

Kutatási projektünk során elsődleges célunk a pikkelysömör pathogenezisének vizsgálata volt sejt-és immunbiológiai, valamint genomikai, molekuláris biológiai módszerek segítségével. A hároméves projekt végrehajtása során az eredeti munkatervben leírtaknak megfelelően dolgoztunk, ezért a záró munkabeszámolót is a fenti bontásban készítettük el.

### Sejtbiológiai vizsgálatok pikkelysömörben

Sejtbiológiai kísérleteinkben kimutattuk, hogy a D2 és D3 ciklinek mRNS szintű kifejeződése szignifikánsan magasabb a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben az egészséges epidermiszhez viszonyítva, míg a D1 ciklin mRNS szintű kifejeződésének vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns különbséget. Bár a pikkelysömörös tünetes epidermiszben a D1 és D3 ciklin fehérjét kifejező sejtek száma szignifikánsan nagyobb, a sejtszámra normalizálva ez az arány az egészséges epidermiszhez viszonyítva nem változik. A mintákban a D1 és D2 ciklin fehérjét kifejező sejtek száma alacsony volt, míg a D3 ciklin fehérjét az epidermális sejtek nagy százaléka kifejezte. Eredményeink arra utalnak, hogy a tünetes pikkelysömörös krónikus plakokban a keratinociták gyors egymásutánban osztódnak anélkül, hogy sejtnyugalmi fázisba kerülnének és ehhez a legnagyobb mennyiségben termelt D3 ciklin fehérjét használják.

Epidermális sejtek flow citometriás analízisével kimutattuk, hogy a hámsejtek proliferációja nem különbözik a tünetmentes és normál epidermiszben, ugyanakkor a nem differenciált K1/10(-) hámsejtek száma emelkedett a tünetmentes bőrben, arra utalva, hogy a differenciálódás folyamata késleltetett.

*In vitro* vizsgálatainkkal arra keressük a választ, hogy a keratinocita növekedési faktor (KGF) szabályozza-e az alfa5 integrin promoter aktivitását a gyorsan osztódó HaCaT keratinocitákban. Vizsgálatokat végeztünk annak kiderítésére, hogy a KGF hogyan szabályozza az alfa5 integrin expressziót. Szinkronizált HaCaT keratinocitákat kezeltünk KGF-el, majd az alfa5 integrin mRNS szintű kifejeződését vizsgáltuk 3, 6, 9, 12, 24 és 48 órával a kezelés után. A legnagyobb, hozzávetőleg hétszeres emelkedést a kezelést követő 9. órában, 10 és 25 ng/ml-es KGF koncentrációknál kaptuk. A HaCaT keratinocitákat alfa5 integrin promoter-luciferáz riporter gént tartalmazó plazmiddal is transzfektáltuk, KGF-fel indukáltuk, majd az alfa5 integrin promoter aktivitását luminométerrel detektáltuk. KGF indukció hatására megemelkedett az alfa5 integrin promoter aktivitása, feltételezzük tehát, hogy a KGF részt vesz az alfa5 integrin kifejeződésének szabályozásában. A KGF-KGFR rendszer tagjainak mRNS és fehérjeszintű kifejeződésének vizsgálatát pikkelysömörben is elvégeztük. A KGFR mRNS szintű expresszióját mindaddig 10 egészséges, és 5-5 tünetes ill. tünetmentes epidermisz mintában összevetve azt találtuk, hogy a pikkelysömörös epidermisz mintákban (mind a tünetesben, mind a tünetmentesben) a gén expressziója háromszorosa az egészséges epidermiszben tapasztaltnak. A KGFR sejtciklus szabályozásában betöltött szerepét HaCaT sejteken vizsgáltuk, megállapítottuk, hogy a KGFR magas szintű mRNS és fehérjeszintű expressziója a magas szinten proliferáló sejtek sajátja.

