

MTA Doktora Pályázat
Doktori Értekezés

**IMMUNMEDIÁLT MULTIFAKTORIÁLIS BŐRBETEGSÉGEK
PATHOGENEZISÉNEK GENOMIKAI ÉS MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA**

Dr. Széll Márta

SZEGED

2009

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|------------|
| 1. A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke | 3 |
| 2. Bevezetés..... | 5 |
| 2.1. A genomikai és molekuláris biológiai kutatások jelentősége a multifaktoriális bőrbetegségek pathogenezisének kutatásában..... | 5 |
| 2.2. A vizsgált multifaktoriális bőrgyógyászati kórképek..... | 7 |
| 2.2.1. A pikkelysömör | 7 |
| 2.2.2. A krónikus vénás elégtelenség talaján kialakuló lábszárfekély..... | 12 |
| 2.2.3. A festékhiányos bőrbetegség..... | 16 |
| 2.2.4. A melanoma..... | 20 |
| 3. Célkitűzések | 24 |
| 4. Anyagok és módszerek..... | 25 |
| 4.1. Szövetminták | 25 |
| 4.2. Genomi DNS tisztítása polimorfizmus vizsgálatok céljára | 25 |
| 4.3. Sejt- és szövettenyésztési eljárások | 26 |
| 4.3. Génexpressziós vizsgálatok..... | 29 |
| 4.4. Fehérje expressziós vizsgálatok | 32 |
| 4.5. Funkcionális vizsgálatok | 35 |
| 4.6. Viabilitási vizsgálatok | 36 |
| 4.7. Statisztikai analízisek | 37 |
| 5. Eredmények | 38 |
| 5.1. A keratinocita proliferáció szabályozásának vizsgálata multifaktoriális bőrbetegségekben | 38 |
| 5.2. Multifaktoriális bőrbetegségekre hajlamosító polimorfizmusok azonosítása és vizsgálata | 59 |
| 5.3. A PRINS nem-kódoló RNS azonosítása, szerepe a sejtek stresszválaszában és a pikkelysömör pathogenezisében..... | 72 |
| 6. Megbeszélés | 81 |
| 7. Összefoglalás | 99 |
| 8. Az eredmények gyakorlati hasznosításának lehetősége..... | 103 |
| 9. Irodalomjegyzék | 105 |
| 10. A dolgozat elkészítéséhez felhasznált közlemények jegyzéke..... | 118 |
| 11. A bőr immunfunkcióival kapcsolatos, a dolgozatba be nem épített társszerzős közlemények jegyzéke | 119 |
| 12. Köszönetnyilvánítás..... | 121 |

1. A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke

| | |
|------------|---|
| BMI: | testtömegindex |
| BSA: | marha szérum albumin |
| BrdU: | 5'-bromo-2'-deoxi-uridin |
| CI: | konfidencia intervallum |
| CBB: | Coomassie Brilliant Blue |
| CDKN2A: | ciklin dependens kináz 2A |
| EDA: | extra domén A |
| EDTA: | etiléndiamintetraacetátsav |
| FBS: | fötális borjúszerum |
| FGF/FGFR: | fibroblaszt növekedési faktor/fibroblaszt növekedési faktor receptor |
| FITC: | fluoreszcein izitiocianát |
| HSV-1: | Herpes simplex vírus 1 |
| IL: | interleukin |
| K1 és K10: | keratin 1 és keratin 10 |
| KGF/KGFR: | keratinocita növekedési faktor/ keratinocita növekedési faktor receptor |
| MC1R: | melanokortin 1 receptor |
| MSRH: | α -melanocita stimuláló hormon receptor |
| MTT: | (3,4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid |
| OR: | esélyhányados |
| PBS: | foszfátpuffer |
| PCR: | polimeráz lácreakció |
| PCR-RFLP: | polimeráz láncreakció-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus |
| PCNA: | proliferáló sejt nukleáris antigén |
| PE: | fikoereitrin |
| PFU: | plakk formáló egység |
| RSA: | visszaszekvenáló amplikon |
| RT-PCR: | reverz transzkripció polimeráz lácreakció |
| SDS: | nátrium dodecil szulfát |
| SDS-PAGE: | nátrium dodecil szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis |
| SNP: | egy nukleotidot érintő polimorfizmus |

TFIIB: transzkripció faktor IIB
TGF- β : transzformáló növekedési faktor béta
TNF- α : tumor nekrozis faktor alfa
VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
UTR: fehérjévé át nem íródó régió

2. Bevezetés

2.1. A genomikai és molekuláris biológiai kutatások jelentősége a multifaktoriális bőrbetegségek pathogenezisének kutatásában

A bőrgyógyászati gyakorlatban régóta ismert, hogy egyes bőrbetegségek – melyek közül jó néhány igen súlyos tünetekkel jár, némelyikük az étellel is összeegyeztethetetlen – családi halmozódást mutatnak. A genetika 20. századi fejlődésének köszönhetően arra is fény derült, hogy ezek közül a bőrbetegségek közül vannak olyanok, amelyek mendeli öröklődés menetét követnek, recesszíven vagy dominánsan öröklődnek, illetve egyes betegségek esetében az is nyilvánvalóvá vált, hogy nemi kromoszómához kötötten öröklődnek. Ezeket a bőrgyógyászati kórképeket összefoglalóan genodermatózisoknak hívjuk. Más, jóval gyakrabban előforduló bőrbetegségek (pikkelysömör, atópiás dermatitisz, vénás eredetű lábszárfekély, vitiligo, acne és melanoma) esetében szintén felfigyeltek rá, hogy a tünetek megjelenése egyes családokban gyakoribb, de a genodermatózisokkal ellentétben ezekben a kórképekben nem egyértelműen levezethető az öröklődés menet, a megfigyelések szerint környezeti és életmódbeli tényezők is nagymértékben befolyásolják ezen betegségek kialakulását. Ez utóbbi kórképeket multifaktoriális bőrbetegségeknek hívjuk. Dolgozatomban olyan multifaktoriális bőrgyógyászati kórképek genomikai és molekuláris biológiai vizsgálatairól számolok be, melyek pathomechanizmusában fontos, meghatározó komponens az immunszabályozások zavara.

A genodermatózisok és a multifaktoriális bőrbetegségek háttérében álló genetikai eltérések azonosításának nagy lendületet adott az 1990-ben elindított Humán Genom Projekt. A nemzetközi összefogással, állami intézmények és magáncégek bevonásával létrejött grandiózus munka eredményeként napjainkra 3×10^9 bázispárnnyi humán genomi DNS szekvenálása történt meg, és a szekvencia adatok alapján megközelítőleg 30 ezer, fehérjévé is átíródó gén jelenlétét feltételezik a teljes humán genomban. A Humán Genom Projekt sikeres lezárásával kezdetét vette az ún. posztgenomi korszak. A posztgenomi korszak feladata, hogy a Projekt adatai által nyitott beláthatatlan távlatokat kihasználva megfejtse, hogy minek köszönhető az emberi rassz sokszínűsége, különböző testi, Szellemi és lelki jegyeink kialakítása; és nem utolsó sorban az, hogy fényt derítsen humán betegségek háttérében álló genetikai, molekuláris biológiai és immunológiai eltérésekre.

Dolgozatom eredményei azt példázzák, hogy kutatásainkat a Humán Genom Projekt által szolgáltatott adatokra építve hogyan kerülhetünk közelebb a multifaktoriális betegségek, esetünkben az immunmediált multifaktoriális bőrgyógyászati kórképek pathogenezisének, a betegségek mechanizmusának megértéséhez.

Munkám első részében nagyrészt a pikkelysömörben és vénás eredetű lábszárfekélyben végzett sejt-és molekuláris biológiai vizsgálatainkat összegzem. A bemutatott kísérletek megtervezése, kivitelezése során nagyban támaszkodtunk a Humán Genom Projekt által szolgáltatott adatokra, gén-és fehérje expressziós eredményeink nem jöhettek volna létre ezek nélkül. Az reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR), majd a polimeráz láncreakció (PCR) valós idejű detektálásának megjelenésével olyan eszköz került a kezünkbe, mellyel rendkívül nagy specificitással és érzékenységgel lehet génextpressziós eltéréseket, változásokat detektálni. A betegségek pathomechanizmusának megértésében ennek rendkívül nagy jelentősége van, akár magában a beteg szövetben követjük ezeket a génextpressziós változásokat, akár az őket modellező *in vitro* kísérletekben.

A dolgozat második részében a multifaktoriális bőrgyógyászati kórképekben végzett polimorfizmus és mutáció vizsgálatainkról számolok be. Szintén a Humán Genom Projektnek, majd a valamivel később indított HapMap projektnek köszönhetően vált ismertté, hogy a humán genom variabilitásának döntő többségét az úgynevezett „single nucleotide polymorphism” -ok, SNP-k adják. Jelenlegi becslések szerint a mintegy 3 milliárd nukleotid hosszúságú emberi örökítő anyagban minden 300. nukleotid eltérést mutat. Ha az örökítő anyagban bekövetkezett változás 1%-nál nagyobb arányban fordul elő egy adott populációban, akkor polimorfizmusról beszélünk. Nagyrészt polimorfizmusaink felelősek az emberi rasszban megfigyelhető jegyek változatosságáért, különböző betegségekre való fogékonyságért, bizonyos terápiákra adott válaszkészség egyéni eltéréseiért. Az is világossá vált az elmúlt évtized igen intenzív kutatásainak köszönhetően, hogy a humán nagyrasszok, illetve egyes populációk nagy különbségeket mutatnak abból a szempontból, hogy egyes polimorfizmusok milyen gyakorisággal fordulnak elő körükben. Természetesen ez azt is maga után vonja, hogy az eltérő polimorfizmus mintázat eltérő betegségekre tesz fogékonnyá különböző népcsoportokat. Az ezzel kapcsolatos tudásunkat fogja még jobban elmélyíteni és beláthatatlan mennyiségű genomi adatot fog szolgáltatni a közelmúltban indított „1000 Genomes” projekt, melynek keretében különböző etnikumokból származó humán genomok teljes hosszúságú megszekvenálását fogják elvégezni.

Munkám harmadik részében egy kutatócsoportunk által azonosított, fehérjévé át nem íródó, ún. nem kódoló RNS-ről írok, annak elsődleges jellemzéséről, valamint arról, hogy eredményeink szerint milyen szerepet játszik az immunmediált multifaktoriális kórkép, a pikkelysömör pathogenezisében. Már a 90-es évek elején jelentek meg olyan közlemények, amelyekben fehérjévé át nem íródó, RNS-két működő transzkriptumokat azonosítottak és azok humán betegségekben betöltött szerepét vizsgálták (Biran és mtsai, 1994; Lukiw és mtsai, 1992; Tiedge és mtsai, 1993). A Humán Genom Projekt adatai révén jutottunk mégis arra a meglepő felismerésre, hogy az emberi örökítő anyagnak mindössze 3%-a íródik át fehérjévé, és a fehérjéket kódoló génjeink száma nem haladja meg a 30 ezret. Az is ismert azonban, hogy a humán genom megközelítőleg fele átíródik RNS-sé, valamint hogy a fehérjévé át nem íródó transzkriptumok mennyisége egyenesen arányos egy adott organizmus komplexitásával (Taft és mtsai, 2007). Az utóbbi évek eredményei dogmaváltásra ösztönözték a kutatókat. Az évtizedekig elfogadott ún. centrális dogma, miszerint kizárólag a fehérjéket kódoló gének a fontosak, helyét elfoglalja egy olyan szemlélet, melyben a korábban „junk”-nak tekintett, fehérjévé át nem íródó humán transzkriptumok is fontos helyet kapnak, és intenzív kutatásuknak köszönhetően egyre többet tudunk szerepükről a sejtek működésének szabályozásában, ill. humán betegségek pathogenezisében (Széll és mtsai, 2008). Munkám harmadik részében arról írok, hogy hogyan azonosítottunk és jellemeztünk egy mRNS-szerű nem kódoló RNS-t, a PRINS-t, amely eredményeink szerint egyrészt részt vesz a sejtek stresszválaszának, másrészt a pikkelysömörre való hajlam kialakításában.

2.2. A vizsgált multifaktoriális bőrgyógyászati kórképek

2.2.1. A pikkelysömör

A pikkelysömör a kaukázusi populációban 2–3% gyakorisággal előforduló kórkép, a bőrgyógyászati rendelések forgalmának kb. 8%-át adja az érintett betegek ellátása, gondozása. A pikkelysömör tehát joggal tekinthető az egyik leggyakoribb bőrbetegségnek.

Más poligénes betegségekhez hasonlóan a pikkelysömör klinikai spektruma is széles: a tünetek súlyossága igen széles skálán mozog, az életminőséget alig befolyásoló néhány lokalizált bőrtünet jelentkezésétől a súlyos, egész bőrfelületet érintő, ízületi panaszokkal kísért, az életet veszélyeztető formáig terjed. A pikkelysömörös bőrtünetek

kialakulásában nagy szerepet játszik a T-sejtes infiltrátum a hám alatti kötőszövetben és a hámban, valamint a hámsejtek (keratinociták) fokozott osztódása és kóros differenciálódása. A pikkelysömörös betegek bőrén a legkülönbözőbb hatásokra (fizikai, kémiai trauma, infekció, kontakt allergének, stressz, fokozott alkoholfogyasztás, bizonyos gyógyszerek) kialakul a jellegzetes pikkelysömörös lézió (Köbner-jelenség), jelezve, hogy a pikkelysömörös beteg bőre tünetmentes állapotában is kóros reakciókészséget hordoz. A pikkelysömör klinikai képe igen változatos, de alapvetően két altípust: a fiatal korban jelentkező I. típust és a felnőtt korban jelentkező II. típust különböztetünk meg. A fiatal korban jelentkező forma általában negyvenéves kor előtt alakul ki, gyakran hirtelen, nagy kiterjedésben jelentkező pontszerű (guttált) bőrtünetek formájában, míg a II. típusra inkább a nagy kiterjedésű plakkok a jellemzőek (2.2.1/1 ábra).

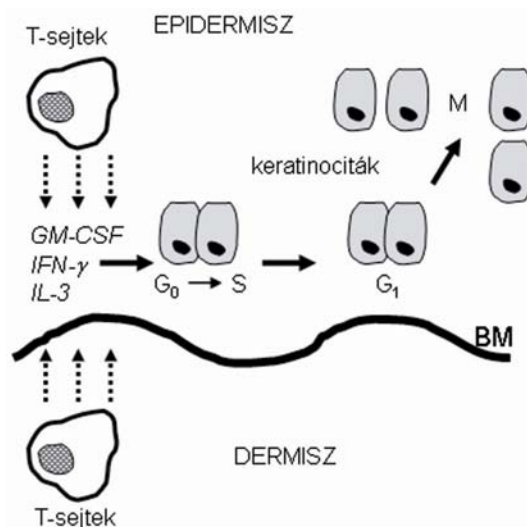
A bőrt infiltráló T-sejtek pathomechanizmusban játszott szerepének vizsgálata az 1980-as években kezdődött, Jan D. Bos és munkatársai 1983-ban írták le az infiltrátum sejteinek immunfenotípusát (Bos és De Rie, 1999). Kísérletes adatok bizonyították, hogy a bőrt infiltráló aktivált T-sejtek limfokinjeik révén a pikkelysömörös betegek keratinocita őssejt típusú sejteinek proliferációját fokozzák, normál bőrből származó sejteken ilyen hatást nem lehet észlelni. A hámproliferációt kiváltó limfokinhatás egyik lényeges eleme az interferon- γ (IFN- γ) Számos vizsgálat igazolta, hogy a pikkelysömörben kialakuló gyulladásban fontos szerepet játszanak az autoreaktív, IFN- γ termelő, Th1 típusú T-sejtek (Bata-Csörgő és mtsai, 1995) (2.2.1/2. ábra). Az utóbbi években egyre több, régóta alkalmazott antipszoriaticus hatású terápiáról (fénykezelések, methotrexat, retinoidok, D3 vitamin analógok) derült ki, hogy a Th1-es típusú immunválaszt visszaszorítják, ami feltehetően hozzájárul a betegségben tapasztalt terápiás hatáshoz.

Annak köszönhetően, hogy a pikkelysömör immunológiai hátterének vizsgálata fényt derített számos, a betegség pathomechanizmusában szerepet játszó folyamatra és az azokban részt vevő komponensekre, számos új biológiai szert fejlesztettek ki, és kezdték el alkalmazásukat az utóbbi években a közepes és súlyos fokú pikkelysömör terápiájában. Ilyen, már a klinikai gyakorlatban is használt szerek a tumor nekrozis faktor (TNF) gátlók: egy LFA-3 fúziós protein, amely a bőrt infiltráló T-sejtek aktivációját akadályozza azáltal, hogy a T-sejtek CD2 receptora és az antigén prezentáló sejtek LFA-3 receptora közötti kostimulációs kapcsolatot gátolja, valamint egy monoklonális ellenanyag, amely a T-sejtek LFA-1 (CD11a) receptorához kötődve a T-sejtek bőrbe jutását és aktivációját gátolja. A fentiek jól szemléltetik, hogy a pikkelysömör immunológiai hátterének kutatása olyan nagy

menységű értékes adatot szolgáltatott a betegség pathomechanizmusáról, hogy azokra alapozva új, már a klinikumban használatos szerek fejlesztésére is sor kerülhetett.



2.2.1/1 ábra. A pikkelysömör változatos klinikai képpel megjelenő multifaktoriális bőrgyógyászati kórkép. (A) I-es típusú ún. guttált pikkelysömör, amelyre jellemző a fiatalkori megjelenés. (B) II-es típusú ún. plakkos pikkelysömör, amely inkább idősebb korban, 40 éves kor felett jelentkezik.



2.2.1/2 ábra. A pikkelysömör betegsége jellemző hám hiperproliferáció feltételezett mechanizmusa. A dermiszben és az epidermiszben kórosan jelen levő T-sejtek limfokinekét: interferon- γ -t (IFN- γ), interleukin-3-t (IL-3), granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktort (GM-CSF) termelnek és bocsátanak ki, amely a bazális membránon (BM) ülő őssejtek aktiválásához vezet, a sejtek nyugalmi fázisból (G_0) kilépve osztódni kezdenek (M).

