

BEVEZETÉS

A peroxisoma proliferator aktivált receptor (PPAR) a steroid magreceptor-család tagja. A magreceptorok ligand által aktivált transzkripciós faktorok, a sejt és a szervezet alapműködéseit génszinten szabályozzák. A ligandok hormonhatású anyagok, melyek közvetlenül befolyásolhatják a sejtproliferációt, a differenciációt és a sejthalál szempontjából kulcsfontosságú gének kifejeződését. Az egész szervezet szintjén szabályozzák az egyedfejlődést, valamint az anyagcsere-folyamatok homeosztázisát. Jelentőségük, hogy a környezeti hatások rajtuk keresztül közvetlenül szabályozzák a DNS-ben hordozott genetikai információk átírását.

A daganatok kialakulása során és proliferatív, gyulladásos betegségben a proliferáció, differenciáció és apoptózis kisiklása észlelhető. Ezért felismerése után több kutatócsoport nagy reményeket fűzött a magreceptor családnak a bőrben betöltött funkciójához. Mi is ezért választottuk tanulmányozásunk célpontjául a pályázat beadásakor a bőrgyógyászatban még kevésbé ismert peroxisoma proliferator aktivált receptort. Eredetileg az *in vitro* alap kutatások mellett távlatilag két gyakori bőrgyógyászati kórkepcsoportban, a nonmelanoma bőrdaganatokban (nonmelanoma skin cancer, NMSC) és a psoriasisban kívántunk a PPAR patomechanizmusban betöltött szerepéről adatokat nyerni.

A saját és mások vizsgálati eredményei, valamint kutatási lehetőségeink miatt a projekt időtartama alatt a NMSC vizsgálatokat a PPAR-ok keratinocita tenyészetben UVB hatásokra adott válaszaiban tanulmányoztuk. Az eredeti alapkérdéstől (PPAR-oknak milyen regulációs szerepe van a photocarcinogenesisben, a psoriasis patomechanizmusában, valamint egyes ligandok preventív, vagy terápiás hatásúak-e ezekben a dermatológiai betegségekben?) részben eltértünk, azaz nem teljesen bontottuk ki az eredetileg központi témának tekintett sejtciklus és a repair mechanizmusok tanulmányozását, ehelyett érdeklődésünk a PPAR lehetséges szerepének tanulmányozása irányába terelődött, egy másik igen gyakori kórkép, az acne patomechanizmusában.

Egy magreceptor család, a PPAR szerepének vizsgálata során a biológiai folyamatok különböző szintjei térképeződnek fel. *In situ* jelenléte, mennyiségi meghatározása (Western blot) mellett nagyon hasznos a transzkripció végtermékének, az mRNS expresszió mértékének és mennyiségének a meghatározása. A microarray technológia, a cDNS chip lehetőséget teremt a teljes genom expresszivitásának tanulmányozására egy-egy adott időben. Az mRNS-re vonatkozó pontos mennyiségi adatok pedig a valós idejű kvantitatív reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció (qRT-PCR) elvégzése után nyerhetők gyorsan. Így ez az egyik leggyakrabban használt módszer különböző biológiai rendszerekben az mRNS szintű gén-expresszió vizsgálatára. Ezért válthatta fel ez az érzékeny, gyors módszer az mRNS-ek mennyiségi meghatározására az évekig aranystandardként használt Northern-blot technikát. A vizsgálataink során ez volt a leggyakrabban használt módszer. Kezdetben fel kellett figyelniünk arra a problémára, hogy a kísérletben egy mRNS abszolút szintje önmagában nem tükrözi pontosan a génexpresszió mértékét. A minta mennyisége, sejtszáma, az RNS minősége és mennyisége, a reverz transzkriptáz reakció hatékonysága mind befolyásolja az RNS-ek abszolút mennyiségét. Viszonyítási alap, normalizálás szükséges a qRT-PCR reakció során kapott adatok interpretálásához. Ilyen normalizálási lehetőség például a minta sejtszáma, DNS vagy totál RNS mennyisége, valamint referencia gének alkalmazása. Kezdetben a vizsgálatokhoz legtöbb esetben ismert, stabilan expresszálódó, úgynevezett house-keeping (háztartási) gént tapasztalati úton választottak ki. Mára már nyilvánvalóvá vált,

hogy ezek expressziója is változhat bizonyos körülmények (proliferáció, differenciáció, apoptózis, külső farmakológiai, fizikai hatások) között.