A D típusú ciklinek redundáns működésének tanulmányozása céljából géncsendesítéses kísérleteket végeztünk, amelyekben a három D típusú ciklin kifejeződését páronként, illetve együttesen is csendesítettük HaCaT sejtekben. Valós idejű RT-PCR kísérletekkel és immuncitokémiával igazoltuk a sikeres génspecifikus csendesítéseket. A HaCaT sejtek morfológiája a transzfekciót követő 72 óráig változatlan volt. Ezt követően azonban azt tapasztaltuk, hogy a duplán ill. triplán csendesített sejtek morfológiája megváltozott, nagy, multinukleált sejtek jelentek meg a kultúrában. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a D típusú ciklinek expressziójának páronként, illetve együttes kombinációban történő csendesítése a sejtek S fázisban történő sejtciklus leálláshoz vezet. Korai apoptózis marker vizsgálatával kizártuk, hogy a páronkénti és az együttes D ciklin géncsendesítés apoptózishoz vezetne. A

HaCaT keratinociták egyik jellemző proliferációs marker génjének, az alfa5 integrinnek, illetve a K1/K10 korai differenciációs marker géneknek az expressziójában sem tapasztaltunk változást. Kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a D típusú ciklineknek feltehetően alapvető szabályozó szerepe lehet a HaCaT sejtek sejtciklusának S és G2 fázisaiban is, nem csupán a G1/S átmenetben, mint ahogy azt korábban az irodalmi adatok és saját eredményeink alapján gondoltuk.

Következő vizsgálatunkban egészséges bőrből származó keratinocitákat a korábban már használt alfa5 integrin promotor – luciferáz riporter gént tartalmazó plazmiddal transzfektáltunk, KGF-el indukáltuk, majd az alfa5 integrin promotor aktivitását luminométerrel detektáltuk. A KGF indukció után várt alfa5 integrin expresszió elmaradt. Ezzel szemben hasonló kísérleti elrendezésben vizsgált HEK293 sejtek esetén mérhetően megnőtt az alfa5 integrin expresszió. Ebből arra következtettünk, hogy a keratinociták esetén működik egy olyan mechanizmus, amely gátolja a KGF alfa5 integrin expressziót stimuláló hatását. E mechanizmus felderítését a továbbiakban tervezzük.

Annak vizsgálatára, hogy mechanikai stressz hatására milyen molekuláris változások következnek be a nem-léziós pikkelysömörös bőrben, enyhe mechanikai stressz hatást alkalmaztunk, ragtapasszal 10x sértettük a felhámot, „tape strippinget” végeztünk, majd shave biopsziát vettünk három pikkelysömörös beteg nem léziós bőrterületéről és három egészséges donortól. Mindegyik donortól kontroll mintát is vettünk, a kontroll a sértetlen bőr volt. Az egészséges donorok mintáiban az alfa5 integrin mRNS szintje mintegy háromszorosára, míg a KGF szintje kilencszeresére emelkedett a mechanikai stressz hatására. A pikkelysömörös kezeletlen mintákban az alfa5 integrin mRNS szintje eleve ötszörös volt az egészséges mintákhoz viszonyítva, ami a mechanikai stressz hatására az egészséges mintákban mért indukált mennyiség húszszorosára emelkedett. A későbbiekben tervezzük a D-típusú ciklinek és a KGFR expressziójának vizsgálatát ugyanezeneken a mintákon. További terveink között szerepel a minták fehérjeszintű vizsgálata. A fenti különbségek támogatják azt a feltételezésünket, miszerint a pikkelysömörös betegek tünetmentes bőre inherens eltéréseket hordoz, ami a betegségre való hajlamban alapvető szerepet játszik.

A pikkelysömör pathomechanizmusával, a D típusú ciklinekkel, valamint a KGF/KGFR keratinocitákban betöltött szerepével kapcsolatos eredményeinket közleményekben foglaltuk össze, és a *The Journal of Investigative Dermatology* és az *Experimental Dermatology* c. lapokban publikáltuk.

