oszcillációt a melanocyták adták. A különbségek gyakorlati jelentőségére a szerzők nem adnak magyarázatot, de ez az elsődleges sejtkultúrán végzett tanulmány megerősíti a megfigyelésünket/feltételezésünket, hogy a bőr szövetminta sejttöszetésele önmagában hozzájárulhat a megváltozott óragén expresszióhoz. Vizsgálatunk során összehasonlítottuk a melanoma- és naevus mintákból nyert adatainkat, annak tisztázása céljából, hogy a malignus transzformációnak van-e bármely szerepe az óragének megváltozott transzkripciós szabályozásában (**8. ábra**). Feltételezve, hogy a naevus sejttöszetésele bizonyos sejtarányokat tekintve hasonlít a melanomáéhoz, valamint, hogy a malignus és nem malignus melanocytá szövetmintákban a *per1* expresszióban nem volt különbség, ez

ismételten alátámasztja annak a lehetőségét, hogy a megváltozott *perl* mennyiség nem feltétlenül a malignus transzformáció indikátora tumorbiopsziákban. Ezzel szemben a *clock* és *cry1* expresszió szignifikáns indukciót mutatott a melanoma mintákban a naevus mintákhoz képest. Ez az eredmény utalhat arra, hogy egyes óragének transzkripcióját kontrollja csakugyan malignus átalakuláshoz kapcsolt. Vizsgálatunkban a *clock* és *cry1* expressziója egyértelmű emelkedést mutatott a melanomás mintákban, de adatainkból nem lehet következtetni arra, hogy az óragének ezen indukciója a rosszindulatú tumorban a malignus transzformáció oka-e vagy eredménye.

A cirkadián rendszer és a metabolizmus a CLOCK fehérjén keresztül kapcsolódhat össze [100]. Korábban igazolták, hogy a CLOCK fehérje pro-proliferációs hatással bír, valamint az anyagcsere útvonalakat befolyásolja, pl. a glikolitikus és glükoneogenikus enzimeken keresztül, ezáltal hozzájárulhat a tumor-kialakuláshoz. Amennyiben a szöveti metabolizmus befolyásolja a tumornövekedést és a cirkadián rendszert, nemcsak a tumorra, hanem a szomszédos nem tumoros sejtekre is hatással kell, hogy legyen. Mostanáig az óragén expressziót különböző tumorokban vizsgáló tanulmányok elsősorban a tumorsejtek analizésére koncentráltak, figyelmen kívül hagyva a környezeti szövet részletes elemzését. A melanoma sejtek túlélését befolyásolják a helyi- és szisztémás immun- és anyagcsere folyamatok, ezért a CLOCK fehérjét expresszáló bőrsejtek meghatározása, valamint genotoxikus stresszre adott válaszban betöltött szerepük meghatározása igen fontos lenne.

Összehasonlítva a melanoma szomszédos nem tumoros szövetmintáját a naevus melletti egészséges bőrrel, mRNS szinten a *cry1* és a *clock* expressziójának fokozódása találtuk szintén a melanomás eredményekhez hasonlóan (**9. ábra**). Ez az eredmény összhangban van a klinikopatológiai vizsgálatok eredményeivel is (**5. ábra**), azaz a CLOCK expresszáló sejtek a melanomás minták nem tumoros részében is zavart szenvednek.

Mind a tumoros, mind a szomszédos nem tumoros bőrben észlelt CLOCK indukció felveti annak lehetőségét, hogy a malignitáshoz kapcsolódó parakrin és/vagy szisztémás metabolikus, immun- és neurohumorális faktorok/mediátorok a bőrt alkotó melanocya sejteken kívül más sejtekre is hatnak. Az adataink alapján a melanomás betegeknél a tumor melletti bőr nem tekinthető egészségesnek, mert a rosszindulatú tumorhoz kapcsolódó szöveti reakciók hatással vannak rá. Ezen megfigyelésünket egy mostanában publikált kolorektális karcinómával kapcsolatos állatkísérlet is megerősíti, ahol a cirkadián szabályozás megbomlását írták le nem csak a tumorban, hanem a mellette lévő nem tumoros szövetben is [108]. Eredményeink alapján felmerül, hogy a bőrben észlelt patológiás CLOCK expresszió egy „nem normális” metabolikus környezetet reprezentál, mely elősegítheti a tumor-kialakulást (precancerosus állapot) vagy a tumorelles kezelés hatásosságát befolyásolhatja.

A témában közölt legfrissebb kutatások a tumorban létrejött anyagcserezavarban a cirkadián rendszer [109] és oxidatív biológiai folyamatok [110] kapcsolatát elemzik. Ugyanis minden proliferáló sejtnak meg kell küzdeni a sejtciklus fázisaiban létrejött metabolikus változások által okozott redox stresszel. Az apoptotikus útvonalak akkor aktiválódnak, ha a nem kívánt oxidatív stressz oly mértékű, hogy az a sejt genetikai integritását érinti. Malignus transzformáció esetében ezek az apoptotikus útvonalak elvesztik az érzékenységüket és ezáltal a daganatsejtek túlélnek még akkor is, ha az oxidatív terhelés a citoplazmájukban állandón kritikus szinteket ér el. Tehát a daganatsejtek túlélése és növekedése nagymértékben a reaktív oxigén szabadgyökökkel (reactive oxygen species, ROS) szembeni toleranciától függ, hogy megakadályozza az apoptotikus rendszer aktivációját. Az egészséges sejtekben ezek az igen reaktív molekulák mennyiségi szabályozása kulcsfontosságú, megakadályozva ezáltal a betegség kifejlődését vagy progresszióját. A ROS molekulák spatiotemporális megoszlását a sejtekben nagyon precíz mechanizmusok felügyelik [111]. A peroxiredoxinok (PRX) a ROS homeosztázis fő szabályozói. Közelmúltban fedezték fel, hogy *in vitro* az emberi

erythrocytákban az oxidációs ciklusoknak napszakos mintázata van, a sejtmag- és az óragének által szabályozott transzkripció visszacsatolási hurok hiányában is [112]. Sejtmaggal rendelkező sejtek esetében is a cirkadián óragének hiányában (knockout egerek) a PRX poszt-transzlációs, periodikus oszcillációja nem szűnik meg [113]. Vagyis az új, az óragénektől független cirkadián rendszer képes lehet, a metabolikus folyamatok ritmikus összehangolására, mely a jövőben a tumorkutatás és tumor terápiában új utat nyithat meg.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A sejtciklus, a DNS hibajavító mechanizmusok, az apoptotikus útvonalak és a cirkadián rendszer egymásra gyakorolt hatásának a bizonyítása új területet nyitott meg a tumor kutatásban. A cirkadián molekuláris óra egyes alkotói direkt tumorszupresszor hatással bírnak (*per1*, *per2*), míg néhány óragén szerepe ebben a folyamatban kevésbé egyértelmű (*clock*, *bmal1*, *cry*). Különböző emberi daganattípusokból nyert tumormintákban a tanulmányok az óragének mérsékelt alulműködését írták le a szomszédos normál szövetmintához viszonyítva. Ezt a jelenséget azonban nem feltétlenül a malignus transzformáció, hanem az eltérő sejtösszetétel is okozhatja.