A keratinocyták fő funkciója a szervezet védelmére létrehozott szaruréteg kialakítása, mely a differenciálódásuk következménye. A bazális rétegben proliferáló hámsejtek terminális differenciációja során számos gén expresszivitása megváltozik. Új differenciációs gének ismerete új terápiás lehetőséget rejt magában. A sejtproliferációt, differenciációt a környezeti hatások, ultraibolya sugárzás (UV) befolyásolja, ami génexpressziós változásokat is eredményez. A sejtciklus változások nyomán követhetőek áramlási citometriával, de egy adott noxa után bekövetkező sejtciklusbeli eltérések elutriálással szétválasztható sejtfrakciókon is tanulmányozhatók.

A stratum corneum kialakításában a keratinocyták lipid homeosztázisának is jelentős szerepe van, az UV besugárzás után a barrier funkciók változnak. A bőrben lévő másik fő lipidforrás a faggyúmirigyek által termelt faggyú, mely a mirigysejtek elhalásának terméke, a stratum corneumhoz hasonlóan. Számos kutatás kimutatta, hogy a PPAR γ magreceptor molekulának kulcsszerepe van a sebocyták és a faggyúmirigyek működésében, azonban az, hogy a PPAR γ -nak mi ez a szerepe, még nem világos, mivel a kutatások eredményei ellentmondásosak. Kevés az ismeret arról, hogy a PPAR γ heterodimer partnerével, a retinoid receptor X-szel (RXR) együttműködve mely transzkripciós folyamatokat irányítja.

AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK:

UV sugárforrás:

TL01 és TL12 (Philips) UVB-fényforrások

Multitester (Saalman)

Minimális eritéma dózis (MED) meghatározása in vivo vizsgálatokhoz

Humán szövetminták:

DEOEC Bőrklínikán kezelt betegek előzetes tájékoztatás és írásos beleegyezése után. Terápiás célú tumoreltávolítások szövettani feldolgozásra nem kerülő széli része. Keratotomiás biopszia. Circumscisióból származó fitymabőr.

Sejtenyésztés:

HaCaT spontán immortalizált keratinocytá,

Normál humán keratinocytá (NHEK), differenciáció-indukció konfluenciáig történő tenyésztéssel, illetve a médium kalcium koncentrációjának emelésével (1,2 mM) valósult meg.

SZ95 sebocytá sejtvonal egészséges humán arcból szeparált sebocyták Symian vírus-40 transzformációjával létrehozott immortalizált sejtvonal

Hisztopatológia, immunhisztokémia – Immunperoxidáz módszer

Hematoxilin-eosin festés után a hám szerkezetét, a gyulladást infiltrátumot vizsgáltuk.

Avidin-biotin-peroxidáz módszer Vectastain ABC kit (Vector Labs.) vagy DAKO LSAB kittel: A primer antitesteket 4C⁰-on egy éjszakán át inkubáltuk. A reakciót diaminobenzén tetrahidroklorid, (DAB) vagy aminoetilcarbazon (AEC) szubsztrát használatával tettük láthatóvá, majd hematoxilin háttérfestést alkalmaztunk. A PPAR esetén catalisált signal amplifikációs rendszert (CSAII) használtunk. Antitestek: PPAR isoformák elleni antitestek, RXR

Laser capture mikrodisszekció

Speciálisan kezelt és beágyazott hisztopatológiai blokkból készült metszetből mikroszkóp alatt laser nyalábbal a keresett strukturát (faggyúmirigy) kivágva, Eppendorf csőben felfogtuk, majd RNS-t szeparáltunk belőle.