A pikkelysömör öröklődésének első rendszerezett feldolgozását 1963-ban Donald C. Abele (Abele és mtsai, 1963) és munkatársai közzölték, akik egy nagy észak-karolinai betegpopuláció, több érintett család adatainak feldolgozása alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a betegség hátterében álló (akkor még teljes mértékben ismeretlen) genetikai faktorok penetranciája megközelítőleg 60%-os.

A pikkelysömörre való hajlam és bizonyos Humán Leukocita Antigen (HLA) génvariációk közötti összefüggés már a hetvenes évek eleje óta ismert. Thomas J. Russell és munkatársai (Russell és mtsai, 1972) számoltak be róla, hogy a HLA-B13 allél szignifikánsan magasabb arányban fordul elő a pikkelysömörös betegek között, mint az egészséges populációban: míg előzőek körében 27%, utóbbiak között csupán 3% arányban fordul elő. Az azóta eltelt több mint harminc év igen intenzív, több kontinensen párhuzamosan folyó HLA-asszociációkkal kapcsolatos kutatásai egyértelműen abba az irányba mutatnak, hogy a pikkelysömörre való hajlam kialakításáért felelős egyik alapvető fontosságú gén (vagy gének) a humán 6. kromoszóma rövid karján (6p21.3), a szöveti összeférhetőséget meghatározó fő hisztokompatibilitási génkomplexben (MHC) található

(Balendran és mtsai, 1999). Ezt a lókuszt a pikkelysömörrel foglalkozó irodalom PSORS1 (psoriasis susceptibility 1) néven említi, és a régió génjeinek azonosításával és a géneken belül található polimorfizmusok jellemzésével közelebb kerülhetünk a pikkelysömörre való hajlam genetikai hátterének megértéséhez. Az utóbbi évek egyik nagy áttörését jelentette az a Nair és munkatársai által közölt eredmény (Nair és mtsai, 2006), amely a PSORS1 régióon belül a pikkelysömörre való hajlam kialakítását egyértelműen a HLA-Cw6 allélhoz tudta kötni.

A PSORS1-en kívül mindeddig kilenc olyan lókuszt (PSORS2-10) azonosítottak a humán genomban, amely feltehetően szerepet játszik a pikkelysömörre való hajlam kialakításában. Ezeket a szakirodalom nem-MHC pikkelysömör lókuszeknek nevezi, elkülönítendő a PSORS1 lókusztól (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> OMIM #177900) Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a PSORS1 lókuszt pikkelysömörrel való asszociációját (függetlenül a vizsgált populációtól) mindeddig minden tanulmány igazolni látszott, a PSORS2, PSORS4 és PSORS6 lókuszek esetében legalább két független tanulmány adatai utalnak ezek szerepére a betegség pathomechanizmusában. A többi lókuszt esetében további független vizsgálatokat igényel pikkelysömörrel való asszociációjuk igazolása.

A pikkelysömörrel kapcsolatos genetikai és immunológiai kutatások évtizedeken keresztül egymással párhuzamosan folytak. Az immunológiai kutatások célja a betegség kialakításában szerepet játszó immunológiai eltérések azonosítása volt, míg a genetikai vizsgálatok elsősorban a hajlamosító genetikai lókuszek azonosítására fókuszáltak. A két kutatási irány mindeddig kevés ponton találkozott. Az elmúlt néhány év kutatásai azonban megmutatták, hogy a Th17 sejtek érésében szerepet játszó IL-23R a klasszikus genetikai térképezések által azonosított PSORS7 lókuszon belül található és az azt kódoló génen azonosított polimorfizmusok egyértelműen szerepet játszanak a pikkelysömörre való hajlam kialakításában (Cargill és mtsai, 2007). A felismerés hamarosan a klinikumban is hasznosul a pikkelysömörös betegek javára, mivel igen ígéretesek azoknak a klinikai kísérleteknek az eredményei, amelyekben az IL-23 ellenes ellenanyaggal blokkolják a pikkelysömörben megfigyelhető kóros IL-23/IL-23R/Th17 axis működését (Menter és mtsai, 2008).

A klasszikus genetikai kapcsoltsági analízisek mellett sok értékes adatot szolgáltatnak a pikkelysömörre való hajlam kialakításáról azok a vizsgálatok, melyek a

tünetek kialakulásáért felelős kóros citokin környezet háttérében álló eltéréseket kutatják. Ismert, hogy a pikkelysömörös tünetes bőrben egyes citokinek, úgy, mint a tumor nekrozis faktor α (TNF- α) és az interleukin-1 β (IL-1 β) magasabb szinten, míg más citokinek, úgy, mint az antiinflammatorikus hatású interleukin 10 (IL-10) és az interleukin 1 receptor antagonistá fehérje (IL1-RA) alacsonyabb szinten fejeződnek ki. A pikkelysömör pathomechanizmusában szerepet játszó citokin gének polimorfizmusai befolyásolhatják a citokin termelést, ezzel hozzájárulva a betegség kialakításában szerepet játszó kóros citokin környezethez. Több száz pikkelysömörös beteg és egészséges kontroll egyén TNF- α , IL-1- β és IL1-RA polimorfizmusainak összevetése igen érdekes eredményeket szolgáltatott. A TNF- α , gén G-238A polimorfizmusa emelt szintű TNF- α produkcióhoz vezet, és szignifikáns asszociációt mutat az I. típusú, fiatalkori pikkelysömörré való hajlammal, érdekes módon elsősorban a férfi betegekben (Reich és mtsai, 2002). Ezzel szemben az IL-1 β gén C-511T polimorfizmusa a II. típusú, negyven év felett jelentkező pikkelysömörrel mutatott asszociációt. *In vitro* kísérletekben ez a polimorfizmus emelt szintű IL-1 β fehérje expressziót eredményez, összehasonlítva a vad típusú alléllal. Az antiinflammatorikus hatású IL-10-ről régóta ismert, hogy fontos szerepet játszik a pikkelysömör pathomechanizmusában. Az IL-10 gén promóter régiójában számos polimorfizmust írtak le, amelyek két mikroszatellitával jellemezhetők, IL10.G és IL10.R. hetvennyolc pikkelysömörös beteg és nyolcvan egészséges kontroll egyén adatainak összevetéséből a következő eredmény született: a két allél eloszlásában nem találtak szignifikáns különbséget a beteg és az egészséges populáció összevetésekor, ellenben, amikor a pikkelysömörös betegpopuláción belül vizsgálták a két mikroszatellita allél frekvenciáit, akkor az IL10.G13 allél I. típusú, családi halmozódást mutató, fiatalkori pikkelysömörrel való szignifikáns asszociációját találták. Ezek alapján feltételezik, hogy az IL10 lokusz szerepet játszik a pikkelysömörré való hajlam kialakításában (Asadullah és mtsai, 2001).

A pikkelysömörré hajlamosító genetikai faktorok azonosításának (a klasszikus genetikai asszociációs vizsgálatok és a betegség pathomechanizmusában részt vevő citokin gének polimorfizmusainak vizsgálata mellett) egy harmadik megközelítési lehetősége az ún. nagyskálájú génexpressziós vizsgálat. Alapvetően kétfajta módszerrel lehet nagy skálájú génexpressziós vizsgálatokat végezni. Az ún. „zárt” rendszerekben, (például a DNS chip vizsgálatokban) már ismert, általában azonosított funkciójú gének expressziójának összehasonlítása folyik, ezzel szemben az ún. „nyílt” rendszerekben lehetőség van

mindeddig nem azonosított, ismeretlen funkciójú gének expressziójának összehasonlítására különböző eredetű mintákban. Az elmúlt évtizedben megjelent számos közlemény tanúsítja, hogy mindkét megközelítési módot alkalmazták a pikkelysömörös léziókra, illetve a pikkelysömörös nem léziós epidermiszre jellemző génextpressziós változások követésére.

Anne Bowcock és munkatársai közölték a 2000-es évek elején az első átfogó tanulmányt (Bowcock és mtsai, 2001) ebben a témában, amelyben 12 ezer annotált gén expresszióját hasonlították össze egészséges és pikkelysömörös tünetes, illetve tünetmentes bőrben. 177 olyan gént azonosítottak, amely az egészséges bőrhöz viszonyítva alacsonyabb vagy magasabb szinten fejeződött ki a pikkelysömörös tünetes bőrben. Ezek közül tíz a pikkelysömörös tünetmentes bőrben is eltérő expressziót mutatott, és a már korábban azonosított PSORS lokuszok valamelyikére térképeződött. Ez az eredmény arra utalt, hogy a pikkelysömörre való hajlam kialakításában részt vevő egyes gének oly módon fejtik ki hatásukat, hogy a tünetmentes bőrben az egészségeshez viszonyítva kóros szinten fejeződnek ki mRNS szinten.

Az azóta eltelt időben számos munkacsoport számolt be hasonló jellegű cDNS chip vizsgálatról, (Kunz, 2008; Oestreicher és mtsai, 2001; Quekenborn-Trinquet és mtsai, 2005) amelyek részben megerősítették a korábbi eredményeket, részben új, a pikkelysömörben eltérő szinten kifejeződő génekről számoltak be. A fent idézett munkákban a szerzők egyöntetűen hangsúlyozzák, hogy a nagyszámú génextpressziós kísérleteknek nagy szerepe van a terápiás célpontok azonosításában.

2.2.2. A krónikus vénás elégtelenség talaján kialakuló lábszárfekély

A vénás elégtelenség talaján kialakuló lábszárfekélyt (ulcus cruris) szintén multifaktoriális bőrbetegségnek tekintjük, melynek pathogenezisében egyéni hajlamosító, életmódbeli és környezeti faktorok is szerepet játszanak. Mint a kórkép neve is mutatja, a lábszáron megjelenő és krónikusan fennálló lábszárfekélyt a vénák keringési elégtelenségének kialakulása előzi meg; az ulcus cruris tulajdonképpen a krónikus vénás elégtelenség végstádiuma.

Az ember függőleges testtartásának köszönhetően a lábszár vénáiban rendkívül magas a hidrosztatikai nyomás, az itt található vénás rendszer ez ellen a nagy hidrosztatikai nyomás ellenében dolgozva juttatja felfelé a vért. Ebben a folyamatban nagyon fontos szerepe van a vénák billentyűinek, valamint a lábszár izom-izületi pumpatevékenységének.

Krónikus vénás elégtelenség akkor alakul ki, ha az izompumpa működése elégtelen és járás közben az alsó végtag vénáiból nem ürül ki a vér. Ennek következtében állandóan fennálló hipertónia és hipervolémia alakul ki a lábszárban, és ha a nyirokrendszer kapacitása kimerül és/vagy valamilyen úton sérül, nem tudja elszállítani az extracelluláris térbe kilépő fehérjedús folyadékot, végül tartós ödéma keletkezik. Statisztikai adatok szerint a lakosság 3-5%-a érintett krónikus vénás elégtelenségben és 1%-a az annak talaján kialakult lábszárfekélyben. A krónikus vénás elégtelenség által érintett végtagban számos olyan pathofiziológiás folyamat zajlik le (endotél sérülése, kapillárisok elzáródása, a fehérvérsejtek aktiválása hipoxia következtében, majd kilépésük az intersticiális térbe), amely következményesen lábszárfekély kialakulásához vezet. Ez bekövetkezhet trauma hatására, hirtelen, vagy ekzema talaján, jóval lassabban. A fekély széle általában lépcsőzetes, alapja lepedékkel fedett. A fekélyek területén és a fekély környékén a gyulladt, nedvező bőrfelületet gyakran baktériumok fertőzik felül, amely további nehézséget okoz az életminőséget nagyban lerontó krónikus bőrgyógyászati kórkép kezelésében.

A krónikusan fennálló lábszárfekély kezelése igen hosszadalmas, gyakran figyelhető meg terápia rezisztencia. Vénás eredetű lábszárfekélynél nagyon fontos a kompressziós kötés, amelynek célja az, hogy segítse az izom-ízületi pumpa munkáját és megszüntesse fekély kialakulását előidéző krónikus ödémát. Magának a sebnek a kezelése a fekély aktuális állapotához kell igazodnia. A fekélyben a normál sebgyógyulás folyamatai sérülnek; annak érdekében tehát, hogy a kóros sebgyógyulás pathofiziológiai folyamatait megérthessük, tudnunk kell, hogy milyen sejtbológia, immunológiai és molekuláris biológiai eltérések állnak fenn a normál sebgyógyulás és a fekélyekben megfigyelhető kóros sebgyógyulás között.



2.2.1. ábra. A krónikus vénás elégtelenség talaján kialakuló lábszárfekély klinikai képe.

A normál sebgyógyulás folyamán a keratinociták, a fibroblasztok, az endotél sejtek, és professzionális immunsejtek térben és időben rendkívül szigorúan szabályozott

vándorlása, infiltrációja, proliferációja és differenciációja zajlik, melyet három fő szakaszra osztunk: exsudatív, vagy más néven gyulladós, granulációs és epitelizációs szakaszokra. A krónikusan fennálló sebeknél tulajdonképpen a gyulladós folyamat perzisztál, a kezelés folyamán tehát az itt fennálló kóros folyamatok megszüntetésére kell törekedni, majd a granulációs és epitelizációs fázisokat modern sebkezelési eljárásokkal segíteni.

A normál sebgyógyulás folyamatában a professzionális immunsejtek nagyon fontos szerepet játszanak (Park és Barbul, 2004), mára már jól ismert, hogy az egyes fehérvérsejt alpopulációk mikor és milyen módon vándorolnak be a sebzés helyére, és ott hogyan fejtik ki hatásukat, milyen citokineket, limfokineket és növekedési faktorokat termelnek. A gyulladós fázis legelején (a sebzést követő 24 óra elteltével) a neutrofilek száma a legnagyobb, elsődleges szerepük a fagocitózis, de a neutrofil növekedési faktor (NGF) és granulocita/makrofág kolónia-stimuláló faktor (GMC-SF) termelésükkel is hozzájárulnak a sebgyógyulás folyamatához (Canturk és mtsai, 2001). Ezt követően a makrofágok száma emelkedik meg a gyulladós szakasz közepe-vége felé (a sebzést követő 48-96 óra elteltével). A makrofágok által termelt TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- α és TGF- β , platelet eredetű növekedési faktor (PDGF), valamint inzulin-szerű növekedési faktor (IGF-1) rendkívül fontos szerepet játszanak az endotél sejtek és fibroblasztok proliferációjának, az angiogenezisnek és a kollagén szintézisnek a szabályozásában (Gallucci és mtsai, 2001; Hankenson és mtsai, 2000; Kovacs és DiPietro, 1994; Roesel és Nanney, 1995; Wei és mtsai, 2001). Végül a gyulladós fázis végén, amikor a sebgyógyulás folyamatában alapvető szerepet betöltő fibroblasztok proliferálnak és vándorolnak, a limfociták számának nagyarányú növekedése figyelhető meg (a sebzést követő 4-6 nap elteltével). Számos közlemény utal rá, hogy a T-limfociták szerepet játszanak a normál sebgyógyulásban, míg a B-limfociták esetében ilyen adatunk nincs (Boyce és mtsai, 2000).

A normál sebgyógyulás folyamatában azonban nem csak a professzionális immunsejtek által termelt citokinek játszanak fontos szerepet, hanem a keratinociták és a fibroblasztok által termelt faktorok is. A keratinociták proliferációja és migrációja rendkívül fontos a sebgyógyulás re-epitelizációs fázisában. Ebben a folyamatban egy összetett kettős parakrin szabályozási rendszer is részt vesz: sebzés hatására az epidermális keratinociták IL-1 α -t és β -t kezdenek termelni, amely lejut a dermiszbe. A dermiszben az IL-1 α és β a fibroblasztok FGF-7(=KGF-1) és FGF-10(=KGF-2) termelését indukálja. Az FGF-7 és FGF-10 az epidermiszbe jutva a keratinociták proliferációját serkentik, oly

módon, hogy az FGFR-2 receptor család IIIb variánsához, a keratinocita növekedési faktor receptorhoz (KGFR) kötődnek (Maas-Szabowski és mtsai, 2001).

A sebgyógyulás rendkívül összetett folyamatában számos sejttípus és szabályozási folyamat összehangolt működésére van szükség. Ahhoz, hogy a kóros sebgyógyuláshoz vezető pathogenetikai tényezőket minél alaposabban megismerhessük, a sebgyógyulást szabályozó gének működését is tanulmányoznunk kell. Mivel ismert, hogy a vénás eredetű lábszárfekélyre való hajlam családi halmozódást mutat, feltételezzük, hogy a sebgyógyulásban szerepet játszó gének polimorfizmusai is hozzájárulnak a kóros sebgyógyulás kialakításához. A vénás eredetű lábszárfekélyre hajlamosító genetikai faktorok azonosítása nem tekint vissza hosszú múltra. A témában közölt korai közlemények elsősorban a véralvadásban szerepet játszó faktorokat kódoló géneket vizsgálta, és azonosított egy-egy polimorfizmust a protrombin (Jebeleanu és Procopciuc, 2001) és a XIII. véralvadási faktor (Gemmati és mtsai, 2004) géneken, amelyek a kórkép kialakulására hajlamosítanak. Egy angol munkacsoport az ösztrogén receptor (ER) gének polimorfizmusait vizsgálta vénás eredetű lábszárfekélyben. Választásuk azért esett erre a receptor családra, mert ismert, hogy az ösztrogénnek fontos szerepe van a bőr integritásának fenntartásában (Brincat, 2000) és a normál sebgyógyulás folyamatában (Ashcroft és mtsai, 1997; Ashcroft és mtsai, 1999). Klinikai tapasztalatok szerint a menopauzában lévő nők hormonpótló kezelése megakadályozza a vénás eredetű lábszárfekély kialakulását is (Berard és mtsai, 2001; Margolis és mtsai, 2002). Az angol csoport eredményei szerint az ER β egyik CT dinukleotid ismétlődésekből álló mikroszatellita markere, amely a receptor gén expresszióját is befolyásolja, alacsony (<18) kópiaszámban a vénás eredetű lábszárfekélyre hajlamosító genetikai faktor. Ugyanezen gén promóter régiójában azonosítottak egy haplotípust is, amely szignifikánsan magasabb arányban fordul elő a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegekben, mint egészségesekben (Ashworth és mtsai, 2005). Mint az a fentiekben már említésre került, a TNF- α fontos faktor a normál sebgyógyulás folyamatának szabályozásában (Babbar és mtsai, 2006; Crist és mtsai, 2004). Egy ausztrál munkacsoport kimutatta, hogy a TNF- α szintje alacsonyabb a terápia rezisztens fekélyekben, mint azokban, amelyekben a sebgyógyulás folyamata lezajlott (Wallace és Stacey, 1998). Ezt követően megvizsgálták, hogy vannak-e a TNF- α génnek olyan polimorfizmusai, amelyek a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek csoportjában magasabb arányban fordulnak elő, és hajlamosító genetikai faktorként szerepelnek a kórkép kialakulásában ill. felelősek lehetnek a TNF- α alacsonyabb szintjéért a sebváladékban. Wallace és munkatársai arra az

eredményre jutottak, hogy a TNF- α gén -308 pozícióban levő polimorfizmusa (G/A SNP) a vénás eredetű lábszárfekélyre hajlamosító faktor.