A bőr ideális modell arra, hogy a cirkadián rendszer és a tumor-kialakulás kapcsolatát tanulmányozzuk, mivel: (i) a bőrt felépítő különböző sejttípusok mindegyike funkcionális perifériás órát tartalmaz, (ii) a cirkadián rendszer szerepe bizonyított állatkísérletes bőrtumor modellben.

Ezen szempontokat figyelembe véve vizsgálatunkban melanómás mintákon határoztuk meg az óragén expressziót mRNS és fehérje szinten. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan az óragének expressziójának csökkenését észleltük a szomszédos nem tumoros szövetmintához hasonlítva. Azonban a csökkenés mérsékelt volta, ill. a hisztopatológiai jellemzőkkel való kapcsolat hiánya miatt felmerült, hogy a csökkenést a sejtösszetételi különbség is adhatja. Feltevésünk igazolására jóindulatú, melanocytá tartalmú képletekből is biopsziát nyertünk és

ezen óragén expressziós értékeit is a szomszédos bőrhöz viszonyítottuk. Melanomához hasonlóan itt is az óragén expressziójának csökkenését detektáltuk, így igazolva láttuk, hogy csupán a sejtösszetételbeli különbség is okozhatja az óragén expresszió csökkenését.

Azonban mikor a naevus és melanoma adatokat összehasonlítottuk a *clock* óragén indukcióját találtuk transzkripciós és transzlációs szinten is a melanomás mintákban. Az immunhisztokémiai vizsgálat során a vizsgált órafehérjék elsősorban a szövetminták nem tumoros sejtjeiben (pl. keratinocytá) voltak detektálhatóak. Ugyanezek az eltérések nem csak a tumorban, hanem a mellette lévő még “tumormentes” bőrben is észlelhetőek voltak, összehasonlítva az egészséges bőrrrel. Ez felveti, hogy a malignitáshoz kapcsolódó lokális és/vagy szisztémás metabolikus, immun és neurohormonális faktorok a környező, nem malignus területekre (sejtekre) is hatással vannak, már akkor is, mikor klinikailag detektálható elváltozás még nincs jelen. Hogy ez az óragén expressziós eltérés a daganat kialakulásában szerepet játszik-e vagy annak következménye, vizsgálatunk nem ad választ, e célból további vizsgálatok végzése szükséges. Napjainkban megjelent közlemények kimagasló figyelmet tulajdonítanak a cirkadián rendszer (CLOCK) sejtmetabolizmusra gyakorolt hatásának és ezáltal a tumor kialakulásában és/vagy progressziójában betöltött szerepére, melyet a mi eredményeink is alátámasztanak.

A cirkadián rendszer és karcinogenezis kapcsolatának pontosabb feltérképezése a jövő feladata, mely az onkológiai terápia individualizációjában és hatásosságának a fokozódásában is ígéretes lehet.

7. A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK

- (1) Elsőként igazoltuk bőrelváltozásokban, jelen esetben melanomában és naevusban az óragének expresszióját mRNS és fehérje szinten.
- (2) A melanomában detektált óragének expressziójának csökkenése vizsgálatainkban nem mutatott egyértelmű összefüggést a melanoma klinikopatológiai jellemzőivel.
- (3) Elsőként kérdőjeleztük meg a tumoros és a szomszédos nem tumoros szövettani minták összehasonlítása során detektált óragén expresszió csökkenés hátterében a csak malignus transzformáció szerepét. Felvetettük és indirekt módon igazoltuk, hogy a csökkenés akár a szövettani eltérő sejtszerkezetelekből is adódhat.
- (4) Eredményeink alapján a *perl* tumorsszupresszor hatású óragén kifejeződésének csökkenése nem feltétlenül a malignus transzformáció következménye.
- (5) Kimutattuk, hogy a tumor melletti nem tumoros bőr sem egészséges, mert az egészséges bőrhöz képest az óragének megváltozott expressziója detektálható. Az észlelt patológiás CLOCK expresszió egy „nem normális” metabolikus környezetet reprezentálhat, melynek jelentőségét a tumor-kialakulásban (precancerosus állapot) vagy a tumorelles kezelés hatásosságának befolyásolásában még tisztázni kell.
- (6) A melanomában és a mellette lévő nem tumoros bőrben mind mRNS és fehérje szinten a CLOCK indukcióját detektáltuk. A malignus szövettani mintákban az óragének expressziójában észlelt transzkripciós változások elsősorban nem a daganatsejtekre, hanem a tumorban és környezetében található nem malignus sejtekre jellemzők.

8. RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

BCC	basal cell carcinoma
BMAL1	brain and muscle ARNT-like
CCND1	cyclin D1
CKI	casein kinase 1
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
CRY	cryptochrome
GADD45A	growth arrest and DNA damage inducible protein α
HAT	histon acetyl transferase
KITLG	KIT ligand
Klf9	Krüppel-like factor 9
LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin
MDM2	mouse double minute 2 homolog
NPAS2 –	neuronal PAS domain-containing protein 2
PDGRF	platlet-derived growth factor
PER	period homolog
Rev-erb α –	Orphan nuclear receptor NR1D1, rat homolog of the viral oncogene v-erb α
ROR –	Orphan nuclear receptor NR1F1, retinoid acid receptor-related orphan receptor
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
SCC	squamous cell carcinoma
SCN	suprachiasmaticus mag
SIRT1	histone deacetylase sirtuin 1

TBS	Tris Buffered Saline
TIM	timeless
TNF α	tumor necrosis factor α
UVB	ultraviolet B
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
WT	wild type
XPA	xeroderma pigmentosum A

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] F. Halberg, Physiologic 24-hour periodicity. General and procedural considerations with reference to the adrenal cycle, *Z. Vitam. Horm. Fermentforsch.* 10 (1959) 225-296.
- [2] B.M. Sweeney, J.W. Hastings, Characteristics of the diurnal rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*, *J. Gen. Physiol.* 43 (1957) 285–299.
- [3] A. Mitsui, S. Kumazawa, A. Takahashi, H. Ikemoto, S. Cao, T. Arai, Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically, *Nature.* 323 (1986) 720–722.
- [4] E. Bünning, *Die physiologische Uhr.* Springer Verlag, Berlin. 1958.
- [5] C.S. Pittendrigh, V.G. Bruce, N.S. Rosenzweig, M.L. Rubin, A biological clock in *Neurospora*, *Nature.* 184 (1959) 169-170.
- [6] J.E. Harker, Diurnal rhythms in the animal kingdom, *Biol. Reviews.* 33 (1958) 1-52
- [7] J. Aschoff, Tierische Periodik unter dem Einfluss von Zeitgebern, *Z. Tierpsychol.* 15(1958) 1–30.
- [8] A.E. Reinberg, H. Lewy, M. Smolensky, The birth of chronobiology: Julien Joseph Virey 1814, *Chronobiol. Int.* 18 (2001) 173-186