Ismert, hogy a pikkelysömörös tünetek területén a különböző neurotranszmitterek expressziója fokozódik. A projekt folyamán azt is vizsgáltuk, hogy a bőrben felszabaduló neurotranszmitterek receptorai hogyan fejeződnek ki a humán keratinociták felszínén és hogy milyen módon hatnak a keratinociták citokin termelésére. Megmutattuk, hogy a HaCaT keratinocitákon és a tenyésztett normál keratinocitákon is kifejeződik a galanin receptor 2 (GALR2). A receptor minden bizonnyal funkcionális, mivel galanin kezelés hatására a citoszolikus  $Ca^{2+}$  koncentráció megemelkedik a sejtekben. Immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei szerint a GALR2 az epidermiszben a bazális keratinociták felszínén fejeződik ki a legmagasabb szinten. Egy másik munkánkban azt követtük, hogy különböző neurotranszmitterek, úgy mint a SP, CGRP, VIP és GAL hogyan hatnak a keratinociták IL-1 $\alpha$ , IL-8 és TNF  $\alpha$  termelésére. Eredményeink szerint az összes megvizsgált neurotranszmitter indukálta a fenti citokinek génexpresszióját, míg fehérjeszinten az IL-1 $\alpha$  és az IL-8 emelkedését tudtuk kimutatni. Megvizsgáltuk azt is, a neurotranszmitterekkel való kezelés hogyan hat a keratinociták idegi növekedési faktor (nerve growth factor, NGF) kifejeződésére. Eredményeink szerint a keratinociták szekretálják az NGF éretlen (proNGF) és érett formáját is és a neuropeptidekkel kezelt keratinocitákban ennek szintje szignifikánsan megemelkedett. Eredményeink arra utalnak, hogy a neuropeptideknek ill. a keratinocitákon kifejeződő

receptoraiknak szerepe van a sejtek proliferációjának és immunfunkcióinak szabályozásában és mindezekeken keresztül feltehetően a pikkelysömör pathogenezisében is.

### Immunsejtek vizsgálata pikkelysömörben

Ismert, hogy a pikkelysömör háttérében a CD4+ és CD8+ T-sejtek epidermiszbe történő kóros beáramlása, aktiválódása áll. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a természetesen jelen levő, CD4+CD25+FoxP3+ regulátoros T-sejtek pikkelysömörben nem képesek a CD4+ T-sejtek aktivációjának és proliferációjának megfelelő gátlására, és így szerepet játszanak a betegség pathogenezisében. A funkcionális károsodás oka azonban nem ismert, ezért munkánkban ennek lehetséges okait vizsgáltuk.

A regulátoros T-sejt populáció szeparálására saját módszert dolgoztunk ki, melynek segítségével nagyteljesítményű áramlási citométer nélkül is megfelelő mennyiségű, tiszta szabályozó T sejteket nyerhetünk. Első lépésben antitesttel konjugált mágneses szemcsék segítségével a CD4+CD25+ és a CD4+CD25- populációt különválasztottuk. Az így kapott CD4+CD25+ sejtek közül egy további lépésben áramlási citometriás módszerrel elválasztottuk a CD127 negatív populációt, ez utóbbi (CD4+CD25+CD127-) populációt tekintettük regulátoros T sejteknek. A kapott T sejt populációban a regulátoros T sejtek arányát a FoxP3 transzkripciós faktor expressziójának meghatározásával ellenőriztük, ami minden esetben legalább 95% felettinek bizonyult.

Munkánk egyik részében az IL-1 és IL-1R gének expressziójának vizsgálatát végeztük el psoriasisos és normál vérből izolált regulátoros (CD4+CD25+CD127-) és effektor (CD4+CD25-) T-sejteken. Az IL-1 ismert proinflammatorikus citokin, melynek biológiai hatásait az I-es típusú IL-1 receptor (IL-1RI) közvetíti a sejtekbe. A II-es típusú interleukin-1 receptor (IL-1RII) és a sIL1RII (szolubilis IL-1RII) intracitoplazmatikus jelátvitelre nem képes IL-1 kötő receptorok, míg az IL-1 antagonist (IL1RN) szolubilis IL-1 kötő molekula. Feltehetően mindhárom fehérje az IL-1 proinflammatorikus hatásainak csökkentésében játszik szerepet, azaz antiinflammatorikus szerepe lehet. Eredményeink szerint az interleukin 1 biológiai hatásainak közvetítéséért felelős IL-1R1 (I típusú interleukin-1 receptor) gén expressziója perifériás vérből izolált effektor T-sejteken mintegy 75%-kal magasabb, mint a regulátoros (CD4+CD25+CD127-) T-sejteken. Ezzel szemben a regulátoros T-sejteken az IL-1R2 (II típusú interleukin-1 receptor) és a sIL-1R2 (II típusú szolubilis interleukin-1 receptor) mRNS expressziója 2- illetve 4-szerese az effektor sejteken mért értékeknek.