Elhatároztuk, hogy az ausztrál munkacsoport által talált összefüggést magyar populáción is igazoljuk, oly módon, hogy az egészségesek és a fekélyes betegek csoportjait normál testalkatúakra és obezekre választjuk szét, sztratifikáljuk, majd az így keletkezett alcsoportokon belül vizsgáljuk a TNF- α gén -308 A allél eloszlását. Vénás eredetű lábszárfekélyben végzett kutatásaink másik részében az FGFR2-IIIb (=KGFR) polimorfizmusait, valamint az azzal funkcionális kölcsönhatásban álló szindekán-4 és neurofilin-1 kifejeződését is tanulmányoztuk.

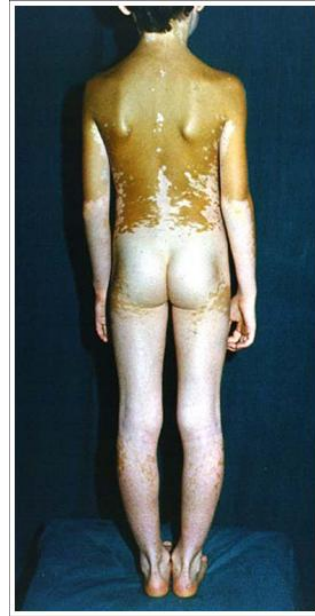
2.2.3. A festékhányos bőrbetegség

A festékhányos bőrbetegség, a vitiligo a lakosság megközelítőleg 1-1.5%-át érintő multifaktoriális bőrgyógyászati kórkép. A vitiligo során a bőr foltokban veszíti el pigmentációját, s ezeken a helyeken teljesen pigment mentes, fehér lesz. A vitiligo tünetei bármely életkorban jelentkezhetnek. A foltok ritkán maradnak állandó méretűek, általában lassú növekedést mutatnak, amely néha évekre, vagy véglegesen megáll, azonban néha rohamossá válik, ritka esetben a teljes testterületre szétterjed és teljes pigment vesztést okozhat. A foltok a test bármely pontján megjelenhetnek, de leggyakrabban a kezeken (2.2.3/1 ábra, A panel), a végbél és a nemi szervek környékén, arcon keletkeznek először. Gyakran lehet megfigyelni, hogy a foltok elhelyezkedése a test két oldalán nagyjából szimmetrikus (2.2.3/1 ábra, B panel), valamint hogy a pigment hiányos foltban a szőrzet is elveszti színét. A vitiligós betegek megítélése szerint pigment hiányos foltjaik megléte életminőségük nagyfokú leromlásához vezet, egyes társadalmakban nem ritka a betegek stigmatizációja sem.

A vitiligo betegség pathomechanizmusának kutatása során igen korán fény derült arra, hogy a tünetek által érintett területeken nem csupán a melanin pigment hiányzik, hanem az azt termelő melanociták sincsenek jelen (Norris és mtsai, 1994). A vitiligót jelenlegi ismereteink szerint autoimmun betegségnek tekintjük (van den és mtsai, 2001). Ezt támasztják alá azok az eredmények is, miszerint a vitiligós betegek szérumában jóval nagyobb arányban lehet melanocita ellenes ellenanyagokat detektálni, mint azokban az egészséges egyéneknél, akiket nem érintett a betegség.



2.2.3/1 ábra. A vitiligo klinikai képe. A vitiligo tünetei kézfejen. A vitiligo tünetei testszerte jelentkezhetnek és elrendeződésük gyakran szimmetrikus a két testfélén.



(Ongenaes és mtsai, 2003). Autoreaktív T sejtek szerepét is bizonyították a vitiligo pathogenezisében (Chow és mtsai, 2005). A vitiligo betegség immunmediált voltát erősítik azok a klinikai megfigyelések is, amelyek szerint a kórkép előfordulása jóval gyakoribb olyan betegek körében, akik egyéb autoimmun betegségeken (hyperthyroidismus, alopecia areata és perniciosus anemia) szenvednek; valamint az a tény, hogy a bőr externákkal történő immunszuppresszív kezelése nem csupán a betegség progresszióját csökkentik, hanem a már érintett bőrterületek pigmentáltságát is képesek helyreállítani bizonyos mértékig. A vitiligo által érintett bőrterületeken nem lehet gyulladást megfigyelni, amely arra utal, hogy a melanociták apoptózis, és nem nekrozis révén pusztulnak el (Kanduc és mtsai, 2002). Ruiz-Argüellas és munkatársai (Ruiz-Argüelles és mtsai, 2007) közelmúltban megjelent cikkükben demonstrálták, hogy a vitiligós betegek szérumból származó IgG ellenanyagok penetrálnak a tenyésztett melanocitákba és azok apoptózisát indukálják, míg az egészséges egyénekből származó IgG ellenanyagok nem voltak rájuk ilyen hatással.

A fent ismertetett eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a vitiligo immunmediált betegség. Ismert azonban az is, hogy a vitiligós betegek megközelítőleg 30-40%-a számol be arról, hogy családtagjai között is előfordul ez a bőrbetegség, azonban a kórkép nem mutat mendeli öröklődés menetet. Mindez felvetette annak lehetőségét, hogy a vitiligo egy poligénesen meghatározott, immunmediált multifaktoriális bőrbetegség. Világszerte számos kísérletes bőrgyógyászattal foglalkozó kutatólaboratóriumban végeztek genomikai vizsgálatokat a vitiligóra hajlamosító polimorfizmusok meghatározására.

Érdekes megemlíteni, hogy a polimorfizmus vizsgálatok igen jelentős részét olyan országokban végzik (India, Törökország, Korea, Kína), ahol a populáció pigmentációja sötétebb, mint a kaukázusi populációban, és sajnálatos módon ezekben a társadalmakban a vitiligós betegek számottevő stigmatizációnak is ki vannak téve. Tekintve, hogy a vitiligo autoimmun eredetét számos tény bizonyítja, a polimorfizmus vizsgálatok döntő hányadát immunszabályozást végző fehérjéket kódoló géneken végezték.

Az első ilyen témájú közlemény 2005-ben látott napvilágot, melyben Blomhoff és munkatársai (Blomhoff és mtsai, 2005) a citotoxikus T limfocita asszociált antigén-4 (CTLA-4) gén egy RNS érést befolyásoló polimorfizmusáról megmutatták, hogy mutáns allélja az egyéb autoimmun betegséggel is társuló vitiligóval asszociáltan fordul elő, de önmagával a vitiligóval nem. Egy amerikai munkacsoport öt másik polimorfizmust vizsgált vitiligóban ugyanezen a génen, és nem találtak asszociációt (Laberge és mtsai, 2008), míg egy török munkacsoport a közelmúltban számolt be arról, hogy a CTLA-4 gén +49 jelű polimorfizmusát vitiligóra hajlamosító genetikai faktornak találták (Pehlivan és mtsai, 2009).

Különböző populációkon (francia, amerikai, román és indiai) vizsgálatok eredményei egymást erősítve utalnak arra, hogy a limfoid protein tirozináz foszfatáz (PTPN22) gén R620W aminosav cserét okozó polimorfizmusa a vitiligo betegséggel asszociált, és hajlamosít a kórkép kialakulására (Canton és mtsai, 2005; Laberge és mtsai, 2008; Laddha és mtsai, 2008; Wipff és mtsai, 2006). Egy szintén közelmúltban megjelent közlemény szerint szaudi populációban az IL-10 gén három promóter polimorfizmusát találtak magasabb allél frekvenciával a vitiligós betegek körében, mint az egészségesek között, ami alapján a szerzők feltételezték azok vitiligóban betöltött pathogenetikai szerepét (Abanmi és mtsai, 2008).

A kilencvenes évek közepe óta ismert az is, hogy a vitiligós betegek bőrében, mind a depigmentált, mind a normál pigmentáltságú területeken, a hidrogén peroxid (H_2O_2) mennyisége emelkedett, valamint hogy a kataláz enzim mennyisége csökkent az egészséges egyének bőrével összevetve (Maresca és mtsai, 1997), amely felveti az oxidatív stressz pathogenetikai szerepét is. Ezt a gondolatmenetet követve számos kutatócsoport vizsgálta az oxidatív stressz által indukált gének polimorfizmusait vitiligóban. Az első ilyen jellegű közlemény 2002-ben látott napvilágot és igazolta, hogy a kataláz gén 9. exonjában található kodon 389 C/T polimorfizmus mutáns allélja szignifikánsan magasabb arányban detektálható észak-amerikai, kaukázusi nagyrasszhoz tartozó vitiligós betegek körében, mint egészségesek között (Casp és mtsai, 2002). A fenti asszociációt koreai (Park

és mtsai, 2006), indiai (Em és mtsai, 2007) és brit (Gavalas és mtsai, 2006) populáción is sikerült igazolni; a brit szerzők azonban kétségeiket fejezték ki afelől, hogy a polimorfizmusnak direkt pathogenetikai szerepe lenne vitiligóban, mivel az nem okoz aminosav változást a kataláz fehérjében. A glutation S-transzferáz (GST) enzim M izoformájának polimorfizmusa (GSTM1), amely egy teljes enzimaktivitás vesztéssel járó deléció, szintén magasabb arányban fordul elő koreai vitiligós betegek körében, mint egészségesekben (Uhm és mtsai, 2007) ezen esetben okkal feltételezhetjük a polimorfizmus direkt pathogenetikai szerepét is. Egy közelmúltban közzétett munka eredményei szintén arra utalnak, hogy az oxidatív stressz kivédésében szerepet játszó mechanizmusok vitiligóban abberáns módon működnek. Egy kínai munkacsoport az NF-E2-related factor2 (Nrf2) gén polimorfizmusait vizsgálta és azt találta, hogy a gén promóterének -650 nukleotid pozíciójában levő polimorfizmusa szignifikánsan magasabb mutáns allélfrekvenciával fordul elő vitiligóban (Guan és mtsai, 2008). Az NRF2 egy transzkripciós faktor, amely számos antioxidáns hatású, ill. a sejtek detoxifikálását végző fehérjét kódoló gén expresszióját szabályozza.

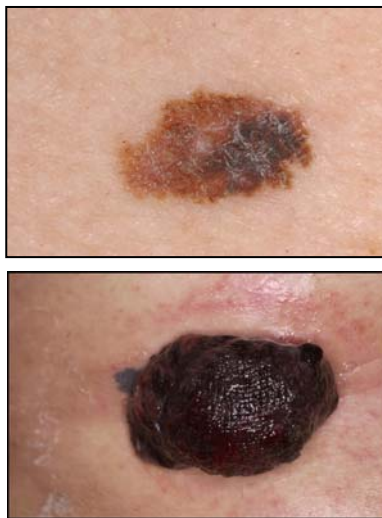
Az immunszabályozásban és az oxidatív stressz kivédésében szerepet játszó géneken kívül történtek még vizsgálatok abba az irányba is, hogy az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) egy autoimmun betegségekre hajlamosító polimorfizmusának szerepét tisztázzák vitiligóban: egy koreai munkacsoport megerősítette (Jin és mtsai, 2004b), míg más szerzők (Akhtar és mtsai, 2005; Dwivedi és mtsai, 2008; Pehlivan és mtsai, 2009) elvetették ezt a felvetést.

A humán pigmentáció kialakításáért felelős gének polimorfizmusait vitiligóban szintén egy koreai munkacsoport tanulmányozta elsőként. A melanokortin-1 receptor (MC1R) és az agouti signaling protein (ASIP) géneket vizsgálták, és egyiket sem azonosítottak olyan polimorfizmust, amelynek mutáns allél frekvenciája szignifikánsan eltért volna az egészségesek és a vitiligós betegek között (Na és mtsai, 2003). Mivel ismert (Harding és mtsai, 2000), hogy a humán nagyraszok között milyen nagy eltérések vannak az MC1R polimorfizmusok mutáns allél frekvenciájában, nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a kaukázusi populációban bizonyos MC1R allélok szerepet játszanak a vitiligo pathogenezisében.

2.2.4. A melanoma

A melanoma a bőr és a nyálkahártyák melanocitáinak tumoros transzformációja révén alakul ki, és az egyik legrosszabb indulatú daganat. Az elmúlt évtizedekben incidenciája világszerte, így Magyarországon is rohamosan nőtt. Ennek köszönhetően a bőrgyógyászati kutatások egyik legkiemeltebb témája a melanoma kialakulására hajlamosító genetikai, életmódbeli és környezeti faktorok azonosítása, a melanoma pathomechanizmusának, áttétképzésének megértése és minél korszerűbb terápiás eljárások kidolgozása.

A melanoma az érett felnőttkor betegsége, de sajnálatos módon egyre gyakrabban diagnosztizálják fiatalokban is. A melanoma betegség túlélése szempontjából rendkívül fontos a minél korábbi felismerés és sebészi eltávolítás, mivel csak így van rá esély, hogy az áttétképzés előtt eltávolítsák a daganatot. A bőrgyógyász szakma igen sok melanoma altípust különít el, ezek közül két jellegzetes megjelenési formát, a szuperficiálisan terjedő és (2.2.4/1 ábra, A panel) a noduláris melanomát (2.2.4/1 ábra, B panel) mutatom be.



2.2.4/1 ábra. A melanoma malignum két jellegzetes altípusának megjelenése. Felül: Szuperficiálisan terjedő melanoma; Alul: Noduláris melanoma



2.2.4/2 ábra. Atípusos anyajegy szindróma. A jellegzetes pigmentált léziók általában pubertáskorban jelennek meg.

A melanoma szintén multifaktoriális betegség, amely genetikai predisponáló, életmódbeli és környezeti faktorok együttes hatására alakul ki. A melanoma megbetegedésben nagy szerepe van annak, hogy a bőrt milyen mértékű fénykárosodás éri, ebből a szempontból a legkárosabb a kisgyermekkorban elszenvedett napégés. A bőr fényvédelme ezért minden életkorban nagyon fontos, de kiemelkedő jelentőségű a kisgyerekek esetében.

A melanoma kialakulhat ép bőrön (ez adja az esetek több mint 50%-át), vagy a bőr már meglévő pigmentált elváltozásának talaján, ezért a bőr pigmentált lézióinak egy részét melanoma predisponáló faktoroknak tekinti a bőrgyógyász szakma. Különösen nagy kockázatot jelent az úgynevezett atípusos anyajegy szindróma megléte. Ez a szindróma gyakran mutat családi halmozódást, jellemzően a pubertáskorban jelennek meg testszerte a jellegzetes anyajegyek (2.2.4/2 ábra). Mivel a bőrnek ezek a pigmentált léziói kifejezett kockázatot jelentenek a melanoma kialakulására, azokban a családokban, ahol atípusos anyajegy szindróma fordul elő, számolni kell az ún. familiáris melanoma kockázatával is. Ezt a tünet együttest nevezi a bőrgyógyász szakma Familiáris Atypical Multiple Mole and Melanoma (FAMM) szindrómának. A familiáris melanoma esetében egyértelmű a nagy penetranciájú genetikai háttér megléte, ezzel ellentétben az ún. sporadikus melanoma kialakulásához jóval kisebb penetranciájú hajlamosító genetikai faktorok járulnak hozzá.

Napjainkra elfogadottá vált és kísérletes adatok sora bizonyítja, hogy a familiáris melanoma háttérében általában kis gyakorisággal előforduló nagy penetranciájú allélok állnak, míg a sporadikus melanoma poligénesen kialakított multifaktoriális kórkép (Nelson and Tsao, 2009). Familiáris melanomát halmozottan mutató családok genetikai kapcsoltsági vizsgálatai felderítették, hogy a kórképerért elsősorban a ciklin dependens kináz 2A (CDKN2A) gén mutációi a felelősek (Cannon-Albright és mtsai, 1992); néhány familiáris melanomás család esetében a ciklin dependens kináz 4 (CDK4) (Soufir és mtsai, 1998; Zuo és mtsai, 1996) és a retinoblastoma (RB1) gének (Chin és mtsai, 2006) mutációit azonosították predisponáló genetikai faktorként. A legnagyobb irodalma a CDKN2A gén familiáris melanomában betöltött pathogenetikai szerepének van. A lókuszt azonosítása a 90-es évek elején történt, az azóta eltelt időben világszerte több ezer familiáris melanomát halmozottan mutató család vizsgálatával a CDKN2A génen több mint 100 melanomára hajlamosító mutációt azonosítottak, melyeket a Human Gene Mutation Database internetes oldalon tartanak számon (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

A nagy penetranciájú, familiális és primér multiplex melanomát okozó CDKN2A mutációk azonosításán kívül nagy figyelem fordul a sporadikus melanoma kialakulására hajlamosító, kisebb penetranciájú polimorfizmusok azonosítására is. Számos tapasztalati tény szól amellett, hogy a bőr és a szervezet immunfunkciói befolyásolják a melanomára való hajlam kialakulását. Az egyik igen fontos melanoma kockázati tényező például, ha a csecsemő vagy kisgyermek még éretlen immunfunkciójú bőrét komoly fénykárosodás éri. A klinikai gyakorlatból az is jól ismert, hogy a szervtranszplantált egyéneknél az

immunszuppresszív kezelések következtében a bőrdaganatok, így a melanoma kockázata is megnő (Laing és mtsai, 2006; Penn, 1984).