- [9] N. Mrosovsky, S.G. Reebbs, G.I. Honrado, P.A. Salmon, Behavioural entrainment of circadian rhythms, *Experientia*. 45 (1989) 696-702.
- [10] C.P. Richter, A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monogr.* 1(1922) 1-55.
- [11] M.C. Antle, N.M. Steen, R.E. Mistlberger, Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster, *Neuroreport*. 12 (2001) 2901–2905.
- [12] A. Balsalobre, L. Marcacci, U. Schibler, Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts, *Curr. Biol.* 10 (2000) 1291–1294.
- [13] A.B. Reddy, E.S. Maywood, N.A. Karp, V.M. King, Y. Inoue, F.J. Gonzalez, K.S. Lilley, C.P. Kyriacou, M.H. Hastings, Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome, *Hepatology* 45 (2007) 1478–1488.
- [14] F.K. Stephan, A.J. Davidson, Glucose, but not fat, phase shifts the feeding-entrained circadian clock, *Physiol. Behav.* 65 (1998) 277–288.
- [15] J. Aschoff, Spontanperiodik des Menschen bei Ausschluss aller Zeitgeber, *Naturwissenschaften*. 49 (1962) 337–342.
- [16] D.E. Nelson, J.S. Takahashi, Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesocricetus auratus*), *J. Physiol.* 439 (1991) 115-145.
- [17] R. Refinetti, *Circadian physiology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2006.
- [18] A.T. Winfree, Integrated view of resetting a circadian clock, *J. Theor. Biol.* 28 (1970) 327-374.
- [19] C.S. Pittendrigh, Circadian rhythms and the circadian organization of living systems, *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 25 (1960) 159-184.
- [20] M. Hastings, J.S. O’Neill, E.S. Maywood, Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms, *J. Endocrinol.* 195 (2007) 187–198.
- [21] J.C. Dunlap, Molecular bases for circadian clocks, *Cell*. 96 (1999) 271–290.

- [22] N. Gekakis, D. Staknis, H.B. Nguyen, F.C. Davis, L.D. Wilsbacher, D.P. King, J.S. Takahashi, C.J. Weitz, Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism, *Science*. 280 (1998) 1564-1569.
- [23] E.A.Jr. Griffin, D. Staknis, C.J. Weitz, Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock, *Science*. 286 (1999) 768-771.
- [24]. M.P. Antoch, R.V. Kondratov, J.S. Takahashi, Circadian clock genes as modulators of sensitivity to genotoxic stress, *Cell. Cycle*. 4 (2005) 901-907.
- [25] R. Chen, A. Schirmer, Y. Lee, H. Lee, V. Kumar, S.H. Yoo, J.S. Takahashi, C. Lee, Rhythmic PER abundance defines a critical nodal point for negative feedback within the circadian clock mechanism, *Molecular. Cell*. 36 (2009) 417–430.
- [26] A.E. Hoffman, T. Zheng, Y. Ba , R.G. Stevens, C.H. Yi, D. Leaderer, Y. Zhu, Phenotypic effects of the circadian gene Cryptochrome 2 on cancer-related pathways, *BMC. Cancer*. 10 (2010) 110.
- [27] H.M. Lee, R. Chen, H. Kim, J.P. Etchegaray, D.R. Weaver, C. Lee, The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 108 (2011) 16451-16456.
- [28] T.G. Granda, X.H. Liu, R. Smaaland, N. Cermakian, E. Filipski, P. Sassone-Corsi, F. Lévi, Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor, *FASEB. J*. 19 (2005) 304–306.
- [29] A. Gréchez-Cassiau, B. Rayet, F. Guillaumond, M. Teboul, F. Delaunay, The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation, *J. Biol. Chem*. 283 (2008) 4535–4542.
- [30] T. Matsuo, S. Yamaguchi, S. Mitsui, A. Emi, F. Shimoda, H.Okamura, Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo, *Science*. 302 (2003) 255–259.

- [31] S. van den Heiligenberg, P. Deprés-Brummer, H. Barbason, B. Claustrat, M. Reynes, F. Lévi, The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats, *Life Sci.* 64 (1999) 2523–2534.
- [32] L. Fu, H. Pelicano, J. Liu, P. Huang, C. Lee, The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo, *Cell.* 111 (2002) 41–50.
- [33] P.G. Roy, A.M. Thompson, Cyclin D1 and breast cancer, *Breast.* 15 (2006) 718–727.
- [34] S. Sahar, P. Sassone-Corsi, Circadian clock and breast cancer: a molecular link, *Cell. Cycle.* 6 (2007) 1329–1331.
- [35] B.H. Miller, E.L. McDearmon, S. Panda, K.R. Hayes, J. Zhang, J.L. Andrews, M.P. Antoch, J.R. Walker, K.A. Esser, J.B. Hogenesch, J.S. Takahashi, Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104 (2007) 3342–3347.
- [36] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, T.H. Kang, J.T. Reardon, J.H. Lee, N. Ozturk, Circadian clock control of the cellular response to DNA damage, *FEBS. Lett.* 584 (2010) 2618–2625.
- [37] T.H. Kang, J.T. Reardon, M. Kemp, A. Sancar, Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106 (2009) 2864–2867
- [38] T.H. Kang, L.A. Lindsey-Boltz, J.T. Reardon, A. Sancar, Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107 (2010) 4890–4895.
- [39] M. Keller, J. Mazuch J, U. Abraham, G.D. Eom, E.D. Herzog, H.D. Volk HD, A. Kramer, B. Maier, A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106 (2009) 21407–21412.