Normál vérből izolált effektor (CD4+CD25-) T-sejtek IL-1RI génexpressziója CD3/CD28 aktiváció hatására 1 óra elteltével több mint hatszázszorosára, 6 órával később pedig több mint negyvenezerszeresére fokozódik. Ugyanakkor a regulátoros (CD4+CD25+CD127-) T sejteken a CD3/CD28 stimuláció 1 óra elteltével csak átlagosan háromszoros, 6 óra alatt pedig csak mintegy 160 szoros génexpresszió fokozódást idéz elő. Ezzel szemben az IL-1 biológiai hatásainak semlegesítését végző decoy IL-1RII és sIL-1RII gének expressziója CD3/CD28 aktivációt követően 1 és 6 óra elteltével az effektor (CD4+CD25-) sejteken gyakorlatilag nem változik, míg a regulátoros (CD4+CD25+CD127-) sejteken jelentősen megnő (6 óra múlva 28 illetve 26 szorosára). Hasonló eredményt kaptunk a szintén az IL-1 hatásait semlegesítő IL-1N expresziójának vizsgálatakor is, azaz a CD3/CD28 stimuláció hatására csak a regulátoros T sejtek génexpressziója fokozódik.

Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a (CD4+CD25+CD127-) regulátoros T sejtek az effektor sejtekhez képest alacsonyabb szinten expresszálják az IL-1 hatásának átviteléért felelős IL-1 receptort. Ezzel szemben az IL-1 proinflammatorikus hatásainak semlegesítése érdekében alapállapotban is nagyobb mértékben fejezik ki a szolubilis és sejt felszíni IL-1 antagonist molekula mRNS-eit, illetve sejtaktiváció hatására képesek ezen molekulák jelentős mértékű upregulációjára. Ezek a folyamatok részben a gyulladáshoz kapcsolódó reakciók

lecsengését segíthetik, másrészt a regulátoros T sejteket védhetik a környezetükben lévő proinflammatorikus citokinek hatásaival szemben.

Munkánk másik részének célkitűzése az ARTS-1 (aminopeptidase regulator of tumor necrosis factor receptor 1 shedding) mRNS expressziójának meghatározása pikkelysömörös és normál perifériás vérből és bőrből izolált CD4+CD25+CD127- (regulátoros) és CD4+CD25- (effektor) T sejteken real-time quantitative PCR technikával, illetve az ARTS-1 gén polimorfizmusainak vizsgálata. Az ARTS-1 molekula irányítja számos sejtfelszíni citokin receptor (többek között az IL-1RII, a TNFR1 és az IL-6R) sejtfelszínről történő leválását, sheddingjét, ezáltal fontos szerepet játszik számos immunológiai reakcióban. Legújabb az ARTS-1 gén polimorfizmusát immunológiailag mediált betegségekhez is asszociálták. Kísérleteinkben az ARTS-1 gén szerepét vizsgáltuk a regulátoros T sejtek működésével kapcsolatban psoriasisban.

Egészséges egyének vérből izolált CD4+CD25- T-lymphocyták ARTS-1 gén expressziója 5,6-szor magasabb, mint a regulátoros (CD4+CD25+CD127-) T sejté. Pikkelysömörös betegek effektor (CD4+CD25-) T sejtjei esetén az ARTS gén expressziója ugyanakkor jóval nagyobb mértékben, 106-szor magasabb, mint az ugyanazon betegtől származó CD4+CD25+CD127- (regulátoros) T sejté. Kiemelendő az ARTS jóval alacsonyabb expressziója a CD4+CD25+CD127- sejteken, mely ezáltal a regulátoros T-sejtek negatív markereként is felfogható.