Comet assay (single cell gél electrophoresis)

Az eukarióta sejtek szuszpenzióját tárgylemezen agaróz gélbe ágyasztuk. A sejtek citoplazmáját és a DNS-hez kötődő fehérjéket lizáló pufferben távolítottuk el, majd alkalikus közegben

elektroforetizáltuk. DNS-hez kötődő fluoreszcens festékekkel jelezve fluoreszcens mikroszkóp alatt a sejtmagok üstökösre emlékeztető képet mutattak. A fejrészhez kapcsolódó farok hossza és intenzitása a sejtekben bekövetkezett DNS-károsodás mértékét jelzi. Vizuálisan, vagy komputer image analízis (Kinetics 5.0) segítségével értékeltük.

Életképességi vizsgálatok:

Tripán kék exclusiós festés.

MTT teszt. A sárga formazánsót az élő sejtek mitokondriuma kék formazánná alakítja. A színeltérés fotométerrel meghatározható. Az átalakítás mértéke arányos az élő sejtek számával.

Differenciációs markerek

Keratinocyta ismert differenciálódási gének (keratinocita transzglutamináz (KTG), involucrin, SCALP) mRNS vagy protein expressziójának vizsgálata

SZ95 immortalizált humán sebocita sejtvonalon határoztuk meg. Oil-Red-O festéssel, illetve fluorimetriás módszerrel kvantitatív lipidanalízist végeztünk

Sejtciklus-analízis

A sejtciklus különböző fázisában lévő sejtek DNS tartalma eltér. Áramlási citométerrel vizsgálható.

Elutriálás:

A sejtek nagyságuk és DNS tartalmuk alapján az ellenáramlásos centrifugálással több szinkron frakcióra választhatók.

RNS extrakció Trizol vagy RNAesy módszerrel, a minőségi analízis Agilent 2100 bioanalizátorral történt.

Valós idejű kvantitatív RT-PCR

A Taqman próba segítségével végzett valós idejű reverz transcriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR) lehetővé teszi az RNS minták kvantitatív meghatározását (Applied Biosystem).

Protein extrakció

Microarray

3 humán minta RNS-ének összegyűjtése után Affymetrix HGU133 plus 2.0 GeneChips-en történt a NHEK konfluencia indukált differenciáció 0., 1., 4. napján.

Statisztikai analízis

Az adatokat PC felhasználásával, Excel táblázat kezelő programban rögzítettük és dolgoztuk föl. További statisztikai elemzést Statistika for Windows szoftver segítségével végeztünk. A comet assay computer image analízise a Komet 5.0 (Kinetics) szoftver segítségével történt, az adatokat a fentiekben leírt módon tároltuk és dolgoztuk fel Man Witney U tesztet alkalmazva. A valós idejű kvantitatív RT-PCR adatok analízise az SDS 2.2. szoftverrel történt, majd Excel programban végeztük a normalizálást. A génexpressziók stabilitásának vizsgálatához a Normfinder algoritmust és GeNorm szoftvert használtuk.

A microarray adatok analízise a szabad hozzáférésű Cytoscape 2.5 és Bingo 2.0 történt. A korábban keratinocita differenciáció során nem azonosított gének keresése az adatok alapján a nagy eltéréseket mutató gének PUBMED adatbázisban történő egyenkénti alapos áttekintésével történt. A mikroarray adatait összehasonlítottuk psoriasis (GDS2518) Gene Expression Omnibus (GEO) expressziós adataival. Ennek kapcsán az internetes adatok statisztikai újra analízise is megtörtént.

EREDMÉNYEK:

1. A teljes genom szintű változások keratinocita differenciáció során

A keratinocita (KC) differenciáció génexpressziós vizsgálata néhány differenciációs marker felhasználásával alaposan tanulmányozott, azonban teljes körű genomot érintő vizsgálat alig található az irodalomban. A normálisan végbemenő differenciáció a

keratinocyták lehámlását eredményezi. Daganatok képződése során a differenciáció folyamata módosul, károsodott.