- [40] J. Mullenders, A.W. Fabius, M. Madiredjo, R. Bernards, R.L. Beijersbergen, A large scale shRNA barcode screen identifies the circadian clock component ARNTL as putative regulator of the p53 tumor suppressor pathway, *PLoS. One.* 4 (2009) e4798.
- [41] N. Ozturk, J.H. Lee, S. Gaddameedhi, A. Sancar, Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106 (2009) 2841–2846.
- [42] S. Davis, D.K. Mirick, R.G. Stevens, Night shift work, light at night, and risk of breast cancer, *J. Natl. Cancer. Inst.* 93 (2001) 1557–1562.
- [43] E.S. Schernhammer, F. Laden, F.E. Speizer, W.C. Willett, D.J. Hunter, I. Kawachi, G. A. Colditz, Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study, *J. Natl. Cancer. Inst.* 93 (2001) 1563–1568.
- [44] E.S. Schernhammer, F. Laden, F.E. Speizer, W.C. Willett, D. J. Hunter, I. Kawachi, C.S. Fuchs, G.A. Colditz, Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study, *J. Natl. Cancer. Inst.* 95 (2003) 825–828
- [45] T.C. Erren, R.J. Reiter, Defining chronodisruption, *J. Pineal. Res.* 46 (2009) 245-247.
- [46] E. Filipski, P. Subramanian, J. Carriere, C. Guettier, H. Barbason, F. Levi, Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice, *Mutat. Res.* 680 (2009) 95–105.
- [47] K. Straif, R. Baan, Y. Grosse, B. Secretan, F.E. Ghissassi, V. Bouvard, A. Altieri, L. Benbrahim-Tallaa, V. Coglianò, Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting, *Lancet. Oncology.* 8 (2007) 1065–1066.
- [48] S. Gery, N. Komatsu, L. Baldjyan, A. Yu, D. Koo, H.P. Koeffler, The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells, *Mol. Cell.* 22 (2006) 375–382.
- [49] X. Gu, L. Xing, G. Shi, Z. Liu, X. Wang, Z. Qu, X. Wu, Z. Dong, X. Gao, G. Liu, L. Yang, Y. Xu, The circadian mutation *PER2*^{S662G} is linked to cell cycle progression and tumorigenesis, *Cell. Death. Differ.* 19 (2012) 397–405.

- [50] P.Janich, G. Pascual, A. Merlos-Suárez, E. Batlle, J. Ripperger, U. Albrecht, H.Y. Cheng, K. Obrietan, L. Di Croce, S.A. Benitah, The circadian molecular clock creates epidermal stem cell heterogeneity, *Nature*. 480 (2011) 209-214.
- [51] R. V. Kondratov, A.A. Kondratova, V.Y. Gorbacheva, O.V. Vykhovanets, M.P. Antoch, Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock, *Genes. Dev.* 20 (2006) 1868–1873.
- [52] M. Gauger, A. Sancar, Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer, *Cancer Res.* 65 (2005) 6828–6834.
- [53] M.P. Antoch, V.Y. Gorbacheva, O. Vykhovanets, I.A.Toshkov, R.V. Kondratov, A.A. Kondratova, C. Lee, A.Y. Nikitin, Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis, *Cell. Cycle.* 7 (2008) 1197-1204.
- [54] Q. Cao, S. Gery, A. Dashti, D. Yin, Y. Zhou, J. Gu, H.P. Koeffler, A Role for the Clock Gene *Per1* in Prostate Cancer, *Cancer. Res.* 69 (2001) 7619-7625.
- [55] S. Gery, N. Komatsu, N. Kawamata, C.W. Miller, J. Desmond, R.K. Virk, A. Marchevsky, R. Mckenna, H. Taguchi, H.P. Koeffler, Epigenetic silencing of the candidate tumor suppressor gene *Per1* in non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer. Res.* 13 (2007) 1399-1404.
- [56] C.M. Hsu, S.F. Lin, C.T. Lu, P.M. Lin, M.Y. Yang, Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma, *Tumour. Biol.* 33 (2012) 149-155.
- [57] Y.M. Lin, J.H. Chang, K.T. Yeh , M.Y. Yang, T.C. Liu, S.F. Lin, W.W. Su WW, J.G: Chang, Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma, *Mol. Carcinog.* 47 (2008) 925–933.
- [58] M.C. Shih, K.T. Yeh, K.P. Tang, J.C. Chen, J.G. Chang, Promoter methylation in circadian genes of endometrial cancers, *Mol. Carcinog.* 45 (2006) 732-740.

- [59] X. Wang, D. Yan, M. Teng, J. Fan, C. Zhou, D. Li, G. Qiu, X. Sun, T. Li, T. Xing, H. Tang H, X. Peng, Z. Peng, Reduced expression of PER3 is associated with incidence and development of colon cancer, *Ann. Surg. Oncol.* 19 (2012) 3081-3088.
- [60] Y. Wang, L. Hua, C. Lu, Z. Chen, Expression of circadian clock gene human Period2 (hPer2) in human colorectal carcinoma, *World. J. Surg. Oncol.* 9 (2011) 166.
- [61] S.L. Winter, L. Bosnoyan-Collins, D. Pinnaduwege, I.L. Andrulis, Expression of the Circadian Clock Genes Per1 and Per2 in Sporadic and Familial Breast Tumors, *Neoplasia.* 9 (2007) 797-800.
- [62] K.T. Yeh, M.Y. Yang, T.C. Liu, J.C. Chen, W.L. Chan, S.F. Lin, J.G. Chang, Abnormal expression of period I (PER1) in endometrial carcinoma, *J. Pathol.* 206 (2005) 111-120.
- [63] K.L. Pogue-Geile, J. Lyons-Weiler, D.C. Whitcomb, Molecular overlap of fly circadian rhythms and human pancreatic cancer, *Cancer. Lett.* 243 (2006) 55-57.
- [64] Z. Lengyel, C. Lovig, S. Kommedal, R. Keszthelyi, G. Szekeres, Z. Battyáni, V. Csernus, A.D. Nagy, Altered expression patterns of clock gene mRNAs and clock proteins in human skin tumors, *Tumor. Biol.* 34 (2013) 811-819.
- [65] G. Mazzoccoli, A. Piepoli, M. Carella, A. Panza, V. Paziienza, G. Benegiamo, O. Palumbo, E. Ranieri, Altered expression of the clock gene machinery in kidney cancer patients, *Biomed. Pharmacother.* 66 (2012) 175-179.
- [66] P. Alhopuro, M. Björklund, H. Sammalkorpi, M. Turunen, S. Tuupanen, M. Biström, I. Niittymäki, H.J. Lehtonen, T. Kivioja, V. Launonen, J. Saharinen, K. Nousiainen, S. Hautaniemi, K. Nuorva, J.P. Mecklin, H. Järvinen, T. Orntoft, D. Arango, R. Lehtonen, A. Karhu1, J. Taipale, L.A. Aaltonen, Mutations in the circadian gene CLOCK in colorectal cancer, *Mol. Cancer. Res.* 8 (2010) 952-960.
- [67] W.J. Hrushesky, G.A. Bjarnason, Circadian cancer therapy, *J. Clin. Oncol.* 11 (1993) 1403–1417.