Az ARTS-1 gén magasabb expresszióját (kb.5-szörös) mutattuk ki a tünetes dermiszben összehasonlítva az egészséges dermiszsel. A tünetes epidermiszben, és a normál epidermiszben is alacsony az ARTS-1 expresszió, a nem tünetes epidermiszben nem mutatható ki az ARTS-1. A legnagyobb különbség a tünetes dermisz és a normál dermisz között figyelhető meg.

Az ARTS-1 gén polimorfizmusait is vizsgáltuk pikkelysömörben és arthritis psoriaticában. Vizsgálataink során 120 pikkelysömörben (psoriasis vulgarisban) és 50 arthritis psoriaticában szenvedő beteg, kontrollként 120 egészséges egyén vérmintáit használtuk fel. Az rs17482078-as számú SNP vizsgálata során statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk a kontroll csoport és az arthritis psoriaticában szenvedő betegek között. Az arthritises betegek között nagyobb arányban fordult elő a gén vad típusú allélja, mint az egészségesek között, így feltételezhetjük, hogy a gén mutáns típusú allélja protektív hatással rendelkezik az arthritis psoriatica kialakulásával szemben. Nem volt ugyanakkor statisztikailag értékelhető eltérés a csak bőrtünetekkel rendelkező betegek és a kontroll csoport között erre a polimorfizmusra vonatkoztatva, illetve a gén rs30187 és rs10050860-as számú SNP-jének vizsgálata során a vizsgált beteg és egészséges populációk között.

### Genomikai és molekuláris biológiai vizsgálatok pikkelysömörben

Genomikai és génexpressziós vizsgálataink célja olyan molekuláris szintű eltérések azonosítása volt, amelyek hozzájárulnak a pikkelysömörre való hajlamhoz. A pályázatot megelőző időszakban azonosítottunk egy nem-kódoló RNS-t, PRINS-t, amelynek expressziója a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben bizonyult a legmagasabbnak. Kutatásaink egyik fő célja ennek a nem-kódoló RNS-nek a minél részletesebb jellemzése, a sejtek működésében és a pikkelysömör pathogenezisében betöltött szerepének tisztázása.

Real-time RT-PCR kísérletekkel igazoltuk, hogy az *in vitro* tenyésztett HaCaT sejtekben a PRINS nem-kódoló RNS gén expressziója különböző stressz hatásokra nagymértékben (3-40X) megemelkedett. Ezekben a kísérletekben a HaCaT sejteket különböző stressz hatásoknak tettük ki: széruméheztetés, ko-inkubáció mikrobiális anyagokkal és mikrobákkal, transzlációgátlás cikloheximiddel ill. HSV-1-gyel, UV-B sugárzás. Mindezekből arra következtettünk, hogy a PRINS gén upregulációja feltehetően

része a sejtek stressz válaszában. Ezt a feltételezésünket géncsendesítéses funkcionális vizsgálatokkal is igazoltuk: bebizonyítottuk, hogy azoknak a HaCaT sejteknek, amelyekben a PRINS gén expressziója csendesítésre került, csökkent a viabilitása széruméheztes hatására.

Azt is vizsgáltuk, hogy az immortalizált HaCaT sejtekben talált PRINS génextpressziós szabályozási folyamatok ugyanolyan módon működnek-e tenyésztett keratinocitákban. Eredményeink szerint a transzlációs inhibitor cikloheximid és a mikrobiális ágensek a tenyésztett keratinocitákban jóval kisebb mértékű PRINS expressziót indukáltak, mint az immortalizált HaCaT sejtekben. Feltételezzük, hogy az eltérés oka abban rejlik, hogy a HaCaT sejtekben eltérően működnek a stressz indukált jelátviteli útvonalak, mint normál tenyésztett keratinocitákban. Az eredményeinket összefoglaló közleményt elkészítettük és a közeljövőben publikáljuk.