Az elmúlt néhány évben számos olyan közlemény látott napvilágot, amely az immunregulációban szerepet játszó citokin és citokin receptor géneken azonosított melanomára hajlamosító polimorfizmusokat. Howell és munkatársai (Howell és mtsai, 2001) az IL-10 promoter régióan azonosítottak egy haplotípus, amely a gén alacsonyabb szintű expresszióját okozza és hajlamosító faktor melanomára. Egy másik tanulmány szerint a TNF- α , IFN- γ és IL-6 gének alacsony expresszióját okozó polimorfizmusai szintén szerepet játszhatnak a melanoma pathogenezisében (Nikolova és mtsai, 2008).

A közelmúltban egy német kutatócsoport (Figl és mtsai, 2008) számolt be arról, hogy a melanoma prognózisát a DNS javításban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének polimorfizmusai befolyásolják. Az XRCC1 és APEX1 nukleotid excíziós repair gének polimorfizmusainak asszociációját vizsgálták a betegek túlélésével (overall survival/OS), metasztázis mentes túlélésével (metastasis-free survival/MFS), valamint az első áttétet követő túléléssel (survival following the first metastasis/SFM) összefüggésben. Eredményeik szerint az XRCC1 gén R399Q aminosav cserét okozó polimorfizmusa homozigóta mutáns formában szignifikáns asszociációt mutatott a melanomás betegek OS értékével. Az XRCC1 gén egy promóter polimorfizmusáról (-77 T/C) pedig azt mutatták meg, hogy a CC genotípus csökkenti a túlélést a metasztázissal rendelkező betegek esetében (SFM), viszont nincs hatással a metasztázis mentes túlélésre (MFS). A -77 T > C polimorfizmus az XRCC1 gén Sp-1 faktor kötőhelyét érinti, és a polimorfizmus hatására a gén transzkripció aktivitása csökken (Hao és mtsai, 2006). A szerzők az eredmények alapján úgy értékelik, hogy a DNS javító apparátus géneinek polimorfizmusai feltehetően befolyásolják a melanoma betegség kimenetelét, a polimorfizmusok ismerete prognosztikai faktorként is szolgálhat, és elősegítheti a személyre szabott terápiák kialakítását.

A sporadikus melanomára hajlamosító genetikai faktorok kutatása igen korán kiterjedt a humán pigmentációt szabályozó génekre, elsősorban a rendkívül polimorf MC1R génre. Ismert, hogy az MC1R polimorfizmusok gyakorisága és haplotípusai a Föld különböző nagyrasszaiban és azokon belül a kisebb populációkban is igen nagy változatosságot mutatnak (Harding és mtsai, 2000). Az MC1R polimorfizmusok és a melanomára való hajlam irodalma az elmúlt évek intenzív kutatásának köszönhetően igen kiterjedt; napjaink egyik törekvése, hogy a Föld különböző lokalizációiban született eredményeket meta-analízisekkel összegezze, és általános következtetéseket vonjon le a

polimorfizmusok melanoma predisponáló hatásáról (High és Robinson, 2007; Nelson és Tsao, 2009; Raimondi és mtsai, 2008).

Az MC1R polimorfizmusok és a melanomára való hajlam összefüggéseinek kutatása során azt is figyelembe kell venni, hogy ezek a genetikai faktorok alapvetően befolyásolják a humán bőr pigmentációját, tehát elképzelhető, hogy hatásuk nem közvetlenül, hanem a világos bőrszín kialakításán keresztül érvényesül a melanomára való hajlam kialakítására. Bebizonyosodott, hogy a kilenc leggyakrabban előforduló MC1R polimorfizmus közül hét önmagában is szignifikánsan hozzájárul a melanomára való hajlam kialakításához (Raimondi és mtsai, 2008), és ami kimondottan meglepő felismerés volt, az az, hogy az MC1R polimorfizmusok olyan egyének esetében is érvényesítették melanoma predisponáló hatásukat, akik sötétebb bőrszínűek (Fitzpatrick III és IV) voltak (Palmer és mtsai, 2000). Ezt a látszólagos ellentmondást feltehetően feloldják egy közelmúltban megjelent közlemény eredményei. Abdel-Malek és munkatársai (Abdel-Malek és mtsai, 2008) melanocita tenyészeteken végzett *in vitro* kísérleteikkel kimutatták, hogy két olyan MC1R allél, amely önmagában nem okoz változást az eumelanin pigment termelésben, de hajlamosító faktor a melanoma kialakulására, a sejteket érzékennyé teszi az UV okozta citotoxikus hatásokkal szemben.

Klinikánkon két melanoma malignummal kapcsolatos genomikai program fut. Az egyik keretében familiáris melanomában szenvedő betegek és családtagjaik CDKN2A mutációit és MC1R polimorfizmusait vizsgáljuk; jelen dolgozatban az eddigi legérdekesebb eredményünkről számolok be. Másik kutatási programunk keretében azt mérjük fel, hogy az újszülöttkori kékfény kezelés hogyan befolyásolja a melanoma predisponáló pigmentált léziók megjelenését. Ebben a jelenleg folyó programunkban azt is vizsgáljuk, hogy a kékfény kezelést kapott egyének milyen melanoma predisponáló citokin és citokin receptor polimorfizmusokat hordoznak és hogy ezeknek van-e hatása a pigmentált léziók kialakulására.

3. Célkitűzések

3.1. A keratinocita proliferáció szabályozásának vizsgálata multifaktoriális bőrbetegségekben

- 3.1.1. *In vitro* modellrendszer beállítása a normál humán keratinociták különböző proliferációs és differenciációs állapotainak vizsgálatára, a modellrendszer elsődleges jellemzése
- 3.1.2. Szérum faktorok, az etanol és az aceton hatásának vizsgálata a keratinociták proliferációjára
- 3.1.3. Az EDA motívumot hordozó onkofötális (EDA⁺) fibronektin szerepének vizsgálata a keratinociták proliferációjának szabályozásában, valamint a pikkelysömör pathogenezisében
- 3.1.4. A keratinocita növekedési faktor receptor (FGFR2-IIIb) kifejeződésének vizsgálata keratinocitákban és a pikkelysömör pathogenezisében
- 3.1.5. A D típusú ciklinek sejtciklus szabályozásban betöltött szerepének vizsgálata és kifejeződésük pikkelysömörben
- 3.1.6. A szindekán-4 és a neurofilin-1 expressziójának vizsgálata vénás eredetű lábszárfekélyben

3.2. Multifaktoriális bőrbetegségekre hajlamosító polimorfizmusok azonosítása és vizsgálata

- 3.2.1. A melanokortin-1 receptor (MC1R) gén polimorfizmusainak vizsgálata vitiligóban
- 3.2.2. Familiáris és multiplex primér melanómában szenvedő betegek genetikai vizsgálata, hajlamosító ciklin dependens kináz 2A (CDKN2A) mutációk és MC1R polimorfizmusok azonosítása
- 3.2.3. A vénás eredetű lábszárfekély kialakulására hajlamosító genetikai tényezők azonosítása

3.3. Nyílt rendszerű, nagyskálájú génexpressziós vizsgálat a pikkelysömörré hajlamosító molekuláris faktorok azonosítására; a kísérlet során azonosított PRINS mRNS-szerű nem kódoló RNS szerepének tisztázása a sejtek stresszválaszában és a pikkelysömör pathogenezisében

4. Anyagok és módszerek

4.1. Szövetminták

A kísérletekben pikkelysömörös és vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegektől vettünk szövetmintákat. A pikkelysömörös betegektől mind tünetes, mind tünetmentes bőrminták vételére sor került, míg a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegektől csak tünetmentes bőrminták vétele történt. A bőrminták vételezésére kétfajta technikát alkalmaztak a kísérletekben részt vevő orvos kollégák: ún. „punch” vagy „shave” biopsziák vételére került sor. A betegek a megfelelő felvilágosítás meghallgatása után egyeztek bele az önkéntes mintaadásba, kísérleti célokra. A mintavételek körülményei megfeleltek a helyi Etikai Bizottság előírásainak, és minden, a dolgozatban említésre kerülő vizsgálat rendelkezett a megfelelő etikai engedéllyel. A kísérletekben egészséges bőrmintákat is használtunk, amelyek a Klinika Plasztikai Sebészeti Osztályán eltávolításra került, eldobásra szánt szövetekből származtak. A minták kísérleti célból történő felhasználására is rendelkezünk a helyi Etikai Bizottság engedélyével.

Egy kísérletsorozatunkban a bőrmintákon kívül egyéb egészséges humán szövettípusokkal is végeztünk vizsgálatokat. A Szegedi Tudományegyetem Sebészeti Klinikán különböző műtéti beavatkozások során eltávolított, az alapbetegségtől nem érintett szervekből szövetmintákat gyűjtöttek a sebész kollégák. A szövetminták gyűjtéséhez is rendelkezünk a helyi Etikai Bizottság engedélyével.

A kísérleti célokra vett bőrminták ill. egyéb szövetminták vagy *in vitro* felhasználásra (keratinocita, fibroblaszt kultúra, organotipikus kultúra), vagy a megfelelő fixálási, mintatartósítási eljárást követően génexpressziós ill. fehérje expressziós vizsgálatokra kerültek.

4.2. Genomi DNS tisztítása polimorfizmus vizsgálatok céljára

Genomi DNS nyerése céljából vagy vénás vért, vagy szájnyalkahártya kenetet vettünk a kísérletekbe bevont betegektől. A mintavételekhez minden esetben rendelkezünk a helyi Etikai Bizottság engedélyével, és a vért ill. szájnyalkahártya kaparékot adó önkéntesek felvilágosítást követően egyeztek bele a mintavételekbe. A vér és szájnyalkahártya mintákat -20°C -on tároltuk felhasználásig. A vérmintákból kíttek segítségével tisztítottunk genomi DNS-t, amelyet a klasszikus proteináz K emésztéses

módszerrel (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), a Generation Capture Coloumn kit-tel (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA), vagy a QIAmp DNA Amp Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden Germany) végeztünk el.

Szájnyálkahártya mintákból a MagNA Pure Compact kit segítségével nyertük ki a genomi DNS-t.

A tisztított genomi DNS preparátumokat -20°C -on tároltuk felhasználásig. A genomi DNS preparátumaink minőségét OD_{260/280} mérésekkel ellenőriztük és polimorfizmus, ill. mutáció vizsgálatainkhoz általában 100 ng DNS mintát használtunk a PCR reakciókhoz.

4.3. Sejt- és szövettenyésztési eljárások

A dolgozatban bemutatott kísérletes munka során HaCaT immortalizát keratinociták, normál humán keratinociták és fibroblasztok tenyésztésére, valamint organotipikus bőr szövetkultúra alkalmazására került sor.

A spontán immortalizálódott *HaCaT sejtvonalat* Dr. N. E. Fusenig bocsátotta rendelkezésünkre (Boukamp és Fusenig, 1993). A sejteket sejt kultúra edényekben növesztettük (Corning Incorporated, Corning, New York, USA) magas glükóz tartalmú DMEM tápoldatban (Gibco, Eggstein, Germany), 10% borjú savóval (HyClone, Perbio, Budapest, Hungary), L-glutaminnal és egy antibiotikum/antimikotikum eleggyel (100 U/ml penicillin, 100 µl/ml streptomycinnel, és amphotericin B-vel (Sigma, Steinheim, Germany) kiegészítve. A tápoldat cseréjére minden második nap került sor.

Kísérleteink során gyakran alkalmaztuk a *HaCaT sejtek szinkronizálásának* eljárását, melynek kidolgozására kutató laboratóriumunkban került sor (Pivarcsi és mtsai, 2001). Az eljárás első lépésében hagytuk, hogy a HaCaT sejt kultúra teljesen benője a tenyésztőedény alját, majd ebben a konfluens állapotban tartottuk őket 5 napig. Ezt követően a 10% FBS-t tartalmazó tápfolyadékot lecseréltük FBS-mentes tápfolyadéokra és további 5 napig ebben tenyésztettük a sejteket. Ezt követően a HaCaT sejteket új tenyésztőedénybe passzáltuk $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ sejtsűrűséggel, a passzáláshoz 0,025 % tripszint és 0,01 % EDTA-t tartalmazó magas glükóz tartalmú DMEM tápfolyadékot használtunk. Propídium jodidos DNS festéssel bizonyítottuk, hogy a kontakt sejt növekedés gátlása és a széruméheztetés következtében sejt nyugalmi fázisba került HaCaT sejtek a passzálást követően szinkronizáltak (60-70% szinkronitási fokkal) lépnek ki a G₀ fázisból és

kezdenek el osztódni, majd differenciálódni, így jó modell rendszerként szolgálnak a keratinocita proliferáció és differenciáció tanulmányozásához.

A normál humán keratinociták izolálásának első lépéseként a bőrdarabokról eltávolítottuk a szubkután szöveteket, vékony csíkokra vágtuk, majd egy éjszakára Dispase oldatba (Grade II, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) helyeztük őket és 4°C-on inkubáltuk. A következő napon a dermiszt és az epidermiszt elválasztottuk egymástól és az epidermiszt 0,25% tripszin (Sigma, Budapest, Hungary) oldatba raktuk 30 percre és 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően egy Pasteur pipettával a sejteket szétszuszpendáltuk. Az így kapott elsődleges epidermális sejtsuszpenziót keratinocita táptalajban vettük fel (Keratinocyte Serum Free Medium, Gibco BRL, Eggstein, Germany), amelyet antibiotikus/antimikotikus oldattal is kiegészítettünk. Az epidermális sejtsuszpenziót tenyésztőedényekbe (Corning Incorporated, Corning, New York, USA) raktuk $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ sejtsűrűséggel. A sejteken minden második napon táptalajt cseréltünk. Vizsgálatainkhoz általában harmadik passzázsban levő normál humán keratinocitákat használtunk, amikor azok 70-80%-os konfluenciával nötték be a tenyésztőedényt.

Dermális *fibroblasztok* izolálásának első lépéseként a dermiszt apró darabokra vágtuk és hatlyukú tenyésztőedények aljára helyeztük őket. Három nap elteltével a fibroblasztok kivándoroltak a dermisz darabokból. Ekkor a dermisz darabokat eltávolítottuk a tenyésztőedény aljáról és a fibroblasztokat magas glükóz tartalmú DMEM táptalajban (Gibco, Eggstein, Germany) tenyésztettük, amelyet 20% borjúsavóval (HyClone, Perbio, Budapest, Hungary) is kiegészítettünk.

Bőrminták organotipikus kultúrájához „shave” biopsziákat használtunk. A szubkután szövet eltávolítását követően a bőrmintákat 2,2 µm pórusméretű cellulóz acetát/cellulóz nitrát filterekre helyeztük, majd azokat egy rozsdamentes acélhálóból készült steril hálóra, egy 25 mm² Petri csészébe. A Petri csészéket Keratinocyte-SFM (Gibco BRL) sejttenyésztő oldattal (amely 10% FBS-t, 2 mM glutamint (Gibco BRL), 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycin [Gibco BRL] tartalmazott) feltöltöttük. Indukáló faktorokként 1 ng/ml IFN-γ-t vagy 1 ng/ml IFN-γ, 1 ng/ml GM-CSF és 0.3 ng/ml IL-3 keverékét adtuk a tenyésztő táptalajhoz. A fenti összeállítás lehetővé tette, hogy a bőrmintát levegő/folyadék határfelületen tenyészük 3 napon keresztül 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában. A tenyésztést követően a bőrmintákat Dispase oldattal (Grade II, Roche Molecular Biochemicals) kezeltük egy éjszakán keresztül 4°C-on, majd az epidermiszt elválasztottuk a dermisztől. Az epidermisz mintákat Trizol reagensbe tettük és -70°C-ra lefagyasztottuk.

A fent ismertetett sejt- és szövet kultúrákat 37°C-on inkubáltuk 5% CO₂-ot tartalmazó légtermosztátban.

4.2. Polimorfizmusok vizsgálata

A dolgozatban ismertetett vizsgálatok során háromféle módszerrel azonosítottuk a humán polimorfizmusokat és mutációkat: polimeráz láncreakciót (PCR) követő szekvenálással, polimeráz láncreakció – restrikciós fragment hossz polimorfizmus (PCR-RFLP) módszerrel, valamint allél specifikus TaqMan próbával.

Polimeráz láncreakciót követő szekvenálással vizsgáltuk a melanokortin-1 receptor (MC1R) polimorfizmusait és a ciklin dependens kináz 2 (CDKN2A) gén mutációit. A humán MC1R gén (NM_002386) egy exonból áll, amelynek teljes hosszúságú PCR amplifikálása egy primer párral (5' – ggaggcctccaacgactcctcc – 3' és 5' – cagcacactaaagcgcgt – 3') megoldható volt, míg a CDKN2A gén exonjainak felszaporításához interneten elérhető Resequencing Amplicon (RSA) primereket használtuk (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/reports/probereport.cgi?uid=>). A PCR reakciók körülményeit optimalizáltuk, majd a Sigma cég RedTaq ReadyMix PCR kitjét használtuk vizsgálatainkhoz. A PCR fragmenteket tisztítottuk (PCR Kleen Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), majd megszekvenáltattuk. A szekvenciákat egymással, ill. a human konszenzus szekvenciákkal a BioEdit program (Ibis Therapeutics, Carlsbad, California, USA) segítségével hasonlítottuk.

A polimorfizmusok detektálásának egyik korszerű és nagy áteresztőképességű módszerét, az *allél specifikus TaqMan próbával* való detektálást alkalmaztuk az FGFR2 gén polimorfizmusainak vizsgálata során. A kísérletek során az Applied Biosystems cég (Foster City, California, USA) Assay-on-Demand kitjeit használtuk az öt kiválasztott SNP vizsgálatára, amelyek azonosítói a következők voltak: C__12126064_10, C__2414603_10, C__2917358_1_, C8899692_1_, C__2917245_10. A kit primer-próba elegye FAM és VIC fluoreszcens festékekkel jelölt kétféle TaqMan próbát tartalmaz, amelyek a vizsgálandó SNP nukleotidjaiban térnek el egymástól. A PCR reakciók 25 µl végtérfogatban zajlottak, reakcióelegyként TaqMan Universal PCR Master Mix-et használtunk (12,5 µl) (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), az allél megkülönböztetésre szolgáló primer-próba elegyből 1,25 µl-t használtunk reakciónként, majd a vizsgálandó genomi DNS-ből 10 ng-ot vittünk be a reakcióba 11,25 µl térfogattal. A PCR reakciókat a kit gyártójának ajánlásai alapján futtattuk: 95°C 10', majd 40 cikluson keresztül 95°C 15'' és 60°C 1' egy

valós idejű PCR készülékben (iQ5 Multicolor Real-Time Detection System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). A PCR reakciók végeztével ún. „post-run reading” leolvasási funkcióval detektáltuk a reakciókban a FAM és a VIC festékek intenzitását és ezek alapján állapítottuk meg a vizsgált minták genotípusát.