- [68] S. Giacchetti, G. Bjarnason, C. Garufi, D. Genet, S. Iacobelli, M. Tampellini, R. Smaaland, C. Focan, B. Coudert, Y. Humblet, J.L. Canon, A. Adenis, G. Lo Re, C. Carvalho, J. Schueller, N. Anciaux, M.A. Lentz, B. Baron, T. Gorlia, F. Lévi F, Phase III trial comparing 4-day chronomodulated therapy versus 2-day conventional delivery of fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin as first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group, *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 3562 – 3569.
- [69] S. Giacchetti, B. Perpoint, R. Zidani, N. Le Bail, R. Faggiuolo, C. Focan, P. Chollet, J.F. Llory, Y. Letourneau, B. Coudert, F. Bertheaut-Cvitkovic, D. Larregain-Fournier, A. Le Rol, S. Walter, R. Adam, J.L. Misset, F. Lévi, Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.* 18 (2000) 136–147.
- [70] T.J. Price, P.J. Ross, T. Hickish, D. Tait, A.R. Norman, H.E. Ford, G. Middleton, K. Sumpter, M. Hill, J. Oates, D. Cunningham, Phase III study of mitomycin-C with protracted venous infusion or circadian-timed infusion of 5-fluorouracil in advanced colorectal carcinoma, *Clin. Colorectal. Cancer.* 3(2004) 235–242.
- [71] I. Le Fur, A. Reinberg, S. Lopez, F. Morizot, M. Mechkouri, E. Tschachler, Analysis of circadian and ultradian rhythms of skin surface properties of face and forearm of healthy women, *J. Invest. Dermatol.* 117 (2001) 718-724.
- [72] G. Yosipovitch, L. Sackett-Lundeen, A. Goon, C. Yiong Huak, C. Leok Goh, E. Haus, Circadian and ultradian (12 h) variations of skin blood flow and barrier function in non-irritated and irritated skin-effect of topical corticosteroids, *J. Invest. Dermatol.* 122 (2004) 824-829.

- [73] G.A. Bjarnason, R.C. Jordan, P.A. Wood, Q. Li, D.W. Lincoln, R.B. Sothorn, W.J. Hrushesky, Y. Ben-David, Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases, *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 1793–1801.
- [74] S. Kawara, R. Mydlarski, A.J. Mamelak, I. Freed, B. Wang, H. Watanabe, G. Shivji, S. K. Tavadia, H. Suzuki, G. A. Bjarnason, R. C. Jordan, D. N. Sauder, Low-dose ultraviolet B rays alter the mRNA expression of the circadian clock genes in cultured human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 119 (2002) 1220–1223.
- [75] C. Sandu, M. Dumas, A. Malan, D. Sambakhe, C. Marteau, C. Nizard, S. Schnebert, E. Perrier, E. Challet, P. Pévet, M.P. Felder-Schmittbuhl, Human skin keratinocytes, melanocytes, and fibroblasts contain distinct circadian clock machineries, *Cell. Mol. Life. Sci.* 69 (2012) 3329-3339.
- [76] F. Spörl, K. Schellenberg, T. Blatt, H. Wenck, K.P. Wittern, A. Schrader, A. Kramer, A circadian clock in HaCaT keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 131 (2011) 338-348.
- [77] S.B. Zanello, D.M. Jackson, M.F. Holick, Expression of the circadian clock genes clock and period 1 in human skin, *J. Invest. Dermatol.* 115 (2000) 757–760.
- [78] M. Geyfman, B. Andersen, Clock genes, hair growth and aging, *Aging. (Albany NY)*. 2 (2010) 122-128.
- [79] K.K. Lin, V. Kumar, M. Geyfman, D. Chudova, A.T. Ihler, P. Smyth, R. Paus, J.S. Takahashi, B. Andersen, Circadian clock genes contribute to the regulation of hair follicle cycling, *PLoS. Genet.* 5 (2009) e1000573.
- [80] M. Tanioka, H. Yamada, M. Doi, H. Bando, Y. Yamaguchi, C. Nishigori, H. Okamura, Molecular clocks in mouse skin, *J. Invest. Dermatol.* 129 (2009) 1225-1231.
- [81] F. Spörl, S. Korge, K. Jürchott, M. Wunderskirchner, K. Schellenberg, S. Heins, A. Specht, C. Stoll, R. Klemz, B. Maier, H. Wenck, A. Schrader, D. Kunz, T. Blatt, A. Kramer,

Krüppel-like factor 9 is a circadian transcription factor in human epidermis that controls proliferation of keratinocytes., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109 (2012) 10903-10908.

[82] Y. Nakamura, D. Harama, N. Shimokawa, M. Hara, R. Suzuki, Y. Tahara, K. Ishimaru, R. Katoh, K. Okumura, H. Ogawa, S. Shibata, A. Nakao, The circadian clock gene *Period2* regulates a time of day-dependent variation in cutaneous anaphylactic reactions, *J. Allergy. Clin. Immunol.* 127 (2011) 1038–1045.

[83] E. Takita, S. Yokota, Y. Tahara, A. Hirao, N. Aoki, Y. Nakamura, A. Nakao, S. Shibata, Biological clock dysfunction exacerbates contact hypersensitivity in mice, *Br. J. Dermatol. Br J Dermatol.* 168 (2013) 39-46.

[84] R. Parisi, D.P. Symmons, C.E. Griffiths, D.M.J. Ashcroft, Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence, *J. Invest. Dermatol.* 133 (2013) 377-385.

[85] A. Hashiramoto, T. Yamane, K. Tsumiyama, K. Yoshida, K. Komai, H. Yamada, F. Yamazaki, M. Doi, H. Okamura, S. Shiozawa, Mammalian Clock Gene *Cryptochrome* Regulates Arthritis via Proinflammatory Cytokine $TNF-\{\alpha\}$, *J. Immunol.* 184 (2010) 1560–1565.

[86] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, E. Ward, Cancer statistics, 2010, *CA.-Cancer. J. Clin.* 60 (2010) 277–300.

[87] Nemzeti Rákregiszter, Magyarország 2010.

[88] S.Gaddameedhia, C.P. Selby, W.K. Kaufmann, R.C. Smarte, A. Sancar, Control of skin cancer by the circadian rhythm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108 (2011) 18790-18795.

[89] M. Akashi, H. Soma, T. Yamamoto, A. Tsugitomi, S. Yamashita, T. Yamamoto, E. Nishida, A. Yasuda, J.K. Liao, K. Node, Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107 (2010)15643–15648.

- [90] A. Slominski, D.J. Tobin, S. Shibahara, J. Wortsman, Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 1155-228.
- [91] B.B. Otálora, J.A. Madrid, N. Alvarez, V. Vicente, M.A. Rol, Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice, *Pineal. Res.* 44 (2008) 307-15.
- [92] R.S. Dronca, A.A. Leontovich, W.K. Nevala, S.N. Markovic, Personalized therapy for metastatic melanoma: could timing be everything? *Future. Oncol.* 8 (2012) 1401-1406.
- [93] S. Dimitrov, C. Benedict, D. Heutling, J. Westermann, J. Born, T. Lange, Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets, *Blood.* 113 (2009) 5134–5143.
- [94] A. Buja A, J.H.Lange, E. Perissinotto, G. Rausa, F. Grigoletto, C. Canova, G. Mastrangelo, Cancer incidence among male military and civil pilots and flight attendants: an analysis on published data, *Toxicol. Ind. Health.* 21 (2005) 273–282.
- [95] A. Buja, G. Mastrangelo, E. Perissinotto, F. Grigoletto, A.C.Frigo, G. Rausa, V. Marin, C. Canova, F. Dominici, Cancer incidence among female flight attendants: a meta-analysis of published data, *J. Womens. Health. (Larchmt).* 15 (2006) 98–105.
- [96] L.E. Pinkerton, M.A. Waters, M.J. Hein, Z. Zivkovich, M.K. Schubauer-Berigan, B. Grajewski, Cause-specific mortality among a cohort of U.S. flight attendants, *Am. J. Ind. Med.* 55 (2012) 25-36.
- [97] J. Schwartzbaum, A. Ahlbom, M. Feychting, Cohort study of cancer risk among male and female shift workers, *Scand. J. Work. Environ. Health.* 33 (2007) 336–343.
- [98] E.S. Schernhammer, P. Razavi, T.Y. Li, A.A. Qureshi, J. Han, Rotating night shifts and risk of skin cancer in the nurses' health study, *J. Natl. Cancer. Inst.* 103 (2011) 602–606.
- [99] M. Doi, J. Hiramata, P. Sassone-Corsi, Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase, *Cell.* 125 (2006) 497–508.