Kísérleteket végeztünk abban az irányban is, hogy a PRINS gén expressziójának csendesítése milyen másodlagos génextpressziós változásokat okoz a sejtekben. Csendesítéses vizsgálatunkat immortalizált HaCaT és HeLa sejtekben is elvégeztük és a HeLa sejtek esetében rendkívül érdekes sejt-morfológiai eltéréseket tapasztaltunk a csendesítés következtében. cDNS chip vizsgálatot végeztünk, melynek során HeLa sejtekben azonosítottuk a csendesítés következtében fellépő génextpressziós változásokat. Jelenleg egy olyan gén ill. fehérje jellemzésén (G1P3) dolgozunk, amely konzekvens down-regulációt mutat a csendesített sejtekben. Mivel a G1P3 gén expressziója kísérleti eredményeink szerint a pikkelysömörös tünetes epidermiszben négyszázszorosa a normál bőrben tapasztaltnak, további célunk ennek a génnek a részletes jellemzése a pikkelysömör pathogenezisében. In vitro kísérleteink eredménye szerint a G1P3 a proliferáló keratinocitákban expresszálódik a legmagasabb szinten. A valós idejű RT-PCR és az immunhisztokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a G1P3 minden általunk vizsgált szervben és szövetben kifejeződik, emiatt feltételezzük, hogy általános funkcióval bír, mint a sejtek túlélését elősegítő, antiapoptotikus hatású fehérje. Az immunhisztokémiai vizsgálat ugyancsak jelentős G1P3 fehérje növekedést mutatott pikkelysömörös tünetes epidermiszben. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a G1P3 gén a PRINS nem-kódoló RNS szabályozása alatt áll és szerepet játszik a pikkelysömör pathomechanizmusában anti-apoptotikus tulajdonsága révén, fenntartva a pikkelysömörös keratinociták hiperproliferációját. Az eredményeket összegző kézirat jelenleg elbírálás alatt a *The Journal of Investigative Dermatology* c. lapban.

Pályázatunk egy másik fontos célkitűzése az volt, a PRINS nem-kódoló RNS-sel fizikailag kölcsönható nukleinsav vagy/és fehérje molekulákat azonosítsunk. In vitro vizsgálatunkat ribonukleoprotein (RNP) tisztító kittel végeztük, melyben targetként a PRINS gén előzőleg hatékonyan csendesített régiójáról készült transzkript szolgált. MALDI-TOF technikával HaCaT sejt-lizátumból azonosítottunk két fehérjét, melyek kísérleteink alapján fizikailag kapcsolódnak a PRINS RNS-sel. Ismert, hogy a nucleophosmin egy konstitutívan kifejeződő, sejt-magi foszoprotein, amely fontos szerepet tölt be a sejt-mag és a citoplazma közötti anyagcserében, míg a másik PRINS RNS-hez kötődő fehérje, a GRP94 egy molekuláris chaperone hő sokk protein. Feltételezzük, hogy ez a két, chaperon funkcióval bíró fehérje, a nucleophosmin, illetve a GRP94 szerepet játszanak a PRINS sejt-mag és citoplazma közötti transzportjában. Jelenleg is folyó munkáink elsősorban azt célozzák, hogy e két azonosított protein szerepét tisztázzuk a keratinociták proliferációjának és differenciációjának szabályozásában, valamint a pikkelysömör pathogenezisében. HaCaT sejtekkel és normál tenyésztett keratinocitákkal végzett kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy mind a nucleophosmin, mind a GRP94 akkor fejeződik ki a legmagasabb szinten a keratinocitákban, amikor azok aktívan proliferálnak. Feltételezzük tehát, hogy mindkét fehérjetermék a keratinociták proliferációjának szabályozásában vesz részt. Immun-hisztokémiai vizsgálatunk alapján a GRP94 expressziója nem mutatott különbséget a pikkelysömörös tünetes és tünetmentes mintákban az egészséges epidermiszhez viszonyítva, míg a nucleophosmin

expressziója szignifikánsan magasabb a pikkelysömörös tünetes epidermisz bazális rétegében. Feltételezzük, hogy a PRINS nem kódoló RNS a fenti molekulákkal kölcsönhatásban egy olyan molekuláris komplex szerves építőeleme lehet, mely szerepet játszik a sejtek stressz indukálta folyamataiban és hogy eme komplex kóros működése hozzájárulhat a pikkelysömörös tünetek kialakulásához. A nucleophosmin molekulával kapcsolatos eredményeinket egy közleményben összegeztük, amelyet a közeljövőben tervezünk publikálni, a GRP94 fehérjére vonatkozó adatainkat pedig néhány kísérletes kiegészítést követően tesszük közzé.