Konfluencia indukált differenciáció után teljes genomiális változások kerültek rögzítésre microarray technika segítségével. A bőrgyógyászati szempontból potenciális új kandidátus géneket valós idejű RT-PCR és immunhisztokémia segítségével validáltuk. 932 gén expressziója volt 2,5-ször nagyobb és 629 gén expressziója volt alacsonyabb a kontrollhoz képest konfluencia indukált keratinocyta differenciáció során.

A komplett humán genomból 37 gén több mint 20-szorosára felregulálódott, 21 gén pedig 8-szor kisebb mértékben expresszáldott a konfluencia indukált KC differenciáció során. Az ismert differenciáció indukált gének megtalálhatóak voltak a felregulált gének között, igazolva ezzel a modell használhatóságát. Az adatok a szabadon hozzáférhető psoriasis expressziós adatokkal összehasonlítva megerősítik a kiválasztott géncsoportok validitását.

Kalcium indukáltan differenciálódó NHEK kultúrából izolált mRNS valósidejű RT-PCR-rel történt vizsgálatában tovább validáltuk a kiválasztott új, eddig nem közölt, de az irodalom áttekintése alapján potenciálisan a differenciációban jelentős 12 (SPINK7, SPINK6, RNF39, PKP3, HMOX1, ICEBERG, FOXQ1, GLRX, ELMOD, FAM43A, PLA2G4B, TAOK1), valamint 3 ismert (PI3, TGM1, DMKN) gént. Mind a 3 ismert gén a kalcium indukált differenciációban is jelentősen upregulálódott, a 12 potenciálisan differenciációval összefüggő génből 8 hasonlóan viselkedett.

Az upregulálódó gének közül négy gén protein termékének expresszióját a normál humán epidermiszben biopsziás minta felhasználásával, immunperoxidáz módszerrel tanulmányoztuk: A hemoxigenáz 1 (HMOX1) a várakozással ellentétben nemcsak a differenciálódott külső rétegben, hanem az egész hámban festődést mutatott. A glutaredoxin (GLRX) a külső rétegekben és néhány izolált KC-ben volt kimutatható az alsó rétegekben. A forkhead box Q1 (FOXQ1) diffúz, de a differenciálódással erősödő mintázatot mutatott. A plakophilin-3 (PKP3) a várakozással ellentétben a bazális rétegre lokalizálódott.

Kevés KC differenciációval leregulált gén validált, ezek közül a fibroblast growth factor receptor 2 és az epidermal growth factor receptor a mi vizsgálatainkban is a negatívan befolyásolt gének között volt. A felregulálódó gének közül vizsgált 12-ből 8 hasonlóan viselkedett a Ca^{2+} indukált differenciáció során is mutatva a két modell közötti hasonlóságot, de ki is emelve a modellek közötti különbséget. A PPAR delta mind a két rendszerben felregulálódott, míg a PPAR alfa a konfluencia indukció során negatívan szabályozódott.

A dermálisan jelenlévő HOX1 antioxidáns kapacitása UV besugárzással kapcsolatban szélesebb körben tanulmányozott. Epidermális differenciáció dependens expressziójáról eddig még nem történt közlés. A biliverdin reduktáz ellentétes irányú változása felveti, hogy a biliverdin magasabb koncentrációja az epidermis külső rétegében UV protektív hatással függhet össze.

További vizsgálatainkból kiemelhető még az interleukin szignalizációban résztvevő elemek markáns expresszióváltozása: az IL-1F7, az IL-18 inhibitora 76.1-szeresen upregulálódott, az IL-1F5, a feltételezetten IL-1Rrp2 antagonistája 10-szeresen, hasonlóan az IL-1F10-hez, ami a szolubilis IL-1RI és IL-1RII-höz kötődik, ami decoy receptor. Mind az IL-1alpha, mind az IL-1beta jelentősen felszabályozott (26.91x) a NHEK differenciáció során, akár csak a jól ismert IL1Ra (3-fold) és az inhibitor IL-1RI. Az IL-1 proinflammatorikus citokin szerepe ismert volt a KC differenciáció szabályozásában. Vizsgálatunkkal több IL-1 receptor antagonistája jelentős upregulációját észleltük és ezzel még inkább alátámasztottuk a citokin szignalizáció szerepét a hám differenciáció során. Ez továbbá a hám struktúrájának és az immunrendszer direkt kapcsolatának is a jele. Az epidermalis differenciációzavarnak - excessiv IL-1 szignalizációt elindítva - patogenetikai szerepe lehet gyulladásos és hyperproliferatív bőrbetegségeken. (Az eredményeket publikációra benyújtottuk.)