- [100] S. Sahar, P. Sassone-Corsi, Metabolism and cancer: the circadian clock connection, *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 886-896.
- [101] F.W. Turek, C. Joshi, A. Kohsaka, E. Lin, G. Ivanova, E. McDearmon, A. Laposky, S. Losee-Olson, A. Easton, D.R. Jensen, R.H. Eckel, J.S. Takahashi, J. Bass, Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice, *Science.* 308 (2005) 1043–1045.
- [102] Y. Nakahata, M. Kaluzova, B. Grimaldi, S. Sahar, J. Hirayama, D. Chen, L.P. Guarente, P. Sassone-Corsi, The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control, *Cell.* 134 (2008) 329–340.
- [103] B. Jung-Hynes, M. Nihal, W. Zhong, N. Ahmad, Role of sirtuin histone deacetylase SIRT1 in prostate cancer, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 3823–3832.
- [104] J.E. Kim, Z.K. Lou, J.J. Chen, Interactions between DBC1 and SIRT1 are deregulated in breast cancer cells, *Cell. Cycle.* 8 (2009) 3784–3785.
- [105] K. Nosho, K. Shima, N. Irahara, S. Kure, R. Firestein, Y. Baba, S. Toyoda, L. Chen, A. Hazra, E.L. Giovannucci, C.S. Fuchs, S. Ogino, SIRT1 histone deacetylase expression is associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer, *Mod. Pathol.* 22 (2009) 922–932.
- [106] B. Kovach, R. Langland, R. Schilling, H. Halait, S. Anderson, K. Bloom, D.U. Vallera, J. Rueschoff, H.J. Lawrence, The analytic performance of the cobasR 4800 BRAF V600 Mutation Test in the detection of V600E mutations in malignant melanoma: assay reproducibility and effects of melanin. *Melanoma Research.* 2011;21:e11.
- [107] J.B. de Kok, R.W. Roelofs, B.A. Giesendorf, J.L. Pennings, E.T. Waas, T. Feuth, D.W. Swinkels, P.N. Span, Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation.* 2005;85:154–9.

- [108] M. Soták, L. Polidarová, P. Ergang, A. Sumová, J. Pácha, An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors, *Int. J. Cancer*. 132(2013) 1032-1041.
- [109] A.B.Reddy, G.K. Wong, J. O'Neill, E.S. Maywood, M.H. Hastings, Circadian clocks: neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle, *Mutat. Res.* 574 (2005) 76-91.
- [110] S.G. Rhee, H.A. Woo, I.S. Kil, S.H. Bae, Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides, *Biol. Chem.* 287 (2012) 4403-4410.
- [111] S.G. Rhee, Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling, *Science*. 312 (2006) 1882-1883.
- [112] J.S. O'Neill, A.B. Reddy, Circadian clocks in human red blood cells, *Nature*. 469 (2011) 498-503.
- [113] R.S.Edgar, E.W. Green, Y. Zhao, G. van Ooijen, M. Olmedo, X. Qin, Y. Xu, M. Pan, U.K. Valekunja, K.A. Feeney, E.S. Maywood, M.H. Hastings, N.S. Baliga, M. Meroow, A.J. Millar, C.H. Johnson, C.P. Kyriacou, J.S. O'Neill, A.B. Reddy, Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms, *Nature*. 485 (2012) 459-464.

10. PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló folyóiratcikkek

(1) **Z. Lengyel**, C. Lovig, S. Kommedal, R. Keszthelyi, G. Szekeres, Z. Battyáni, V. Csernus, A.D. Nagy. Altered expression patterns of clock gene mRNAs and clock proteins in human skin tumors. *Tumour Biol.* 2013. (34) 811-819. doi:10.1007/s13277-012-0611-0

IF₍₂₀₁₁₎: 2,143

(2) **Z. Lengyel**, Z. Battyáni, G. Szekeres, V. Csernus, A.D. Nagy. Circadian clocks and tumor biology: what is to learn from human skin biopsies?

Gen Comp Endocr. 2013. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.03.033

IF₍₂₀₁₁₎: 3,267

Az értekezés témájához nem kötődő közlemények

(1) Kulisch Á., **Lengyel Zs.**, Battyáni Z., Szekeres Gy., Farkas B. Sejtproliferatio és apoptosis immunomorphologiai vizsgálata pigmentált tumoroknál. *Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle.* 2001. (77) 255-258.

(2) B. Csete, M. Moezzi, **Z. Lengyel**, B. Hodosi, E. Zombai, Z. Battyáni. Florid cutaneous papillomatosis leading to social exclusion. *Br. J. Dermatol.* 2005. (153) 667-669.

IF₍₂₀₀₅₎: 2,978

(3) Battyáni Z., **Lengyel Zs.**, Kutasi Zs., Zilahi L., Berki T. Autoimmunitás kialakulása alacsony dózisú interferon alphával kezelt melanoma malignumos betegeknél. *Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle.* 2010. (5) 135-138.

(4) Sebők B., Hortobágyi J., **Lengyel Zs.** Gyógyvizek antipsoriaticus hatásának vizsgálata. *Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle.* 2010. (5) 149-151.

(5) Szász O., **Lengyel Zs.** Szalai G., Battyáni I., Hampel Gy., Battyáni Z. Komplex, mobil szűrés során szerzett tapasztalataink melanoma és non-melanoma bőrtumorok vonatkozásában Dél-Dunántúl Régióban. *IME Az egészségügyi vezetők szaklapja* 2010. (9) 42-44.

(6) Fekecs T., Kádár Zs., **Lengyel Zs.**, Battyáni Z., Kalmár-Nagy K., Szakály P., Wéber Gy., Horváth Ö.P., Ferencz A. Szervtranszplantációt követő bőrgyógyászati szűrővizsgálat jelentősége a non-melanoma bőrtumorok diagnosztikája és kezelése céljából. Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle. 2011. (1) 9-14.