Korábbi saját eredményeink arra utaltak, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből izolált keratinociták fokozott érzékenységgel válaszolnak hiperproliferációval citokin indukcióra, az egészséges epidermiszből származó keratinocitákkal összehasonlítva. Feltételezzük, hogy ez az inherens érzékenység hozzájárul a pikkelysömörre való hajlam kialakulásához, és kulcs momentuma lehet a pikkelysömörös tünetek megjelenésének. Ennek kiderítésére egy olyan kísérleti megközelítést alkalmaztunk, melyben organotipikus kultúrákban összevetettük a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben és az egészséges epidermiszben bekövetkező génextpressziós változásokat. Munkánk első szakaszában a kísérleti körülményeket optimalizáltuk, elsődleges kérdésünk az volt, hogy a bőrminták háromnapos organotipikus kultúrában való tartása milyen hatással van az epidermiszből kinyerhető totál RNS minőségére, az vajon megfelel-e az azt követő cDNS microarray kísérlet minőségi követelményeinek. Optimalizáló kísérleteink sikeres lezárását követően négy pikkelysömörös tünetmentes és négy egészséges epidermisz mintából izoláltunk totál RNS-t, mind a nyolc mintából minta párokat képeztünk, amelyek közül az egyiket INF- $\gamma$ , IL-3 és GMC-SF citokinek keratinocita proliferációt indukáló elegyével kezeltük, míg a másik nem kapott ilyen kezelést az organotipikus kultúrában. A cDNS microarray kísérletet a Semmelweis Egyetem Genetikai- Sejt és Immunbiológiai Intézetének munkatársaival együttműködésben a „Microarray Core Facility” segítségével végeztük. Az elsődleges adatok feldolgozásánál arra törekedtünk, hogy a citokin indukció hatására eltérő módon indukálódó vagy represszálódó géneket azonosítsunk az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben, mindkét irányban minimum kétszeres változásokat vettük figyelembe. Huszonhárom eltérően expresszálódó gént azonosítottunk, melyek közül csupán háromnak a kifejeződése volt magasabb a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben citokin indukció hatására, mint egészséges epidermiszben. Mind a három gén mindeddig ismeretlen funkciójú fehérjét kódol. Húsz olyan gént azonosítottunk, amelynek expressziója a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben alacsonyabbnak bizonyult citokin indukció hatására, mint az egészséges epidermiszben. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az pikkelysömörös epidermisz fokozott válaszélessége mögött inkább bizonyos gének citokin indukcióra adott válaszában alacsonyabb szintű expressziója rejlik. Mindez annak a lehetőségét veti fel, hogy a proliferációt negatívan szabályozó faktorok működése mutat eltérést a pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban, amelyek aztán nem képesek megfékezni a citokin indukció hatására indukálódó, a keratinocitákat hiperproliferációra serkentő folyamatokat. Az alacsonyabb expressziót mutató gének között számos olyat lehet találni, amelynek funkciója ismert és a sejtek proliferációjának, valamint az immunválasz kialakításának szabályozásában is részt vesz. Kiemelnénk azt a gént, amely a legnagyobb mértékű eltérést adta a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz és az egészséges epidermisz összevetése során: az „early growth response 4” (EGR-4; NM\_001965) jelű gén a pikkelysömörös epidermiszben ötödakkora mértékű kifejeződést mutatott citokin indukció hatására, mint az egészséges epidermisz. Az irodalomban fellelhető eddigi adatok szerint az EGR-4 molekula egy transzkripciós faktor, mely a „nuclear factors of activated T cells” (NFAT) molekulával heterodimert képezve a proinflammatorikus citokinek expresszióját szabályozza.

További célunk a cDNS microarray kísérletben azonosított gének validálása és szerepük tisztázása a keratinociták proliferációjának/differenciációjának szabályozásában, valamint a pikkelysömör pathogenezisében.