PCR-RFLP módszerrel vizsgáltuk az MC1R gén Arg160TRP aminosav cserét okozó C478T polimorfizmusát, valamint a tumor nekrozis faktor α gén (TNF α) -308 jelű promoter polimorfizmusát. Az alkalmazott primereket, restrikciós enzimeket és a detektálás módját táblázatban összesítettem.

| Vizsgált polimorfizmus | Primerek | Restrikciós enzimek | Detektálás módja |
|------------------------|---|---|--|
| MC1R/C478T | 5'-GTGGACCGTCGCTACATCTCCAT-3' 5'-CCAGCATAGCCAGGAAGAAG-3' | <i>SatI</i> (Fermantas, Vilnius, Lithuania) | Nusieve 3:1 agaróz (Cambrex, Berkshire, UK) |
| TNF α -308 | 5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' 5'-GGGACACACAAGCATCAAG-3' | <i>NcoI</i> (Fermantas, Vilnius, Lithuania) | Nusieve 3:1 agaróz (Cambrex, Berkshire, UK) |

4.4/1 táblázat. A PCR-RFLP vizsgálatokhoz használt primerek és restrikciós enzimek

Az optimalizált PCR reakciókhoz RedTaq ReadyMix-et (Sigma, Budapest, Hungary) használtunk, majd a PCR termékek egy részét közvetlenül bevittük az emésztési reakcióba. Az emésztési reakciókat agaróz gélen futtatuk, az emésztési mintázatokat rögzítettük (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), majd elemeztük.

4.3. Génexpressziós vizsgálatok

A dolgozatban bemutatott vizsgálatok során háromféle génexpressziós vizsgálati módszert alkalmaztunk. A pikkelysömörrel kapcsolatos kutatásaink során az ún. differential display nagy skálájú génexpressziós vizsgálati módszerrel dolgoztunk, egyedi gének expressziós változásait pedig reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (RT-PCR), ill. valós idejű, kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (Q-RT-PCR) vizsgáltuk.

A differential display vizsgálatához totál RNS-t izoláltunk a pikkelysömörös betegek tünetmentes epidermiszéből, valamint az egészséges egyének epidermiszéből. A differential display vizsgálatot a kísérleti módszer kidolgozói által leírt protokoll alapján végeztük el (Liang és Pardee, 1998). 200 ng totál RNS-t cDNS-sé írtunk át egy olyan 11 bp

hosszúságú primer keverék felhasználásával, amelynek utolsó bázisa eltért egymástól: H-T₁₁M, ahol M lehet G, A vagy C. A kísérlethez az RNAimage kit-et használtuk (GeneHunter Corporation, Nashville). A cDNS végtermék 2 µl-ét PCR reakcióban templátként használtuk a GeneHunter kit H-AP1 primerének felhasználásával, α[³²P]dCTP jelenlétében. A PCR reakciót a GeneHunter kit utasításai szerint végeztük el. A PCR reakciókból 3,5 µl-t mintafelvivő pufferrel vegyítettünk, majd 6% akrilamid DNS szekvenáló gélen megfuttattuk. A géleket szárítottuk, majd exponáltuk. A 2-2 pikkelysömörös és egészséges minta között konzekvens különbséget mutató csíkokat kivágtuk a gélből, 100 µl vízben felforraltuk, lehűtöttük, majd lecentrifugáltuk. A felülúszót tiszta centrifuga csőbe gyűjtöttük. Ebből a felülúszóból 4 µl-t használtunk egy újabb kör PCR reakcióra, a H-AP1 primer és a csíknak megfelelő H-T₁₁M primer felhasználásával. Az újra amplifikált PCR termékek méretét agaróz gélen ellenőriztük, majd a megfelelő méretű csíkokat kivágtuk. Alkoholos kicsapást követően az izolált fragmentek túlnyúló végeit T4 DNA polimerázzal feltöltöttük (Fermentas, Vilnius, Lithuania) és *Sma*I emésztett pSK vectorba klónoztuk T4 DNA ligáz felhasználásával (Fermentas, Vilnius, Lithuania). A differential display kísérlettel azonosított és vektorba klónozott fragmenteket ún. reverz Southern blott kísérlettel validáltuk. Ennek során a fragmenteket hordozó pSK vectorokat *Xba*I és *Xho*I enzimekkel emésztettük (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1,5% agaróz géleken futtattuk, majd a csíkokat NytranN nylon membránra blottoltuk (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). A differential display kísérlethez használt eredeti cDNS-eket (1 egészséges és 1 pikkelysömörös nem léziós minta) α[³²P]dCTP-vel radioaktívan jelöltük az RNAimage kit primereinek felhasználásával és próbaként használtuk őket. A radioaktív próbákat előhibridizálást követően az emésztett csíkokat hordozó nylon membránokra hibridizáltuk, mostuk, majd a filtereket exponáltuk. További jellemzésre, szekvenáltatásra azok a fragmentek kerültek, amelyek ebben a validálási kísérletben is különbséget mutattak a pikkelysömörös tünetmentes és egészséges epidermisz minták között.

Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR) vizsgálatainkat a következőképpen hajtottuk végre. Trizol reagens használatával totál RNS-t izoláltunk, a kézikönyv utasításait követve. cDNS átírást 1 µg totál RNA felhasználásával végeztünk, a First Strand cDNA Synthesis Kit-tel (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 20 µl-es végtérfogatban. A reverz transzkripciót követően PCR amplifikációt hajtottunk végre Taq DNS polimerázzal (Fermentas, Vilnius, Lithuania). PCR reakciókat a 2. táblázatban felsorolt specifikus primerekkel végeztünk. A PCR reakciók körülményeit minden primer

párra egyenként optimalizáltuk, általában 30 µl-es végtérfogatban dolgoztunk. A PCR amplifikátumból 10 µl-t futtattunk 1%-os agaróz gélen, a gélt etídium bromiddal festettük, fényképeztük, majd a gélképeket a Kodak Edas 290 denzitométer és a Kodak 1D Digital Science szoftver (Scientific Imaging Systems, New Haven) segítségével kvantifikáltuk. Szemikvantitatív analíziseink során mintáinkban a G3PDH és β-aktin háztartási gének kifejeződésére normalizáltunk.

| | Egyenes irányú primer | Fordított irányú primer |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| PRINS exon 2 | GGCCCAGTGAGAACTACGGAA | TCATCTGAGCTTGAGTTAATCGGC |
| fibronectin | AAGCCAATTTCCATTAATTACCGA AC | TCTCATACTTGATGATGTAGCCGGTAA |
| RAB10 | CATGAGTTTGAAAAAGGACAACG | CCATATCCTTTCTATGTACAATGCCG |
| Ciklin D1 | AGGAGAACAAACAGATCA | TAGGACAGGAAGTTGTTG |
| α5 integrin | ATTATCAGAGCAAGAGCCGGATAGA | GGAGATGAGGGACTGTAAACCGA |
| KGFR(=FGFR2-IIIb) | AGTTTAAGCAGGAGCATCGCATT | CTGTTACCACCATACAGGCGATTAA |
| β-aktin | AGAGATGGCCATGGCTGCTT | ATTTGCGGTGGACGATGGAG |
| G3PDH | ACACTCCATGCCATCACTGCC | GCCTGCTTCACCACCTTCTTG |
| PRINS 5' vég | -554 TTTAGTAAACAATCTACCGAGCAGT | -302 AAAACAAATGGTGGGCTGAG |
| PRINS 5' vég | -1141 TGCTGCAGATAATCGTTTGG | -370 CCAGCAAACCCAGCATAAGT |
| PRINS 5' vég | -1483 CCTTTTCCTTTCCGAGACAA | -1118 CAGGCCAAACGATTATCTGC |
| PRINS 5' vég | -2369 ACAGGGTTTGCCGTGTAC | -1464 TTGTCTCGGAAAGGAAAAGGA |

4.5/1 táblázat. Az RT-PCR kísérletekhez használt primerek szekvenciái

Kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (Q-RT-PCR) céljára 1 µg totál RNS-t írtunk át cDNS-sé az iScript kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) segítségével. A Q-RT-PCR reakciókat az iQ Supermix-ben végeztük (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), a reakciók valós idejű detektálása iCycler és iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) készülékekkel történt. Q-RT-PCR kísérleteink során minden esetben TaqMan próbákat, alkalmaztunk; vizsgálataink egy részében saját tervezésű primerekkel és TaqMan próbákkal (IDT, Coralville, Iowa, USA) dolgoztunk, méréseink egy részét azonban az Applied Biosystems cég (Foster City, California, USA) TaqMan Gene Expression Assays kitjeivel végeztük. A saját tervezésű primer-próba szekvenciákat, valamint a TaqMan Gene Expression Assay-k azonosító számait a 3. táblázatban összegeztem. A saját tervezésű primerekkel és próbákkal végzett PCR reakciókat egyenként optimalizáltuk, a TaqMan Gene Expression Assay-k használata során pedig a gyártó által javasolt körülményeket alkalmaztuk.

Mérési eredményeink értékelésekor relatív génexpressziós értékeket számoltunk a $2^{-\Delta\Delta CT}$ képlet segítségével (Livak és Schmittgen, 2001). A PRINS RNS abundanciájának különböző szövetekben való megállapítására kvantitatív számításokat is végeztünk és a

valós idejű RT-PCR mérések során kapott adatokat oly módon értékeltük, hogy a PRINS RNS mennyiségét fmol/ng totál RNS egységekben is megadhassuk.

| | Egyenes irányú primer | Fordított irányú primer | TaqMan próba |
|--------------|------------------------|-------------------------|--|
| PRINS exon 1 | GCATCTTCCTTGGCAAA | GCCTAAAGGACATTTCCGGTAT | 5'FAM TGC TGT TTT GGG TCC TAA CCA TC 3' Black Hole2 |
| D1 ciklin | | Hs00277039_m1 | |
| D2 ciklin | | Hs00153380_m1 | |
| D3 ciklin | | Hs00236949_m1 | |
| Neurofilin 1 | | Hs01546499_m1 | |
| Szindekán 4 | | Hs00161617_m1 | |
| FGFR2-IIIb | ACTCGGGGATAAATAGTTCCAA | CCTTACATATATATCCCCAGCAT | 5'FAM ACATTGAACAGAGCCAGCACTT 3' Black Hole2 |
| 18S | CGGCTACCACATCCAAGGAA | GCTGGAATTACCGCGGCT | 5'Texas Red TGC TGG CAC CAG ACT TGC CCT C 3' Black Hole2 |

4.5/2 táblázat. A Q-RT-PCR kísérletekhez használt primer és próba szekvenciák ill. kit azonosítók

4.4. Fehérje expressziós vizsgálatok

A dolgozatban ismertetett kísérleteinkben négyféle fehérje expressziós vizsgálati módszert alkalmaztunk: immuncitokémiai és immunhisztokémiai festéseket, Western blott analízist és áramlási citometriai méréseket. A 4. táblázatban összesítettem, hogy az egyes fehérjék detektálásához a fenti négy módszer közül melyiket használtuk, valamint ebben a táblázatban adom meg a kísérleteinkhez használt ellenanyagok adatait.

A *Western blott* vizsgálatokhoz fehérje kivonatokat készítettünk. Abban az esetben, ha a kísérleteket HaCaT keratinocitákon végeztük, a lízispuffer összetétele a következő volt: 1,5% sodium dodecyl sulphate (SDS), 62,5 mM Tris-HCl pH6,8, 5mM ethylenediamine tetracetic acid (EDTA), 5% 2-mercaptoetanol (2-ME), 1 µM/ml antipain, 1 µM/ml chimostatin, 1 µM/ml leupeptin. A puffer összetevőit a Sigma cégtől rendeltük. A sejteket felfuszpendáltuk a lízis pufferban, centrifugáltuk, majd a felülúszókat -20°C-on tároltuk felhasználásig.

Epidermisz és dermisz mintákból neurofilin-1 és szindekán-4 Western blott céljára a következő eljárással készítettünk fehérje kivonatokat. A szövetmintákat TRIzol oldatban (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) vettük fel és homogenizáltuk, majd a kézikönyv utasításait követve egy kloroformos extrakciót követően elválasztottuk az RNS-t tartalmazó vizes fázist és a fehérjéket tartalmazó fenol-kloroformos alsó fázist. Ez utóbbiból izopropil alkohollal kicsaptuk a fehérjéket, majd a csapadékot 0,3 M guanidin hidroklorid etanolos oldatával mostuk, végezetül szárítottuk. A csapadékot 100 µl, SDS-t tartalmazó vízben oldottuk fel.

A HaCaT sejtekből, valamint az epidermisz és dermisz mintákból származó lizátumok fehérje koncentrációját OD280 méréssel állapítottuk meg, majd a számított értékek alapján 10 µg fehérje kivonatot megfuttattunk 10 %-os sodium-dodecyl-sulphate-polyacrilamide (SDS-PAGE) gélen. A géleket ezt követően Coomassie Brilliant Blue (CBB) (Sigma, Budapest, Hungary) festékkel megfestettük, szárítottuk és denzitometráltuk. A denzitometrálás után kapott adatok alapján a Western blott-ra használandó fehérje mennyiségeket újra számoltuk, korrigáltuk és egy ismételt kör SDS-PAGE futtatással ellenőriztük. Western blott kísérleteinkhez a fenti eljárás során korrigált, egyenlő mennyiségű fehérje kivonatokot vittünk fel SDS-PAGE gélre. A gélek koncentrációja 8-12,5 % között változott, attól függően, hogy a detektálandó fehérje milyen molekulásúlyú volt. A gélen elválasztott fehérjéket nylon (Amersham, Buckinghamshire, England) vagy nitrocellulóz (Bio-Rad, Hercules, California, USA) membránra vittük át. Ezt követően a membránokat detergenst (0,05% Tween 20, Sigma) és 3% tejport (Fluka Chemie AG, Neu-Buchs, Switzerland) tartalmazó Tris pufferelt oldatban (150 mM NaCl, 25 mM Tris pH7,4) inkubáltuk 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Következő lépésként a membránokra a specifikus elsődleges ellenanyagot is tartalmazó Tris pufferelt oldatot tettük, és azzal egy éjszakán keresztül inkubáltuk 4°C-on. A megfelelő mosási lépések után a másodlagos ellenanyagot is Tris pufferelt oldatban raktuk a membránokra, majd 2 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Western blott kísérleteinkhez alkalikus foszfatázzal jelölt másodlagos ellenanyagokat használtunk. Az inkubálást követően mosási lépések következtek, majd a membránokat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazoliummal (BCIP/NBT) (Sigma, Budapest, Hungary) hívtuk elő.

Immuncitokémiai festéseket fibroblasztokon, HaCaT sejteken és normál humán keratinocitákon végeztünk. A sejteket speciális, sejttenyésztésre is alkalmas tárgylemez kamrákban növesztettük. A festés első lépéseként a sejteket 20 percig 2%-os paraformaldehidben (Sigma, Budapest, Hungary) fixáltuk 4°C-on, majd egy éjszakán keresztül inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal, szintén 4°C-on, egy magas páratartalmú biztosító kamrában. Izotípus kontroll festéshez egér IgG1-et (Sigma, Budapest, Hungary) használtunk, 1 µg/ml koncentrációban. Az immunfestés előhívása egy avidin-biotin immunperoxidáz kittel történt (Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA), ahol 3-amino-9-etilkarbazol szolgált kromogénként. Végül a metszeteket hematoxilinnal festettük.

Immunohisztokémiai festéseket a következőképpen végeztünk. A vizsgálatra szánt bőrmintákat egy napig formalinban fixáltuk majd paraffinba ágyaztuk. 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket szilanizált tárgylemezekre helyeztünk. A mintákból xilén kezeléssel távolítottuk el a paraffint, majd csökkenő koncentrációjú metanol és etanol oldattal rehidratáltuk őket. A metszetek endogén peroxidáz aktivitását metanol és H₂O₂ 90:3 arányú elegyével blokkoltuk. Az antigének feltárása érdekében a metszeteket 3 percig 105 °C-os termosztátban inkubáltuk, citrát pufferben (pH6), majd szobahőmérsékleten hagytuk őket lehűlni. A nem specifikus antigének blokkolását 1% BSA oldattal végeztük. Ezt követően a metszeteket az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk 30 percig, a 4. táblázatban megadott hígításokban. Annak érdekében, hogy a festés intenzitását növeljük, a metszeteket HRP polimerrel (Envision® System, DAKO, Denmark) kezeltük 30 percig. A másodlagos ellenanyaggal való reagáltatás és az immunhisztokémiai reakciók előhívása a RealEnvision® System-mel (DAKO, Denmark) történt és az előhívás során fénymikroszkóp alatt ellenőriztük a festés intenzitásának változását. Végezetül a metszeteket hematoxilinnel festettük 1 percig.

| | Western blott | Immuncitokémia | Immunhisztokémia | Áramlásos citometria |
|------------------|---|--|--|--|
| fibronectin | kecske poliklonális (ICN Biochemicals, Aurora, Ohio, USA) 1:200 | - | - | - |
| EDA+ fibronectin | - | egér monoklonális (ICN Biochemicals, Aurora, Ohio, USA) 1µg/ml | - | egér monoklonális (ICN Biochemicals, Aurora, Ohio, USA) 10 µg/ml |
| FGFR2-IIIb | Nyúl poliklonális (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA) 1:100 | - | - | - |
| neurofilin 1 | Nyúl poliklonális (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA) 1:100 | - | Nyúl poliklonális (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA) 1:50 | - |
| szindekán 4 | egér monoklonális (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA) 1:100 | - | egér monoklonális (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA) 1:50 | - |

4.6/1 táblázat. A fehérje expressziós vizsgálatok során használt módszerek és ellenanyagok összesítése

Áramlási citometriás méréseket fibroblasztokon, mint pozitív kontroll sejteken és epidermális sejteken végeztünk, az EDA⁺ fibronectin kimutatására. A sejteket 0,4%-os paraformaldehidben fixáltuk 20 percig 4°C-on, majd 70%-os etanolba helyeztük és egy éjszakán keresztül -20°C-on inkubáltuk. Az irodalmi adatok szerint (Pollice és mtsai, 1992) ezzel a fixálási eljárással elérhető, hogy mind a membránkötött, mind az intracelluláris EDA⁺ fibronectin detektálható legyen. Ezt követően a sejteket az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk (4. táblázat) 30 percig szobahőmérsékleten. Kétszeri mosást követően (PBS+0,5% BSA) a sejteket FITC jelölt másodlagos ellenanyaggal (egér ellenes patkány IgG1; BD Pharmingen, San Diego, California, USA) inkubáltuk 30 percig. Ezt követően a sejteket vagy áramlási citometriával mértük, vagy egy további festést végeztünk rajtuk PE jelölt PCNA ellenes ellenanyaggal (BD Pharmingen, San Diego, California, USA). Az áramlásos citometriás mérés előtt a sejteket még kétszer mostuk, majd PBS oldatban felszuszpendáltuk. A méréseket FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) áramlási citométerrel végeztük, minimum 50.000, maximum 100.000 sejt analízisével. A háttérfestődés meghatározására az EDA⁺ fibronectin detektálásakor egér IgG1 (Sigma, Budapest, Hungary) ellenanyagot használtunk, a PCNA festődés háttérének méréséhez pedig PE konjugált egér IgG2a-t (Sigma, Budapest, Hungary). Az áramlási citometriás adatokat a Cell Quest (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) számítógépes programmal elemeztük.