2. Optimális normalizáló gén meghatározása UVB besugárzás után keratinocytá (KC) sejt kultúrában

A PPAR-ok mRNS és protein szintű változásait kívántuk meghatározni KC-ban. A KC sejt kultúrákban (HaCaT és NHEK) a PPAR mRNS-ek valós idejű kvantitatív RT-PCR mérése során szembe találtuk magunkat azzal, hogy nem volt az irodalomban kellő megbízható adat arra vonatkozóan, hogy mi az optimális normalizáló gén ebben a kísérleti rendszerben. Ezért először szeretnénk volna meghatározni az optimális normalizáló gént/géneket.

Olyan UVB dózist választottunk, amely során a KC-k jelentős része életképes marad, de az UVB DNS károsító hatása érvényesül. Az életképességet tripán kék exclusió segítségével, valamint MTT teszttel határoztuk meg. Az UVB DNS károsodást előidéző hatását alkalikus comet assay-val bizonyítottuk. Kezdetben HaCaT KC tenyészetben, majd később NHEK-n is elvégeztük a meghatározásokat. Ezt követően valós idejű RT-PCR-t végeztünk 10, az irodalomból jól ismert housekeeping génnel.

Szimbólum	A gén neve
18S	18 S riboszómális RNS
ACTB	béta actin
B2M	béta-2-mikroglobulin
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
GUSB	β-glukuronidáz
HPRT1	hipoxantin foszforibozil transzferáz 1
PGK 1	foszfo-glicerát kináz 1
PPIA/ Cyclo	peptidilprolil izomeráz/ ciklofilin A
RPLP0/ 36B4	acid riboszómális foszfo-protein P0
SDHA	sukcinát dehidrogenáz komplex A

A gének stabilitását az interneten ingyenesen hozzáférhető, a gének stabilitását vizsgáló két szoftver segítségével értékeltük. A két programban található elhanyagolható eltérések ellenére a legstabilabb génnek a szukcinát dehidrogenáz komplex A alcsoport (SDHA) mRNS-e bizonyult. A kvantitatív RT-PCR értékelése még megbízhatóbb, ha két stabil gén mértani átlagát közösen vesszük alapul a számításokban. A vizsgálataink során a SDHA és a foszfo-glicerát kináz 1 (PGK1) együttes alkalmazása adta a legstabilabb kombinációt. UV hatására a NHEK-ben a tumornekrózis faktor alfa (necrosis factor alpha (TNFα)) és a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor (VEGF)) génexpressziója változik. Ezen gének expressziójának a fent említett housekeeping génekre való normalizálásán keresztül mutattuk be az optimális normalizáló gén meghatározásának jelentőségét. *(Vizsgálati részeredményeinket előadásban és poszterben, majd az egész kísérletsorozatot és értékelést egy publikációban foglaltuk össze.)*

3. Magreceptorok mRNS expressziója keratinocytá (KC) sejt kultúrában

Ezt követően tenyésztett KC-kban magreceptorok expresszióját határoztuk meg a proliferatív és a különböző differenciáltságú tenyészetekben, valamint UVB besugárzás alatt is, emellett áramlási citometriával kívántuk követni a sejt ciklusbeli és apoptotikus változásokat. Az annexin V assay beállításánál nehézségeink adódtak, viszont az időközben nyílt új kollaborációs lehetőségünk révén egy újabb módszer beállítása indult el, mely a kromatinszerkezet vizsgálatára alkalmas. HaCaT sejtekből elutriálás segítségével válogattuk frakciókra az UV-vel besugárzott sejteket. Ebből a vizsgálatból megbízhatóan értékelt eredményünk még nincs, de a munkacsoport másik pályázatából, illetve későbbi pályázatokból fogjuk finanszírozni a további kísérleteket.