(7) Csernus A.E., **Lengyel Zs.**, Ferencz J., Kálmán E. Battyáni Z. Melanoma malignum in vivo mélységi terjedésének meghatározása nagyfelbontású ultrahanggal (18-, 22 Mhz). Bőrgyógyászati és Venerológiai szemle. 2012. (1) 11-18.

(8) Battyáni Z., Kádár Zs., **Lengyel Zs.**: Metasztatikus melanoma ipilimumab (Yervoy) kezelése egy eset kapcsán. Onkológia. 2012.(2) 97-99.

Idézhető kongresszusi összefoglalók

(1) Zs. **Lengyel**, Z. Battányi, Gy. Szekeres, B. Farkas. Immunmorphological assessment of cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2003. (1) (Suppl1) p. S16.

(2) **Zs. Lengyel**, Zs. Kutasi, Z. Battányi Zita. Correlation Between DSDP (Digital Standardised Dermatological Point Value) Score and Histopathological Diagnosis of Melanocytic Lesions. Dermatology. 2006. (212) p. 309. **IF₍₂₀₀₆₎: 1,854**

(3) Zs. **Lengyel**, B. Kajtár, Á. Nagy, Z. Battányi. A case of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. Mel. Research. 2011. (21) e45-e46. **IF₍₂₀₁₁₎: 2,19**

Az értekezés alapját képező előadások, poszterek

(1) **Zs. Lengyel**, A. D. Nagy, V. Csernus, Z. Battyáni. Expression of the circadian clock gene clock in human melanoma skin biopsy (poster)

25th Conference of the European Comparative Endocrinologists, August 2010, Pécs.

(2) **Lengyel Zs.**, Nagy A.D., Csernus V., Battyáni Z. Cirkadián óragének: per1, per2, clock, és cry1 expressziója melanomában

Magyar Dermatológiai Társaság 84. Nagygyűlése, 2011. December, Budapest.

(3) **Lengyel Z**, Lovig C, Kommedal S, Keszthelyi R, Szekeres G, Battyáni Z, Csernus V, Nagy AD. Expression of per1, per2, clock and cry1 in human melanoma and naevus biopsies (poster)

Society for Research on Biological Rhythms, May 2012. Destin, Florida, USA.

(4) **Zs. Lengyel**, S. Kommedal, V. Csernus, Z. Battyáni, A. D. Nagy. Altered expression patterns of clock gene mRNAs and clock proteins in human skin tumors

26th Conference of the European Comparative Endocrinologists, August 2012. Zürich, Svájc.

Az értekezés témájához nem kötődő előadások, poszterek

(1) **Zs. Lengyel**, Z. Battyáni, Gy. Szekeres, B. Farkas. Immunomorphological assessment of cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma

42. German National Congress of Dermatology, May 2003. Berlin.

(2) **Lengyel Zs**, Bakonyi J, Farkas B. Óriási spinocelluláris carcinoma sikeres kezelése matrónánál

Magyar Dermatológus Társaság Vándorgyűlése, 2003. Szeptember, Szeged

(3) **Lengyel Zs**, Bakonyi J, Farkas B. Fejtetőre lokalizált angiosarcoma kezelése

Magyar Dermatológiai Társaság 76. Nagygyűlése, 2003. December, Budapest.

(4) Farkas B, **Lengyel Zs**, Hodosi B. Melanoma malignum immunterápiája

Zala Megyei Kórház, Bőrgyógyászati osztály 2004. Április, Zalaegerszeg

(5) A. Blum, **Zs. Lengyel**. Diagnosis of pigmented skin lesions- from dermatoscopy to computer aided analyses

V. Congress of Hungarian-German Dermatological Society, August 2004. Pécs.

(6) **Lengyel Zs.**, Szepes É. Generalizált eruptív keratoacanthoma

Magyar Dermatológiai Társaság 77. Nagygyűlése, 2004. December, Budapest.

(7) Kádár Zs., **Lengyel Zs.**, Kenyeres M. Periosteumot infiltráló recidív basalioma műtéti megoldása

Magyar Dermatológiai Társaság 78. Nagygyűlése, 2005. December, Budapest.

(8) **Lengyel Zs.**, Battyáni Z., Szereday Z., Rostás T., Szepes É. Alsó végtagi metasztatikus melanoma malignum sikeres kezelése szelektív végtagperfúzióval (poszter)

Magyar Dermatológiai Társaság 78. Nagygyűlése, 2005. December, Budapest.

(9) **Lengyel Zs.**, Kutasi Zs., Battyáni Z. Correlation between DSDP (Digital Standardized dermatological Point Value) score and histopathological diagnosis of melanocytic lesions (poster)

First Congress of Dermoscopy, April 2006. Nápoly.

(10) Kádár Zs., **Lengyel Zs.**, Csernus E., Németh K., Schmidt E. *, Battyáni Z.

Melanoma malignum onkosebészeti ellátása klinikánkon 2000-2005 között

Magyar Sebész Társaság 58. Kongresszusa, 2006. Szeptember

(11) Kádár Zs., **Lengyel Zs.**, Battyáni Z., Tizedes Gy. Szövetexpanderrel előtágított latissimus dorsi myocutan lebennyel történő rekonstrukció nagy defektusoknál

Magyar Plasztikai, Helyreállító és Esztétikai Sebész Társaság XI. Kongresszusa, 2006. Október.

(12) **Lengyel Zs.**, Laczó A., Kovács T., Battyáni Z. Kaposi sarcoma regressziója vesetranszplantált betegnél sirolimus terápiára történt váltást követően

Magyar Dermatológiai Társaság 79. Nagygyűlése, 2006. December, Budapest.

(13) Németh K., **Lengyel Zs.**, Szepes É. Pityriasis rubra pilaris (poszter)

Magyar Dermatológiai Társaság 79. Nagygyűlése, 2006. December, Budapest.

- (14) B. Hodosi, E. Szepes, **Z. Lengyel**. Severe side effect of infliximab in a patient with therapy resistant psoriasis and psoriatic arthritis (poster)
2nd International Congress on Psoriasis, June 2007. Paris.
- (15) **Zs. Lengyel**, Zs. Kádár, Zs. Kutasi, E. Csernus, Z. Battyáni. Seven years of sentinel node biopsy for melanoma: a retrospective analyses of 287 patients
21st World Congress of Dermatology, September 2007. Buenos Aires.
- (16) Z. Battyáni, Zs. Kutasi, L. Zilahi, **Zs. Lengyel**, T. Berki. Thyroid dysfunction in interferon alpha treated melanoma patients (poster)
21st World Congress of Dermatology, September 2007. Buenos Aires.
- (17) Zs. Kutasi, F. Lakosi, J. Hadjiev, T. Kővári, **Zs. Lengyel**, Z. Battyáni. Penile metastases from carcinoma of the pharynx (poster)
21st World Congress of Dermatology, September 2007. Buenos Aires.
- (18) Sebők B., **Lengyel Zs.**, Hortobágyi J. A harkányi gyógyvíz antipsoriaticus hatásával kapcsolatos klinikai vizsgálatok
A Magyar Balneológiai Egyesület 2007 évi Nagygyűlése, 2007. November.
- (19) Kovács A., Szász O., **Lengyel Zs.**, Szepes É., Battyáni Z., Schneider I. Eosinophil cellulitis (Wells-syndroma)
Magyar Dermatológiai Társaság 80. Nagygyűlése, 2007. December, Budapest.
- (20) Battyáni Z., Kutasi Zs., **Lengyel Zs.** Pajzsmirigy funkciós eltérések interferon alfavával kezelt melanoma malignusos betegekben
Magyar Dermatológiai Társaság 80. Nagygyűlése, 2007. December, Budapest.
- (21) Hodosi B., **Lengyel Zs.**, Szepes É., Battyáni Z. Infliximab kezelés során észlelt mellékhatások
Magyar Dermatológiai Társaság 80. Nagygyűlése, 2007. December, Budapest.
- (22) **Lengyel Zs.** Anaphylaxia, Rovarcsípés, Urticaria