4.5. Funkcionális vizsgálatok

Funkcionális vizsgálatokat kétféle megközelítéssel végeztünk. Egy vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy ha neutralizáló ellenanyaggal blokkoljuk az $\alpha 5$ integrin működését, az hogyan hat a HaCaT sejtekben a D típusú ciklinek expressziójára; míg egy másik kísérletünkben a PRINS RNS expressziójának génspecifikus csendesítését végeztük el és azt vizsgáltuk, hogy ez milyen hatással van a sejtek viabilitására.

Neutralizáló ellenanyaggal végzett blokkolási kísérletünket szinkronizált HaCaT sejteken végeztük. 1×10^6 db sejtet passzáltunk 25 cm²-es tenyésztőedényekbe (Corning Incorporated, Corning, New York, USA). A passzálás után 5 órával, amikor a sejtek már letapadtak a tenyésztőedény aljára, hozzáadtuk a kultúrához az $\alpha 5$ integrin ellenes neutralizáló monoklonális ellenanyagot (BD Pharmingen, San Diego, California, USA), 20 μ g/ml végkoncentrációban. Izotípus kontrollként egér IgG1-et használtunk (BD Pharmingen, San Diego, California, USA), szintén 20 μ g/ml végkoncentrációban. A

HaCaT keratinocitákat 7 órán keresztül inkubáltuk a fenti ellenanyagokkal. Mintákat kétszer vettünk a kultúrákból: először közvetlenül az ellenanyagok ráhelyezését követően, majd 12 óra elteltével. A sejteket TRIzol reagensben szuszpendáltuk, majd totál RNS-t izoláltunk belőlük a gyártó utasításainak megfelelően.

A PRINS gén expressziójának specifikus csendesítésére a következő kísérletet végeztük el. Az RNS másodlagos struktúráját egy számítógépes program segítségével vizsgáltuk (*mfold*; www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna) és kiválasztottunk három olyan 19-meret, amely génspecifikus csendesítésre, siRNS kísérletre alkalmasnak ígérkezett. Ezeket a target szekvenciákat BLAST programmal (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ellenőriztük, annak érdekében, hogy más gén expresszióját ne befolyásolják az siRNS kísérletben. A három kiválasztott siRNS-nek megfelelő DNS oligonukleotidokat megszintetizáltattuk: AK696: TTTCTGGAATGATGTCCAA, AK862: TGTGGCCTGTGTTCTTTCA, AK 1313: TTTTCTTTAAAGACTGCCA, ahol a számok az AK022045 hivatkozási számon elérhető PRINS szekvencia nukleotidjait jelölik. Kontrollként megszintetizáltattunk egy olyan oligonukleotidot is, amely az AK1313 szekvencia nukleotidjainak véletlenszerűen összekombinált verziója, és amely a BLAST ellenőrzés szerint egyetlen humán gén kifejeződését sem befolyásolja. Az oligonukleotidokat *BamHI* és *HindIII* linker szekvenciákkal szintetizáltattuk meg, majd a pSilencer 2.1-U6 hygro vektorba (Ambion, Inc., Austin, Texas, USA) klónoztuk. A plazmidokat szekvenálással ellenőriztük. A HaCaT sejtek stabil transzformációjához a plazmidokat az E.Z.N.A. Plasmid Miniprep kit I-gyel (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) tisztítottuk, majd 2 µg tisztított plazmidot transzfektáltunk HaCaT sejtekbe a jetPEI reagenssel (QBioGene, Irvine, California, USA). A stabilan transzformált sejteket 200 µg/ml hygromicin jelenlétében szelektáltuk, a klónokat felnevesztettük, majd Q-RT-PCR módszerrel ellenőriztük a PRINS gén specifikus csendesítését.

4.6. Viabilitási vizsgálatok

Viabilitási vizsgálatokat az úgynevezett MTT esszével végeztünk. A HaCaT sejteket 96 lyukú vizsgálati tálcára pipettáztuk, lyukanként 3×10^3 sejtet. A sejteket a kísérlet által indikált ideig növesztettük, majd a mérés elvégzése előtt a táptalajt lecseréltük olyan RPMI tápoldatra, amely nem tartalmaz fenol pirosat. Ekkor minden lyukba 50 µg 3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólium bromidot (MTT) pipettáztunk és a sejteket

további 4 óráig inkubáltuk 37°C-on. A vizsgálat lényege, hogy az élő sejtek az MTT-t mitokondriális szukcinát dehidrogenázuk segítségével oldhatatlan MTT-formazánná alakítják, amely savas izopropil alkohollal oldhatóvá tehető (0,04 M HCl isopropil alkoholban oldva). A keletkező festék denzitását 540 nm-en lehet mérni (Multiscan EX, ThermoLabsystems, Vantaa, Finland) és a kapott értékből a tenyészetben található viabilis sejtek számára következtethetünk, mivel a mért optikai denzitás értéke egyenesen arányos a tenyészetben található élő sejtek számával.

4.7. Statisztikai analízisek

Genomikai vizsgálataink során arra törekedtünk, hogy a vizsgált polimorfizmusok és a betegségek közötti összefüggések fennállását statisztikai próbákkal elemezzük. Fisher-*féle* egzakt próbát, khi-négyszet- próbát, valamint esélyhányados számításokat végeztünk ezekben az asszociációs vizsgálatokban. Gén- és fehérje expressziós kísérleteink eredményeinek elemzésére Student-féle t-próbát, egy-utas ANOVA-t, kétutas faktoriális ANOVA-t és Mann-Whitney *U*-tesztet használtunk. Számolásainkhoz a VassarStats programcsomagot (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>) használtuk.

5. Eredmények

5.1. A keratinocita proliferáció szabályozásának vizsgálata multifaktoriális bőrbetegségekben

A pikkelysömör a keratinociták hiperproliferációjával és kóros differenciációjával jellemzett bőrbetegség. Ahhoz, hogy pathomechanizmusát minél alaposabban megérthessük, elengedhetetlen a keratinociták normál és kóros proliferációs/differenciációs folyamatait kísérő gén- és fehérje expressziós folyamatok megismerése, részletes jellemzése. Munkacsoportunk az elmúlt tíz évben HaCaT keratinocitákon végzett *in vitro* kísérleteket végzett, valamint önkéntes pikkelysömörös betegek epidermiszében is összevetettük a keratinocita proliferációt/differenciációt kísérő expressziós változásokat. Ilyen jellegű kísérleteinket kiterjesztettük a vénás elégtelenség talaján kialakuló lábszárfekélyre is, amely szintén olyan multifaktoriális bőrbetegség, amelynek komponense a kóros keratinocita proliferáció.

5.1.1. A szinkronizált HaCaT keratinociták jól modellezik a normál humán keratinociták különböző proliferációs és differenciációs állapotait

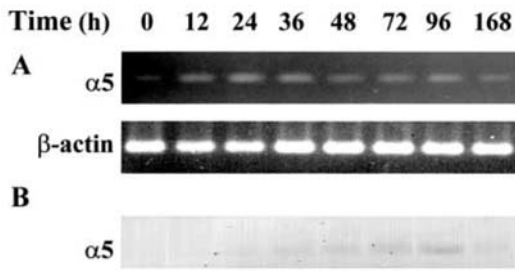
A kísérletes bőrgyógyászati kutatások elterjedt *in vitro* rendszerét biztosítják az immortalizált HaCaT keratinociták (Boukamp and Fusenig, 1993). A HaCaT keratinociták immortalizáltak és genetikusan különböznek a normál keratinocitáktól (Ryle és mtsai, 1989), tanulmányozásuk mégis értékes elsődleges adatokat szolgáltat a sejtek proliferációs/differenciációs sajátosságairól, amelyeket aztán a normál humán tenyésztett keratinocitákon végzett további kísérletek eredményeivel szoktunk összevetni.

Munkacsoportunk előzetes adatai, valamint más szerzők eredményei arra utaltak (Bata-Csörgő és mtsai, 1995b; Carroll és mtsai, 1995; Pellegrini és mtsai, 1992), hogy az $\alpha 5$ integrin pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben tapasztalható emelkedett expressziója szerepet játszik a pikkelysömör pathomechanizmusában, valamint az is ismert, hogy a keratinociták differenciációját jellemző keratin 1 és keratin 10 molekulák (K1 és K10) expressziós mintázata is eltér a pikkelysömörös tünetes epidermiszben. A D típusú ciklinek (D1, D2 és D3) pikkelysömör pathomechanizmusában betöltött egyenkénti szerepéről munkánk kezdeti szakaszában nem állt a rendelkezésünkre adat, de előzetes eredmények (Bata-Csörgő és mtsai, 1996) arra utaltak, hogy a D1 ciklin izoforma a

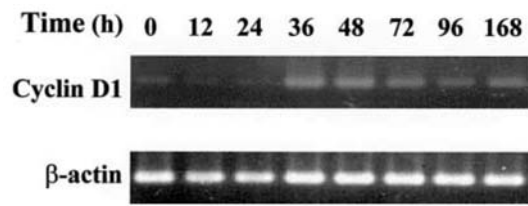
keratinocita sejtciklus G_0/G_1 átmenetében fejeződik ki a legmagasabb szinten, itt tölt be szabályozó funkciót. Célul tűztük ki tehát, hogy a HaCaT keratinocitákban tanulmányozzuk az $\alpha 5$ integrin, a D1 ciklin és a K1/K10 molekulák expressziójának változásait, annak érdekében, hogy eredményeinkkel hozzájáruljunk ezen *in vitro* modell rendszer további jellemzéséhez, valamint a fenti molekulák pikkelysömör pathomechanizmusában betöltött szerepének tisztázásához.

Kísérleteinkhez kidolgoztunk a HaCaT keratinociták szinkronizálásának módszerét. Az eljárás lényege, hogy a HaCaT keratinociták tenyészetét addig növesztjük, míg eléri a konfluens állapotot, majd további két hétig tenyésztjük a sejteket kétnaponkénti táptalaj cserével. A második héten a sejtektől a szérumot is megvonjuk. Az eljárás következtében a sejtek a második hét végére G_0 sejtnyugalmi állapotba kerülnek. Ekkor a HaCaT keratinocitákat szétpasszáljuk, és a passzáláskor használt táptalaj már szérumot is tartalmaz. A sejtek ennek következtében szinkron osztódni kezdenek, melyet propídium jodidos DNS festéssel tudunk demonstrálni. Ezt követően a sejt kultúrákból egy héten keresztül mintákat gyűjtünk: az első két napban 12 óránként, annak érdekében, hogy a sejtnyugalmi fázisból való kilépés és a sejtprolifерáció gyors történéseit minél részletesebben tudjuk jellemezni (12, 24, 36 és 48 h); majd ezt követően 72, 96 és 168 óra elteltével.

Az $\alpha 5$ integrin, a D1 ciklin és a K1/K10 gén- ill. fehérje expressziós méréseket RT-PCR és Western blott analízisekkel végeztük el. Eredményeink szerint (5.1.1/1. ábra) az $\alpha 5$ integrin mRNS szintje a sejtnyugalmi fázisból való kilépés pillanatában (0 h) igen alacsony volt, de ezt követően 12 órától kezdődően határozott emelkedést tapasztaltunk a szintjében (36-96 h), majd a 168 órás mintában mennyisége ismét csökkenni kezdett. Ez a génextpressziós mintázat nagyon jó párhuzamot mutatott a propídium jodiddal követett sejtosztódási intenzitással (Pivarsci és mtsai, 2001). Az $\alpha 5$ integrin fehérje mennyiségének növekedése az mRNS mennyiség növekedéséhez viszonyítva valamelyest később következett be, maximumát 72 és 96 óránál tapasztaltuk (5.1.1/1. ábra). A D1 ciklin mRNS kifejeződése rendkívül alacsonynak bizonyult a sejtnyugalmi fázisban levő, valamint az abból kilépő sejtekben (12-24 h), expressziója azonban határozott emelkedést mutatott a 36-48-72 órás mintákban, majd a 96 és 168 órás mintákban csökkenni kezdett. Ez a kifejeződési mintázat is (hasonlóan az $\alpha 5$ integrinéhez) nagyon jó párhuzamot mutatott a sejtek proliferációs állapotával (5.1.1/2. ábra).

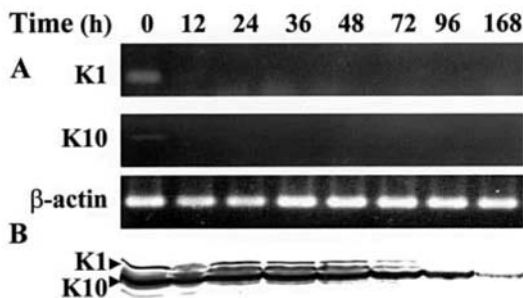


5.1.1/1 ábra. $\alpha 5$ integrin expresszió HaCaT sejtekben. A HaCaT sejteket szérumezhtetéssel és kontaktgátlással szinkronizáltuk, majd szérumot tartalmazó tápfolyadékba passzáltuk. Az $\alpha 5$ integrin expresszióját RT-PCR (A) és immunoblotting (B) módszerrel vizsgáltuk a sejtnyugalmi fázisból való kilépést követő jelzett időpontokban.



5.1.1/2 ábra. A D1 ciklin mRNS expressziójának vizsgálata HaCaT sejtekben a sejtnyugalmi fázisból való kilépést követően. A D1 ciklin mRNS expresszióját RT-PCR módszerrel követtük a jelzett időpontokban. A D1 ciklin (162 bp) és a belső kontrollként használt β -aktin (406 bp) PCR amplikonokat etídium bromiddal festett agaróz gélen detektáltuk.

A K1/K10 differenciációs marker gének expresszióját kizárólag a 0 órás mintákban tudtuk detektálni, tehát a szérumezhtetéssel és kontakt gátlással G_0 sejtnyugalmi fázisba kényszerített, differenciált sejtekben; ahogy a sejtek proliferálni kezdtek, mind a K1, mind a K10 mRNS-ek mennyisége olyan mértékben lecsökkent, hogy RT-PCR módszerrel már nem lehetett azokat észlelni (5.1.1/3. ábra). A K1/K10 fehérjék mennyiségének csökkenése azonban csak igen késve volt megfigyelhető a sejtnyugalmi fázisból kilépő, proliferáló sejtekben: a K1 fehérje 72 óráig, míg a K10 fehérje a teljes egyhetes követési szakaszban észlelhető volt (5.1.1/3. ábra).



5.1.1/3 ábra. K1 és K10 expresszió HaCaT sejtekben. A HaCaT sejteket szérumezhtetéssel és kontaktgátlással szinkronizáltuk, majd a sejtciklusba való belépésüket szérum tartalmú táptalajba való passzállással indukáltuk. A K1/K10 mRNS-ek változásait RT-PCR-rel követtük (A); a K1 (67 kDa) és K10 (56,5 kDa) fehérjéket immunoblott módszerrel detektáltuk (B) a jelölt időpontokban. A K1 (316 bp), a K10 (685 bp) és a belső kontrollként használt β -aktin (406 bp) PCR amplikonokat etídium bromiddal festett agaróz gélen detektáltuk.

A fenti eredmények jól mutatják, hogy a különböző proliferációs ($\alpha 5$ integrin és D1 ciklin) és differenciós (K1/K10) markerek mind gén-, mind fehérje expressziós szinten markáns változásokat mutatnak és ezekkel a markergénekkkel jól monitorozhatók a HaCaT keratinociták proliferációs/differenciációs folyamatai. Ily módon egy olyan érzékeny kísérleti rendszert sikerült kifejlesztenünk és a mindennapi laboratóriumi gyakorlatba bevonnunk, amely alkalmas modellrendszert biztosít a keratinociták növekedésére ható külső faktorok tanulmányozásához. Munkánk következő részében arról számolunk be, hogy a szinkronizált HaCaT sejtek proliferációs markereinek expressziós változásaival

milyen jól követhettük a pikkelysömörös keratinocita hiperproliferációhoz feltehetően hozzájáruló tényezők, úgy, mint szérum faktorok, etanol és aceton hatásait a sejtek növekedésére.