Az UVB dózisok optimalizálásának megállapításához comet assay-t alkalmaztunk. Ezzel vizsgáltuk az UVB léziók meglétét, tehát az UV hatás érvényesülését, valamint kijavítódásának időbeni lefolyását, a repair működését. Az alkalmazott, jelentős sejtelhalást (apoptosist) nem okozó 20-40 mJ/cm² UVB besugárzás hatására a PPAR mRNS szintek csökkentek. A PPARalfa, béta és gamma mRNS alacsony szinten, de expresszáldott HaCaT- és NHEK-ban. Kalcium indukálta differenciáció során a RARbeta, RARgamma, RXRalfa, RXRbéta mRNS kis, a PPARdelta nagyobb emelkedését találtuk, UVB besugárzás után szintjük csökkent. Agonista ligandokkal kezelve NHEK-ban a célgének expressziója alapján a PPARgamma inaktívnak bizonyult, míg az alfa kissé, a béta jelentősebben aktívnak. A ligandok hatása UV besugárzás után kevésbé érvényesült. Meghatároztuk továbbá különböző magreceptor-ligand előkezelések hatását a GADD45, az ABCG1, ADRP, CPT, PPAR target gének mRNS expressziójára. *(Ezekről az eredményekről előadások és poszterek formájában számoltunk be.)*

4. A keratinocyták (KC) lipid anyagcseréjében fontos ATP binding cassette transporter (ABC –transzporter) molekula-család expressziós változása UVB besugárzás után

Az ABC transzporterek a lipidmetabolizmusban, transzportban betöltött szerepét az utóbbi évtizedekben ismerték fel. Továbbá a KC-k metabolikus folyamataiban is felszínre került a szerepük. Az UV nemcsak a KC differenciációt, hanem a barrier funkciót is érinti. Meghatároztuk NHEK-on az ABC transzporterek mRNS expressziós változásait magas kalcium koncentráció mellett differenciálódó KC-ban valós idejű RT-PCR segítségével. Megállapítottuk, hogy a PPARgamma szabályozás alatt álló koleszterin transzporter ABCA1 és ABCG1, valamint a KC differenciáció-zavarral is jellemezhető lamelláris ichthyosissal összefüggő ceramid transzporter ABCA12 gének mRNS-expressziója a sejtek differenciálódásával fokozódott. A molekulacsalád ABCA1, ABCA12, ABCG1, ABCC1 tagjainak mRNS szintje 40 mJ/cm² UVB besugárzás hatására csökkent, míg az ABCF2 hosszabb splice variánsának mRNS expressziója növekedett. Későbbiekben más pályázatból finanszírozva tovább vizsgáltuk a témát, mert az ABC transzporterek szerepének meghatározása a hámban segít megérteni a differenciáció és az UV hatások mechanizmusait. *(Ezeket a bevezető kísérleti eredményeket poszter formájában mutattuk be.)*

5. A PPARgamma molekula expressziója és funkcionális hatása eltérő különböző eredetű faggyúmirigyekben

A lipidekben gazdag faggyúmirigyekben a lipid aktivált magreceptor, a PPARgamma tanulmányozását kezdtük el. Először bőrbetegekből származó szövetminták formalinnal fixált, paraffinba ágyazott metszeteiből immunhisztokémiai módszerrel mutattuk ki a PPARgamma-t. Friss fagyasztott bőrbioptiás mintákból lézer mikrodisszekcióval nyert faggyúmirigy izolátumból RNS-t szeparáltunk, amiből valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) módszerrel mRNS expressziós vizsgálatokat végeztünk. Kromatin immunprecipitációs módszer segítségével kerestük meg a különböző célgének promoter szakaszain található hisztonfehérjék szerkezetében létrejött módosításokat, melyek megmagyarázhatják a két modellrendszer génextpressziós mintázatának különbségét. A molekula funkcióját SZ95 immortalizált humán sebocytá sejtvonalon vizsgáltuk. Oil Red O festéssel, illetve fluorimetriás módszerrel kvantitatív lipidmegtározások is történtek.