Továbbképző gyermek-, és házi orvosoknak, 2008. Január, Pécs

(23) Sebok B., **Lengyel Zs.**, Hortobágyi J. Antipsoriatic efficacy of the sulphuric medicinal water of Harkány (poster)

36th Congress of the International Society of Medical Hydrology and Climatology, June 2008. Porto.

(24) **Zs.Lengyel**, A. Laczó, T. Kovács, Z. Battyáni. Regression of Kaposi's sarcoma after conversion to sirolimus (poster)

International Conference of Adjuvant Therapy on Malignant Melanoma and European Association of Dermato-Oncology, June 2008. Marseille.

(25) Zs.Kádár, **Zs.Lengyel**, B.Csete, T.Fekecs, Z.Battyáni. Importance of sentinel lymphnode biopsy in patient with thin melanomas

7th World Congress on Melanoma and 5th Congress of the European Association of Dermato-Oncology (EADO), May 2009. Vienna.

(26) Szász O., **Lengyel Zs.**, Battyáni Z., Battyáni I. Komplex, mobil szűrés során szerzett tapasztalataink bőrtumorok és melanoma vonatkozásában

Magyar Dermatológiai Társaság 82. Nagygyűlése, 2009. December, Budapest.

(27) Zs. Kádár, G. Tizedes, **Z. Lengyel**, E. Kálmán, Z. Battyáni. A pre-expanded latissimus dorsi musculocutaneous flap reconstruction following the resection of a non-typical, localized, extensive spindle cell hemangioma (poster)

World Congress on Controversies in Plastic Surgery & Dermatology (CoPLASDy), November 2010. Barcelona.

(28) Csernus A. E., **Lengyel Zs.** Ferencz J. Battyáni I., Kálmán E., Battyáni Z. Melanoma malignum in vivo mélységi terjedésének meghatározása nagyfelbontású ultrahanggal (18, 22MHz)

Magyar Dermatológiai Társaság 83. Nagygyűlése 2010. December, Budapest.

(29) Horváth Zs., Kádár Zs., Kálmán E., Csere T., **Lengyel Zs.**, Moezzi M., Battyáni Z.

Melanoma malignum és carcinoma ductale infiltrans mammae együttes előfordulása

Magyar Dermatológiai Társaság 83. Nagygyűlése 2010. December, Budapest.

(30) **Lengyel Zs.**, Kádár Zs., Szász O., Kovács A., Kálmán E., Csikó B., Kassai G., Battyáni Z.

Calciophylaxis sikeres kezelése

PTE ÁOK Tanulságos esetek fóruma, 2011. Május, Pécs.

(31) **Zs. Lengyel**, B. Kajtár, Á. Nagy, Z. Battyáni. A case of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (poster)

7th European Congress of Dermato-Oncology, June 2011. Nantes, France.

(32) **Lengyel Zs.**, Kádár Zs., Szász O., Kovács A., Kálmán E., Csikó B., Kassai G., Battyáni

Z. Calciophylaxis sikeres kezelése

Magyar Dermatológiai Társaság 84. Nagygyűlése, 2011. December, Budapest.

(33) **Lengyel Zs.** A dermatoscopia alapjai

Bőrgyógyászat és határterületei-első multidiszciplináris kötelező szinten tartó továbbképző tanfolyam, 2012. Április, Pécs.

(34) **Lengyel Zs.** A biológiai onkológiai kezelések bőrgyógyászati vonatkozása

Bőrgyógyászat és határterületei-első multidiszciplináris kötelező szinten tartó továbbképző tanfolyam, 2012. Április, Pécs.

(35) **Lengyel Zs.** Magas dózissal szerzett tapasztalatok, mellékhatások kezelési lehetőségei

Melanoma Ponszerző Továbbképző Fórum, 2012. Április, Velence.

(36) S. Kommedal, **Zs. Lengyel**, A. Matkovits, V. Csernus, A.D. Nagy. The embryonic pineal gland of the chicken as a model for experimental jet lag

26th Conference of the European Comparative Endocrinologists, August 2012. Zürich, Svájc.

(37) **Lengyel Zs.** Adjuváns terápia melanoma malignumban

Melanoma Akadémia, 2012. November, Pécs.

(38) **Lengyel Zs.** Anyajegyek, anyajegyszűrés jelentősége gyermekkorban

Tavaszi gyermekgyógyász továbbképzés I. 2013. Február, Szekszárd.

11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Battyáni Zita tanárnőnek és Dr. Csernus Valér Professor Úrnak, akik munkám során mindvégig maximális támogatást nyújtottak mind a kísérletes munkámban, mind a tudományos és klinikai életre való nevelésben.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Nagy Andrásnak, aki tudományos munkám elindításában és kivitelezésében segítségemre volt. Tanácsaival, optimizmusával kitartásra ösztökélt. Megtanította, hogy „mindig lehet jobban csinálni, fejlődni”.

Köszönöm Dr. Szekeres Györgynek és munkatársainak az immunhisztokémiában nyújtott segítségért és Dr. Rékási Zoltánnak a PCR gép használatának lehetőségét.

Nagyon hálás vagyok a mintavétel szervezésében és kivitelezésében segítséget nyújtó asszisztensnőknek, laborosoknak, nővéreknek, műtősnőknek és orvostanhallgatóknak.

Köszönetet szeretnék mondani a vizsgálatban résztvevő betegeknek és pácienseknek.

Végül, de talán legfőképp hálásan köszönöm családomnak, hogy minden körülmény között lehetővé tette számomra a tudományos tevékenységet és az értekezés elkészítését. Köszönöm férjemnek a türelmét, szakmai segítségét, szüleimnek az életem során nyújtott állandó önzetlen segítségét, testvéremnek a szerkesztési feladatokat és nagymamámnak a sok-sok gyermekfelügyeleti segítséget és mindenki biztatását.