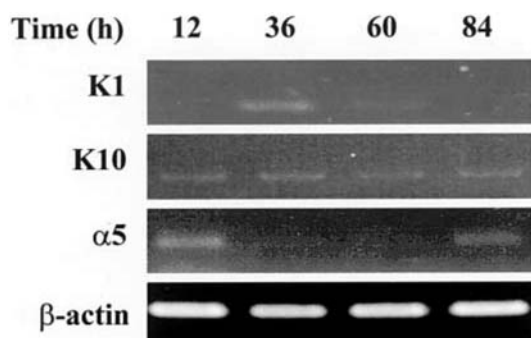
5.1.2. Szérum faktorok, az etanol és az aceton indukálják a keratinocita proliferációs markerek expresszióját, és feltehetően hozzájárulnak a pikkelysömörrre jellemző keratinocita hiperproliferációhoz

Vitathatatlan tény, hogy a pikkelysömör egy olyan multifaktoriális betegség, amelynek pathogenezisében az epidermiszt infiltráló T sejtek által termelt citokinek alapvető szerepet játszanak. Az első erre utaló tudományos eredmények a nyolcvanas évek elején születtek (Bos és mtsai, 1983; Valdimarsson és mtsai, 1986), és az azóta eltelt két évtizedben végzett immunológiai kutatásoknak köszönhetően rendkívüli részletességgel sikerült feltérképezni a betegség hátterében álló immunológiai rendellenességeket (Nickoloff és mtsai, 2007). Mindezen egyértelmű eredmények mellett azonban az is tény, hogy a pikkelysömört a keratinocita betegségként is kell mérlegelnünk, mivel számos saját és más szerzőktől született eredmény arra utal, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből származó keratinociták különböznek az egészséges, normál bőrből izolált keratinocitáktól (Bata-Csörgő és mtsai, 1995). Azt is megfigyelték, hogy a normál, egészséges bőr és a pikkelysömörös tünetmentes bőr bazális membránja között szerkezeti eltérések vannak: a tünetmentes bőr laminin és kollegén izoformáinak láncai töredeztettek, szakadozottak az egészséges epidermisszel összehasonlítva (Mondello és mtsai, 1996; Vaccaro és mtsai, 2002). Mindezek alapján feltételezzük, hogy a pikkelysömör egy olyan multifaktoriális bőrbetegség, melynek pathogenezisében az immunológiai rendellenességek alapvető szerepet játszanak, de a keratinociták és a bazális membrán rendellenességei is szükségesek, és hozzájárulnak a pikkelysömörrre jellemző kóros immunológiai folyamatok indukciójához, majd fennmaradásához. Ezen feltételezésünkből kiindulva olyan anyagok keratinocita proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálatát határoztuk el, amelyek mint külső faktorok hozzájárulhatnak a pikkelysömörös hiperproliferáció kialakulásához.

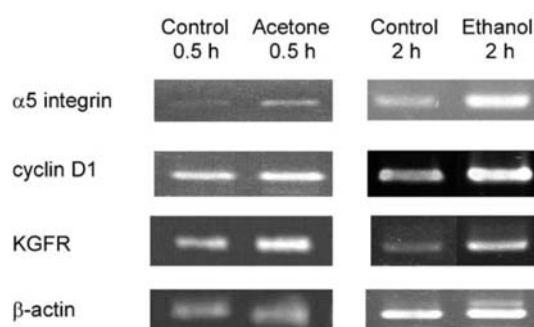
Elsődlegesen azt vizsgáltuk, hogy a szérum milyen hatással van HaCaT sejtekben a proliferációs/differenciációs markerek expressziójára. Intenzíven osztódó HaCaT sejtektől megvontuk a szérumot, majd azt vizsgáltuk, hogy hogyan változik az $\alpha 5$ integrin és a K1/K10 mRNS-ek expressziója. Eredményeink szerint a szérum megvonása nincs hatással

a K10 mRNS expressziójára, az $\alpha 5$ integrin gén kifejeződése nagymértékben lecsökken, míg a differenciációs marker K1 gén kifejeződése megemelkedik szérum hiányában. Mindebből arra következtettünk, hogy a keratinociták $\alpha 5$ integrin és K1 génexpressziójának szabályozásában szérumfaktorok is részt vesznek, míg a K10 gén szabályozásában ezek a faktorok nem játszanak szerepet (5.2.1/1. ábra).

Egy másik kísérletsorozatunkban arra voltunk kíváncsiak, hogy az etanol és az acetone szubtoxikus koncentrációban vajon direkt módon hatnak-e a keratinociták proliferációjára. A kísérlet elvégzésére az a klinikai megfigyelés sarkallt bennünket, hogy alkohol fogyasztás következtében a pikkelysömörös betegek tünetei általában romlani szoktak, és tisztázni szeretnénk volna, hogy ez a hatás vajon közvetlen módon a keratinociták növekedésének befolyásolásán keresztül, vagy közvetett módon történik meg. Aktívan osztódó HaCaT sejtekhez acetont és etanolt adtunk, és mindössze félórás, szubtoxikus koncentrációkban történt kezelés hatására megfigyelhető volt az $\alpha 5$ integrin, a D1 ciklin, valamint a KGFR gének expressziójának növekedése (5.2.1/2. ábra). Mind a három gén expressziója a proliferáló keratinocitákra jellemző. A HaCaT sejtek viabilitásának változását MTT, proliferációját pedig BrdU esszével követtük, és azt találtuk, hogy a mind az etanol, mind az acetone hatására megnövekedett a sejtek proliferációjának mértéke ill. viabilitása (az eredményeket nem mutatom). Génexpressziós és funkcionális vizsgálataink eredményei tehát nagyon jó egyezést mutattak, arra utalnak, hogy az acetone és az etanol direkt keratinocita proliferációs indukciós hatással bírnak, és feltételezzük, hogy a pikkelysömörös tünetek klinikailag megfigyelhető romlása direkt hatásuknak is betudható.



5.1.2/1 ábra. Széruméheztesítés hatása az $\alpha 5$ integrin és K1/K10 mRNS-ek expressziójára HaCaT sejtekben. A HaCaT sejteket a passzálást követő 12 órán keresztül szérumot tartalmazó táptalajban tenyésztettük, majd a táptalajt lecseréltük szérummentesre. Az $\alpha 5$ integrin és K1/K10 mRNS-ek expresszióját RT-PCR módszerrel követtük 24, 48 és 72 órával a szérum megvonást követően. A $\alpha 5$ integrin (358 bp), a K1 (316 bp) és a K10 (685 bp) PCR amplikonokat etídium bromiddal festett agaróz gélen detektáltuk.

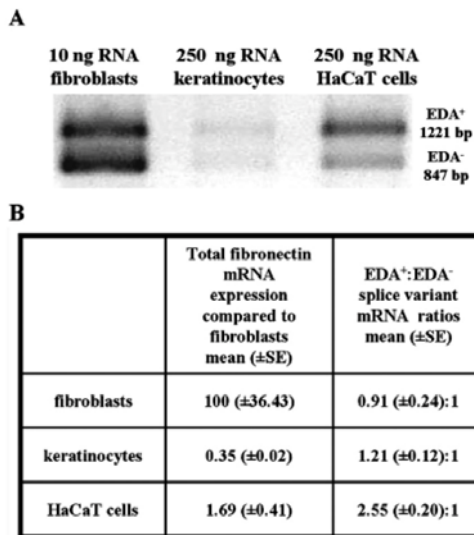


5.1.2/2 ábra. A sejtciklus szabályozásában részt vevő gének expressziójának vizsgálata RT-PCR módszerrel. Az $\alpha 5$ integrin, a D1 ciklin és a KGFR mRNS-ek expresszióját kontroll és acetonnal 30 percig, illetve etilalkohollal 2 órán keresztül kezelt HaCaT sejtekben hasonlítottuk össze.

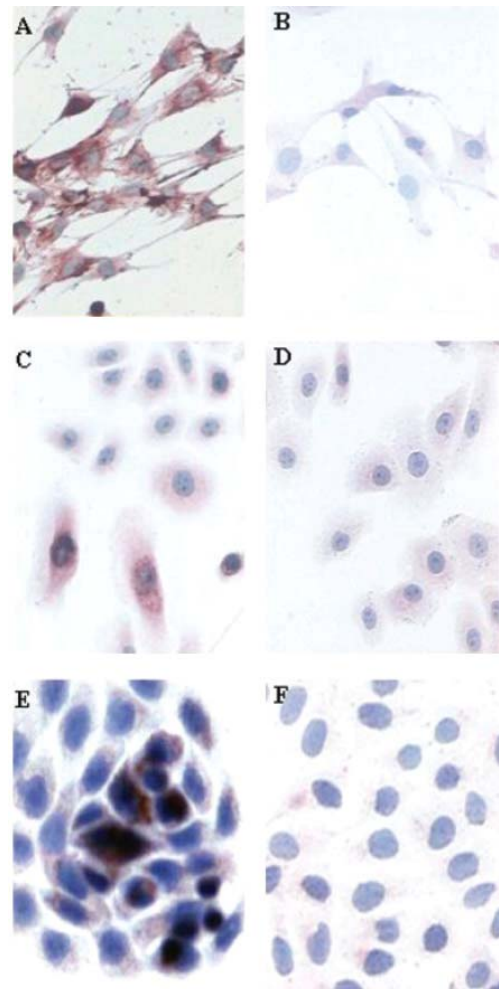
5.1.3. A proliferáló keratinociták lehetséges forrásai az EDA motívumot hordozó onkofötális (EDA⁺) fibronektinnek

Mint az előzőekben már említésre került, előzetes adatok arra utaltak (Pellegrini és mtsai, 1992), hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz keratinocitái emelkedett szintű $\alpha 5$ integrint expresszálnak. Ez feltehetően hozzájárul ahhoz a jelenséghez, amelyet munkacsoportunk is demonstrált, miszerint a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták inherens módon érzékenyebben reagálnak a T-sejt limfokinek indukciójára, amely a pikkelysömör pathogenezisének egyik kulcs mozzanata. Keratinocita proliferáció szabályozással kapcsolatos kutatásaink következő szakaszában tehát azt a problémakört jártuk körül, hogy az $\alpha 5$ integrin ligandjának, a fibronektinnek milyen izoformáit fejezik ki a keratinociták, és ezek hogyan járulhatnak hozzá a pikkelysömör pathogeneziséhez.

Munkánkhoz az is további lendületet adott, hogy 2000-ben Ting és munkatársai (Ting és mtsai, 2000) közzé tették eredményeiket, miszerint a pikkelysömörös tünetmentes bőr dermo-epidermális junkciójának (DEJ) területén EDA motívumot tartalmazó fibronektin van jelen. Ez a fibronektin izoformát (EDA⁺) onkofötális fibronektinnak is nevezik, mivel expresszióját elsősorban az embrionális szövetekben ill. tumorokban lehet tapasztalni. Kísérletes bizonyíték van arra nézve is, hogy az EDA⁺ fibronektin expressziója elengedhetetlen a normál sebgyógyuláshoz (Muro és mtsai, 2003). Ting és munkatársai feltételezték, hogy a tünetmentes bőr DEJ területén észlelt EDA⁺ fibronektin szerepet játszik a pikkelysömör pathogenezisében, és hozzájárul az abnormális extracelluláris milió kialakításához. Ugyanakkor a szerzők cikkükben nyitva hagyták azt a kérdést, hogy vajon melyik sejttípus a felelős az EDA⁺ fibronektin termeléséért, mivel azt egyértelműen ki tudták zárni, hogy a dermisz fibroblasztjai termelnék ezt a fibronektin izoformát a pikkelysömörös tünetmentes bőrben. Rothaupt és munkatársai (Rothaupt és mtsai, 2000) ugyan kimutatták, hogy a DEJ területén kimutatható CD11⁺ sejtek termelnek bizonyos mennyiségű EDA⁺ fibronektint, azok alacsony száma azonban kizárja annak lehetőségét, hogy az általuk termelt kis mennyiségű EDA⁺ fibronektin alapvetően megváltoztassa a DEJ extracelluláris mátrix kompozícióját. Elhatároztuk tehát, hogy megvizsgáljuk annak lehetőségét, hogy maguk a keratinociták lehetnek-e forrásai az EDA⁺ fibronektinnek, amely aztán a keratinocitákat körülvevő extracelluláris mátrix összetételének megváltoztatásával autokrin módon befolyásolja a sejtek reakciókészségét.



5.1.3/1 ábra. A fibroblasztok, a normál tenyésztett keratinociták és a HaCaT sejtek különböző mennyiségben expresszálják az össz fibronektint és az EDA⁺:EDA⁻ izoformák aránya is különbözik bennük. Mivel a fibroblasztok, a normál humán keratinociták és a HaCaT sejtek nagymértékben különböznek egymástól fibronektin expressziójuk tekintetében, ezért a jó minőségű detektálás érdekében különböző mennyiségű cDNS-eken végeztük el a fibronektin-specifikus PCR reakciókat. A PCR amplikonokat 1% agaróz gélen futtattuk, (A), majd denzitometráls után kiszámoltuk a kifejezett össz fibronektin mRNS mennyiségét, valamint az EDA⁺ és EDA⁻ izoformák arányát. A gélfotó (A) egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja be; az átlag \pm SE (B) a fibroblasztok esetében kettő, míg a normál keratinociták és HaCaT sejtek esetében három független kísérlet eredményeiből került kiszámolásra.

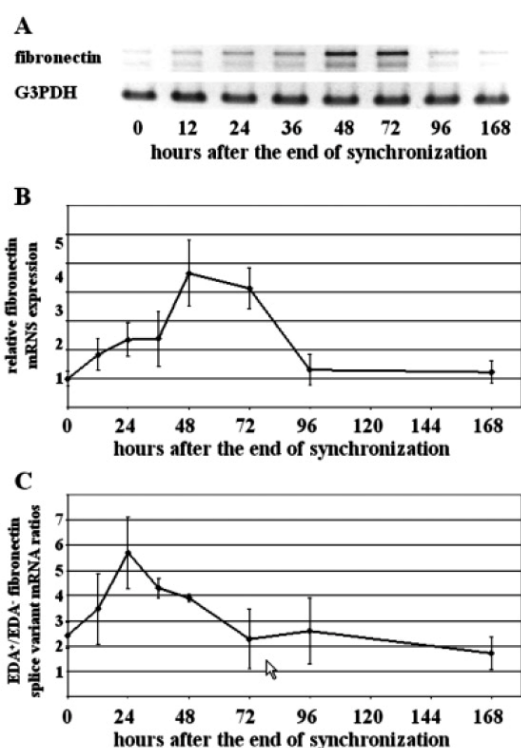


5.1.3/2 ábra. Immuncitokémiai vizsgálatok humán fibroblasztokon, keratinocitákon és HaCaT sejteken. Szubkonfluens sejt kultúrákat festettünk egér monoklonális ellenanyaggal, amely specifikusan az extra domén A-t (EDA) hordozó fibronektin izoformát ismeri fel (A, C, E), valamint egér IgG1-t használtunk izotípus kontrollként (B, D, F). A fibroblasztok egyöntetű citoplazmás festést mutattak (A), míg a keratinociták (C) és a HaCaT sejtek esetében csak az osztódó sejtekben láttunk citoplazmás festődést.

A keratinociták EDA⁺ fibronektin termelését vizsgáló kísérleteinket RT-PCT, Western blott, immuncitokémia és áramlásos citokémiai módszerekkel végeztük. RT-PCR kísérleteinkhez egy olyan primer párt terveztünk, amellyel mérete alapján jól elkülöníthető volt az EDA motívumot hordozó és az azt nem hordozó fibronektin izoforma. Elsőként azt vetettük össze, hogy a professzionális fibronektin termelő fibroblasztok, a tenyésztett humán keratinociták és a HaCaT sejtek milyen mértékben fejezik ki a fenti izoformák mRNS-eit. Eredményeink szerint (5.1.3/1 ábra) a keratinociták és a HaCaT sejtek a fibroblasztok által termelt össz fibronektin mRNS-ének csupán töredékét fejezik ki. Érdekes módon azonban azt találtuk, hogy míg a fibroblasztok és a keratinociták az EDA⁺ és EDA⁻ mRNS-eket megközelítőleg egyforma mértékben expresszálják, addig az immortalizált HaCaT sejtekben az EDA⁺ mRNS aránya két és félszerese az EDA⁻ izoformáénak. Immuncitokémiai vizsgálatunk is azt mutatták, hogy az EDA⁺ izoforma HaCaT sejtekben jóval magasabban fejeződik ki, mint a tenyésztett normál humán

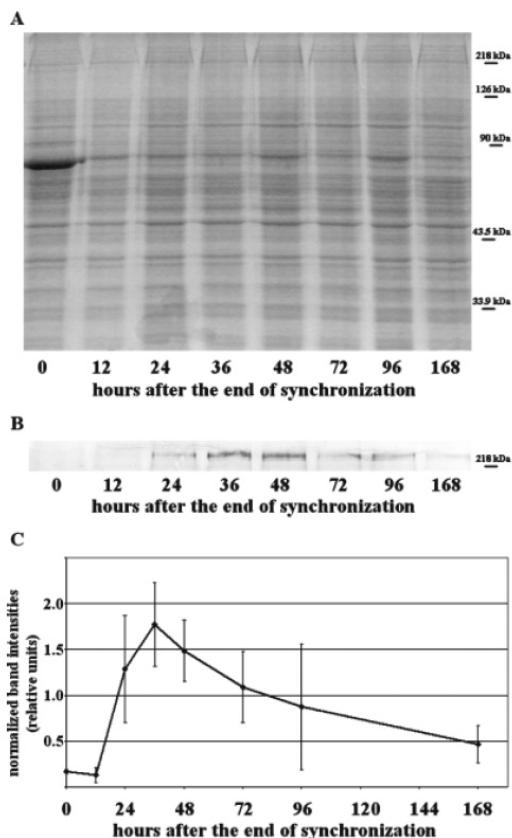
keratinocitákban (5.1.3/2 ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az EDA⁺ izoforma termelése valamilyen módon összefüggésbe hozható a nagyobb proliferációs kapacitással.

Következő kísérletsorozatunkban azt vizsgáltuk, hogy hogyan változik az össz fibronectin mennyisége, ill. az EDA⁺/EDA⁻ izoformák aránya keratinociták proliferációs/differenciációs állapotának függvényében. Ehhez a vizsgálathoz a szinkronizált HaCaT sejtek modellrendszerét alkalmaztuk. RT-PCR kísérleteink eredményei szerint az össz fibronectin szintje akkor a legmagasabb a szinkronizált HaCaT sejtekben, amikor azok a legintenzívebben proliferálnak, míg az EDA⁺/EDA⁻ mRNS arány az intenzív proliferációt megelőzően a legmagasabb (5.1.3/3 ábra).