A PPAR gamma és heterodimer partnerének expressziós mintázatát, valamint a target géneket normál és patológiás humán faggyúmirigyben és SZ95 faggyúmirigy sejtvonalon vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a PPAR γ protein jelen van normál és hiperpláziás faggyúmirigy

sejtmagokban, valamint immortalizált SZ95 sejtvonalban, ami mások korábbi eredményeit támasztotta alá. Hiperpláziás faggyúmirigyben magas szinten volt jelen a PPARgamma. Meglepő módon a faggyúmirigy carcinoma denz nucleusokkal és világos citoplazmával jellemezhető tumorsejtjei alig mutattak PPARgamma expressziót. A receptor csak a jól differenciált sejtekben volt detektálható, bár ugyanabban a biopsziás mintában lévő normál faggyúmirigy erős nukleáris pozitivitást mutatott. Ez arra utal, hogy a PPARgamma eltérően expresszálódik különböző patológiás folyamatokban és a protein kifejeződése korrelál a sebocyták differenciációjával.

A PPARgamma heterodimer partnere, a RXRalfa protein egyformán erősen volt kimutatható monoklonális antitesttel, immunhisztokémiai módszerrel, a normál és patológiás faggyúmirigy sejtmagokban. A faggyúmirigy carcinoma heterogén festődést mutatott. Az epidermalis sejtek és az egészséges sebocyták ugyanakkor erős nukleáris pozitivitással festődtek RXRalfa-val. Patológiás sebocytákban tehát kissé alterált az RXRalfa fehérje megjelenése.

Vizsgálataink szerint mRNS szinten a PPAR-ok közül a PPARgamma volt a domináns, az alfa és delta szintek alacsonyabbak voltak. Fokozott konfluencia mellett, ami fokozott differenciációt jelez, a PPAR gamma szint csökkent, míg az alfa és delta szint nőtt. Az RXR-ok közül az alfa volt a domináns szubtypus.

Receptor agonistával, illetve antagonistával megpróbáltuk befolyásolni a célgén expresszióját és megfigyeltük az SZ95 sejtekben végbemenő anyagcsereváltozásokat. Sikeresen meghatároztunk az SZ95 sejtekben és a mikrodisszekált szövetmintákban a PPARgamma molekula által regulált, lipidmetabolizmusban szerepet játszó célgén (PGAR, ADRP, FABP4) expressziós mintázatát. Kimutattuk, hogy a két modellrendszerben a PGAR és ADRP célgén expresszálódnak, de az FABP4 csak a mikrodisszekált modellen volt kimutatható. Vizsgálataink szerint ezt a különbséget az FABP4 gén promoter szakaszához kötődő hiszton molekulákban mutatkozó különbségek okozzák. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a génexpressziós, illetve az eltérő hisztonmodifikációs mintázat állhat a modellek különbözőségének hátterében.

Az eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy a PPARgammának valószínűleg fontos szerepe van a sebocyta biológiájában in vivo és in vitro. A humán sebocyta sejtvonal SZ95-ben csak meghatározott target gének aktiválhatók PPAR ligandokkal, eltérően az in vivo körülményekhez képest. Ez arra figyelmeztet, hogy az in vitro sejtvonalban végzett vizsgálatokból levont következtéseket óvatosan lehet az in vivo körülményekre extrapolálni. *(A munka publikációra benyújtás előtt áll.)*

Feltételeztük, hogy a súlyos acnés tünetek hátterében esetleg a PPARgamma gén polimorfizmusa is állhat. Előkísérleteinkben 17 súlyos acnés betegen a PPARgamma gén exonjainak DNS bázissorrendjét szekvenálással határoztuk meg, de polimorfizmust nem találtunk. Tovább gyűjtöttünk ugyan mintát, de nagyobb betegszámra nem terjesztettük ki a vizsgálatokat.