### Egyéb multifaktoriális bőrgyógyászati kórképek vizsgálata

A pikkelysömör kutatása mellett Klinikánkon egyéb multifaktoriális bőrgyógyászati (acne vulgaris, acne inversa, lábszárfekély) és allergológiai (szénanátha) kórképekben is végzünk párhuzamos kutatásokat. Ezekben a projektekben a fenti betegségek pathogenezisének genomikai és sejtbiológiai aspektusait kutatjuk, és mivel kísérleteinkhez jelen pályázat anyagi forrásait is használtuk, a fenti témákban megjelent közleményeinkben is utaltunk a pályázat támogatására.

A nagy gyakorisággal előforduló acne vulgaris pathogenezisének kutatása során molekuláris biológiai és genomikai vizsgálatokat végeztünk. Megállapítottuk, hogy az acne vulgaris kialakulása során túlzott mértékben faggyút termelő szebociták fokozott mértékben expresszálnak antimikrobiális peptideket, kemokineket és citokineket *P. acnes*-szel és lipopoliszahariddal való együtt-tenyésztés hatására, valamint hogy különböző *P. acnes* törzsek ezeket a folyamatokat különböző mértékben indukálják. Feltételezzük, hogy ezeknek a folyamatoknak szerepe van az acne vulgaris pathogenezisében. Genomikai vizsgálataink alapfeltevése az volt, hogy a mikrobiális mintázatfelismerő Toll-like receptor gének (TLR) egyes polimorfizmusai hajlamosító faktorként vehetnek részt a betegség pathogenezisében. A TLR2 és TLR4 gének SNP-it vizsgáltuk és eredmények arra utaltak, hogy ezek a polimorfizmusok feltehetően nem járulnak hozzá az acne vulgarisra való hajlam kialakításához.

Számos tanulmányt végeztünk a kóros sebgyógyulással járó, az életminőséget nagymértékben lerontó vénás eredetű lábszárfekély pathogenezisének megismerésére is. Genomikai vizsgálatainkkal megmutattuk, hogy a TNF $\alpha$  gén -308 promóter polimorfizmusa feltehetően hozzájárul a lábszárfekélyre való hajlam kialakításához, hatását azonban nem elsődlegesen, hanem az elhízásra való hajlam fokozásán keresztül fejt ki. Egy másik kísérletsorozatunkban kimutattuk, hogy a normál sebgyógyulásban szerepet játszó heparán szulfát proteoglikán, a szindekán-4 a lábszárfekélyes betegek tünetmentes dermiszében alacsonyabb szinten fejeződik ki, mint az egészséges egyének dermiszében és ezúton feltehetően hozzájárul a betegség pathogeneziséhez.

Vizsgálatokat végzünk a legrosszindulatúbb bőrdaganat, a melanoma pathogenezisére vonatkozóan is. Egy multiplex primér melanómában szenvedő beteg és családtagjainak vizsgálata során homozigóta formában azonosítottunk egy rendkívül ritka CDKN2A mutációt (P48T), amelyet más szerzők mindezig csak olasz vagy olasz származású betegek esetében és kizárólag heterozigóta formában detektáltak. Kidolgoztunk egy melanociták tenyésztésére alkalmas, mitogénektől mentes táptalajt. Megmutattuk, hogy a humán melanociták kifejezik a epidemális növekedési faktor receptort (EGFR), és hogy a melanociták dózisfüggő módon osztódással válaszolnak az EGF ingerre.

A Klinikán gyulladásoos bőrbetegségek és allergológiai kórképek kezelésére alkalmas új terápiás eljárások kidolgozását is végezzük és vizsgáljuk azok hatásmechanizmusát. Ezen munkáink során megmutattuk, hogy az orrüreg PUVA kezelése javítja a szénanátha klinikai tüneteit, valamint gátolja a bőr azonnali típusú hiperszenzitív reakcióját. Összehasonlítottuk a bőrgyógyászati gyakorlatban is használt budenoside és tacrolimus keratinociták immunfunkcióira gyakorolt hatását és megállapítottuk, hogy a budenid jelentősen befolyásolja, míg a tacrolimus nincs hatással a keratinociták immunfunkcióira. Feltehetően ez a különbség is hozzájárul a két hatóanyag bőrgyógyászati alkalmazásakor megfigyelhető terápiás és mellékhatásokban megfigyelhető eltéréseinek kialakulásához.