6. Nod-like fehérjék kifejeződnek humán keratinocytákban (KC).

Az innate immunitás újabban felismert, az inflammosoma részét képező Nod-like fehérjét (CATERPILLER) mRNS szinten először HaCaT, majd NHEK sejteken mutattuk ki. Igazoltuk, hogy a Nalp1, Nalp2, Nalp3, caspase-1, ASC konstitutívan kifejeződik logaritmikusan proliferáló KC-kban. A differenciált és konfluált KC-kban az MHCII felszíni expresszió nem nőtt, annak ellenére, hogy MHCII transzaktivátor (CIITA) mRNS szintje emelkedett a IV típus promoter-aktivitás következtében, IFN gamma jelenléte nélkül is. Későbbiekben az UV hatását vizsgáltuk ezekre a molekulákra, de a további kísérleteket már más pályázatból finanszíroztuk. *(Az eredmények közlés előtt állnak.)*

AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA:

1. Normál humán keratinocita (NHEK) in vitro tenyészetének alacsony dózisú UVB besugárzása után valós idejű kvantitatív RT-PCR során az optimális normalizáló gének a szukcinát dehidrogenáz komplex A alegysége és a foszfoglicerát kináz-1.
2. A PPARalfa, béta és gamma mRNS alacsony szinten, de expresszálódik HaCaT és NHEK-ban. Kalcium indukálta differenciáció során a RARbeta, RARgamma, RXRalfa, RXRbéta mRNS kis, a PPARdelta nagyobb emelkedését találtuk, UVB besugárzás után szintjük csökkent. Agonista ligandokkal kezelve NHEK-ban a célgének expressziója alapján a PPARgamma inaktív, míg az alfa kissé, a béta jelentősebben aktívnek bizonyult. A ligandok hatása UV besugárzás után kevésbé érvényesült.
3. A NHEK lipid anyagcseréjében fontos ATP binding cassette transporter molekulacsalád néhány tagjának (ABCA1, A12, G1, C1) mRNS szintje UVB besugárzás hatására csökkent, míg az ABCF2 hosszabb splice variánsának mRNS szintje növekedett.
4. PPARgamma és RXRalfa expresszálódik normál és hiperpláziás faggyúmirigyben in vivo és SZ95 sebocita sejtvonalban in vitro, de alig kimutatható a sebaceus carcinomában. A PPARgamma mRNS, valamint target génjei (ADRP és PGAR) mindkét modellben expresszálódnak, de a FABP4/aP2 in situ csak a faggyúmirigyekből mutatható ki. PPARgamma antagonisták csökkentették SZ95 sejtekben az arachidonsavval indukált lipid akkumulációt. 17 súlyos acnés betegen a PPARgamma gén DNS bázisszekvenciájában polimorfizmust nem találtunk.
5. A CATERPILLER fehérjecsalád számos tagja mRNS szinten expresszálódik tenyésztett keratinocytákban.

AZ EREDMÉNYEK FELHASZNÁLÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI:

Azzal, hogy rámutattunk az optimális normalizáló gének meghatározásának jelentőségére keratinocytákban UVB besugárzás után a valós idejű kvantitatív RT-PCR vizsgálatokban, a későbbi kísérletekben biztosítottuk az eredmények torzításának elkerülését. A teljes genom expressziós vizsgálatok keratinocita differenciáció során további in silico adatgyűjtésre és fontos metabolikus, szignalizációs útvonalak feltárására adnak lehetőséget. Az ABC transzporter, a Nod-like fehérjék, a PPAR-ok tanulmányozása hosszú távon olyan gyakori dermatológiai kórképek jobb megismeréséhez vezet, mint például az acné, daganatok, psoriasis. A patomechanizmus ismerete új preventív és terápiás lehetőségeket teremt.