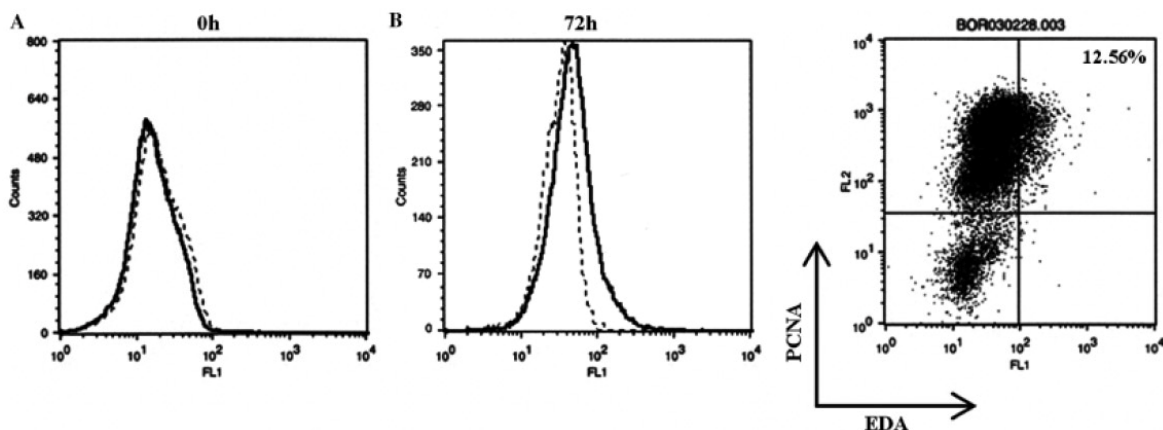


5.1.3/3 ábra. Az össz fibronectin mRNS mennyisége és az EDA⁺/EDA⁻ fibronectin izoformák aránya egyaránt függ a HaCaT keratinociták proliferációs/differenciációs állapotától. A HaCaT sejteket szérumezektetással és kontaktgátlással szinkronizáltuk (0h), majd a szérum visszaadásával és passzálassal a sejtnyugalmi fázis elhagyására készítettük őket. A jelölt időpontokban mintákat gyűjtöttünk RT-PCR kísérletekhez. Miután a PCR amplikonokat 1% agaróz gélen megfuttattuk (A), denzitométerrel megmértük az EDA⁺ és az EDA⁻ termékek intenzitását. Az össz fibronectin (EDA⁺+ EDA⁻) mennyiség időbeli változását a 0h mintában tapasztalhoz viszonyítva ábrázoltuk (B). Az EDA⁺ és EDA⁻ izoformák arányának időbeli változását is kiszámoltuk (C). Az ábrázolt átlagokat (±SE) két független kísérlet eredményiből számoltuk.

Az össz fibronectinre vonatkozó adatainkat fehérjeszinten is igazoltuk Western blott módszerrel (5.1.3/4 ábra). Az EDA⁺ izoforma detektálásához áramlási citometriás módszert kellett alkalmaznunk, amely szerint a 72 órás, aktívan proliferáló HaCaT keratinocitákban a sejtek 12,5%-a fejezi ki ezt az izoformát, míg a 0 órás, sejtnyugalmi fázisban lévő sejtek ezt az izoformát egyáltalán nem fejezik ki (5.1.3/5 ábra). Ezek a kísérletek mind azt igazolták, hogy a HaCaT keratinociták akkor termelik a legnagyobb mennyiségű fibronectint, amikor a legintenzívebben proliferálnak, valamint az onkofötális EDA⁺ izoforma aránya is az aktív proliferációs stádiumban a legmagasabb.



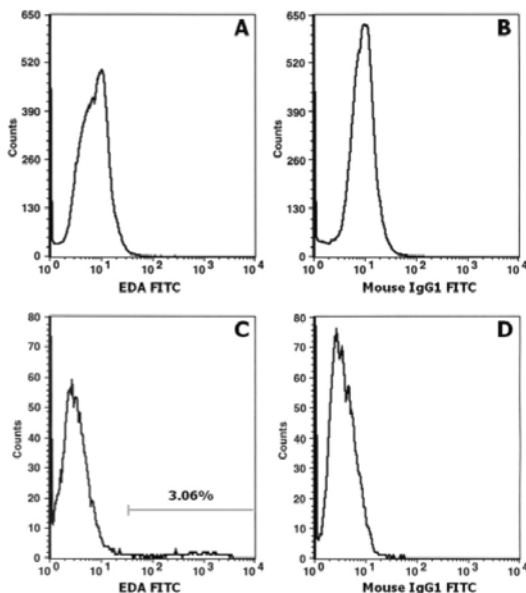
5.1.3/4 ábra. Az össz fibronectin fehérje mennyisége a HaCaT sejtek proliferációs/differenciációs állapotától függ. A HaCaT sejteket szérumezítettéssel és kontaktgátlással szinkronizáltuk (0h), majd a szérum visszaadásával és passzálassal a sejtnyugalmi fázis elhagyására készítettük őket. A jelölt időpontokban mintákat vettünk, megfuttattuk őket SDS-PAGE gélen, majd CBB-vel megfestettük. A festés a minták egyenletes felvitelét mutatja (A). Ugyanezen fehérje mennyiségeket a futtatást követően nylon membránra is átvittünk és Western blot analízist végeztünk az össz fibronectin detektálására (B). A CBB gélen kiválasztottunk három konstansan megjelenő csíkot, denzitometriával meghatároztuk az intenzitásukat, kiszámoltuk az átlagukat és ezzel az értékkel normalizáltuk a Western bloton kapott össz fibronectin intenzitásokat. Két független kísérletből átlagolt normalizált össz fibronectin intenzitást (\pm SE) ábrázoltunk (C).



5.1.3/4 ábra. A fibronectin EDA⁺ izoformája az aktívan proliferáló HaCaT sejtekben fejeződik ki. A HaCaT sejteket szérumezítettéssel és kontaktgátlással szinkronizáltuk (0h), majd a szérum visszaadásával és passzálassal a sejtnyugalmi fázis elhagyására készítettük őket. Áramlások citometriai méréseink szerint a sejtnyugalmi fázisban lévő (0h) sejtek festődése (folyamatos vonal) nem volt megkülönböztethető az izotípus kontroll festéstől (szaggatott vonal) (A). A sejtnyugalmi fázisból való kilépést követő 72. órában az EDA⁺ fibronectin specifikus festődés eltolódást mutatott az izotípus kontroll festéshez viszonyítva (B, bal oldali panel). A bemutatott reprezentatív kísérletben a sejtek 12,56%-a mutatott a háttérnél magasabb szintű festődést. A PCNA specifikus kettős festés azt is megmutatta (B, jobb oldali panel), hogy az EDA⁺ fibronectint expresszáló sejtek mind pozitívak voltak PCNA festődésre is (lásd az ábra jobb felső kvadránsát).

Végezetül összehasonlítottuk az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből izolált epidermális sejtek onkofötális EDA⁺ fibronectin expresszióját. Méréseinkhez áramlások citometriai módszert alkalmaztunk. Eredményeink szerint az egészséges epidermiszből származó sejtek rövid *ex vivo* kultúra során (72 órás tenyésztés) nem fejezik ki az onkofötális EDA⁺ fibronectint, míg a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből származó sejtek 3%-a kifejezi ezt az izoformát (5.1.3/6 ábra). Ezt az

eredményünket direkt bizonyítéknak tekintjük arra nézve, hogy a tünetmentes epidermisz keratinocitái maguk is lehetnek az onkofötális EDA⁺ fibronectin termelői, amellyel hozzájárulnak az extracelluláris mátrix összetételének, s ezen keresztül a keratinociták válaszkészségének megváltozásához.



5.1.3/6 ábra Az egészséges epidermiszből izolált epidermális sejtek nem, de a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből izolált sejtek egy kis populációja kifejezi a fibronectin EDA⁺ izoformáját. Egészséges (A, B) és pikkelysömörös tünetmentes (C, D) epidermiszből izolált sejteket 72 órán keresztül tenyésztettünk, majd megfestettük őket az EDA⁺ fibronectinre specifikus monoklonális ellenanyaggal. Míg az egészséges epidermiszből izolált sejtek esetében a FITC fluoreszcencia értéke nem haladta meg a háttér festődését, a pikkelysömörös epidermiszből izolált sejtek egy kis populációja (3,06%) e határérték feletti EDA⁺ FITC jelet adott.

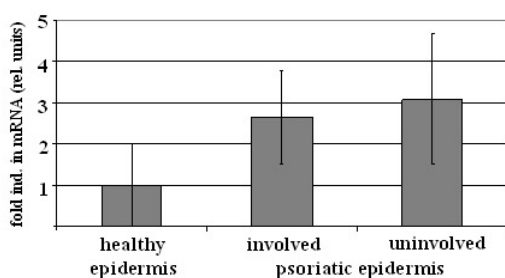
5.1.4. A keratinocita növekedési faktor receptor (FGFR2-IIIb) kifejeződése a proliferáló keratinocitákban a legmagasabb szintű, és mRNS expressziója emelkedett mind a pikkelysömörös tünetes, mind a tünetmentes epidermiszben

A keratinocita növekedési faktor receptor (KGFR, amely az FGFR2 IIIb splice variánsa), egy transzmembrán tirozináz kináz, amely számos fibroblaszt növekedési faktor (FGF), többek között az FGF-7 (más néven keratinocita növekedési faktor = KGF-1) receptoraként szolgál. Egészséges epidermiszben az FGFR2-IIIb receptor főként a szuprabazális rétegben fejeződik ki, míg a bazális sejtekben alacsony az expressziója (LaRoche és mtsai, 1995; Rio-Tsonis és mtsai, 1997). A pikkelysömörös tünetes epidermisznek mind a K1/K10⁺, mind a K1/K10⁻ rétegei magasabb szinten, mintegy két és félszeres mennyiségben fejezik ki az FGFR2-IIIb receptor mRNS-t, a dermisz fibroblasztjai pedig magasabb szinten expresszálják a KGF mRNS-t (Finch és mtsai, 1997). Finch és munkatársai összehasonlításait azonban pikkelysömörös tünetes és tünetmentes bőrminták között végezték el, nem tettek összehasonlításokat egészséges és pikkelysömörös minták között. Elhatároztuk tehát, hogy megvizsgáljuk annak a lehetőségét, hogy vajon a pikkelysömörös tünetmentes bőr is mutat-e eltéréseket az

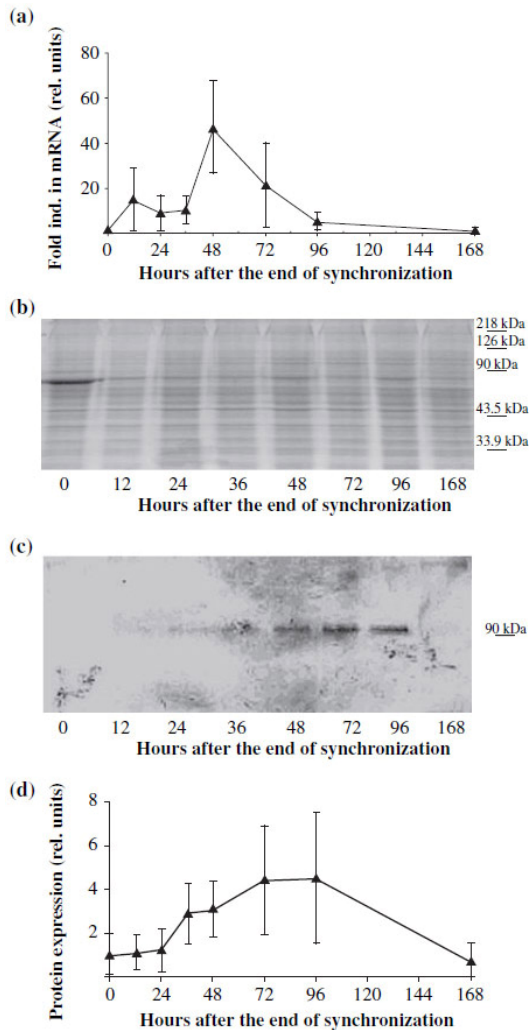
KGF/FGFR2-IIIb ligand/receptor rendszer tekintetében, és hogy ezek magasabb expressziója hozzájárul-e a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták aktivált állapotához és a külső tényezőkkel szembeni érzékenységéhez.

A másik ellentmondás, melyet tisztázni szerettünk volna azzal kapcsolatos, hogy egyes szerzők a differenciálódó keratinociták sajátosságának találták az emelkedett szintű FGFR2-IIIb expressziót (Capone és mtsai, 2000; Marchese és mtsai, 1997; Visco és mtsai, 2004), míg a pikkelysömörben tapasztaltak (Finch és mtsai, 1997) és egyes *in vitro* eredmények (Zhou és mtsai, 1996) arra utaltak, hogy az FGFR2-IIIb-t az aktívan proliferáló keratinociták fejezik ki a legmagasabb szinten, és különböző antiproliferatív hatású anyagok csökkentik az expresszióját.

Kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakciót (Q-RT-PCR) végeztünk annak tisztázására, hogy vajon a tünetmentes pikkelysömörös epidermiszben is tapasztalhatunk-e emelkedett FGFR2-IIIb expressziót. Eredményeink arra utalnak (5.1.4/1 ábra), hogy az egészséges epidermiszhez viszonyítva mind a tünetes, mind a tünetmentes pikkelysömörös epidermiszben magasabb az FGFR2-IIIb mRNS expresszió. A Finch és munkatársai (Finch és mtsai, 1997) által közölt eredményeket tehát a saját adattal tudtuk kiegészíteni, hogy az emelkedett szintű FGFR2-IIIb expresszió nem csupán a már hiperproliferáló pikkelysömörös keratinociták sajátossága, hanem a tünetmentes epidermiszben is magasabb, és ez feltehetően hozzájárul a tünetmentes területek keratinocitáinak pre-aktivált állapotához.



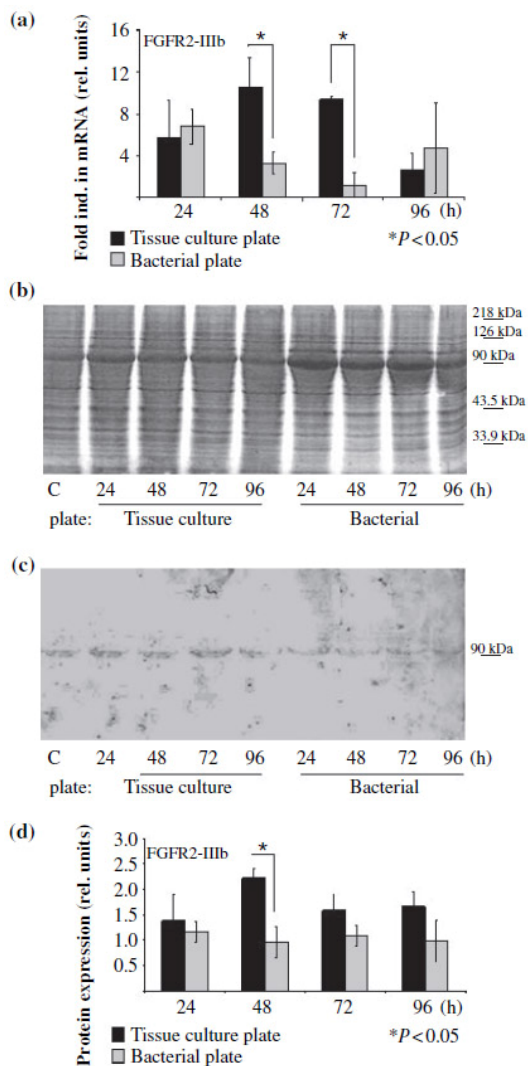
5.1.4/1 ábra. FGFR2-IIIb mRNS expresszió egészséges, pikkelysömörös tünetmentes és tünetes epidermiszben. Az FGFR2-IIIb mRNS expresszióját Q-RT-PCR módszerrel hasonlítottuk össze egészséges (n=5), pikkelysömörös tünetmentes (n=4) és tünetes (n=4) epidermisz mintákban. A relatív expressziós értékeket az egészséges epidermiszben kapott adathoz viszonyítva adtuk meg (\pm SE).



5.1.4/2 ábra. A HaCaT sejtek magas szintű FGFR2-IIIb expressziója a sejtek aktív proliferációs állapotaira jellemző.

A HaCaT sejteket szérumeheztetéssel és kontaktgátlással szinkronizáltuk, majd a sejtnyugalmi fázisból való kilépésüket követően a jelzett időpontokban mintákat vettünk. (a) Az FGFR2-IIIb mRNS expresszióját Q-RT-PCR módszerrel mértük, majd a 18S RNS expressziójával normalizáltuk. A grafikonon ábrázolt relatív expressziós értékeket a szérumeheztetett, kontaktgátolt (0h) sejtekben mért adatokhoz viszonyítva adtuk meg. Az ábrázolt értékeket három független kísérlet átlagolt adataiból számoltuk ki (\pm SE). (b) Az FGFR2-IIIb fehérje mennyiségi változásainak követéséhez a jelölt időpontokban mintákat vettünk, melyeket SDS-PAGE gélen megfuttattunk, majd CBB festékkel megfestettünk. A gélkép egyenletes mintafelvitelt mutat. (c) Azonos mennyiségű fehérjemintákat nitrocellulóz membránra vittünk át, majd Western blot vizsgálatot végeztünk a rendelkezésünkre álló nyúl poliklonális ellenanyaggal. A 90 kDa magasságában jelentkező csík az FGFR2-IIIb specifikus detektálását jelzi. (d) A CBB gélen kiválasztottunk három konstansan megjelenő csíkot, denzitometriával meghatároztuk az intenzitásukat, kiszámoltuk az átlagukat és ezzel az értékkel normalizáltuk a Western bloton kapott FGFR2-IIIb specifikus csíkok intenzitását. A grafikonon ábrázolt relatív fehérje expressziós értékeket a szérumeheztetett, kontaktgátolt (0h) sejtekben mért adatokhoz viszonyítva adtuk meg. Az ábrázolt értékeket három független kísérlet átlagolt adataiból számoltuk (\pm SE).

Annak a kérdésnek a tisztázására, miszerint az FGFR2-IIIb expresszió indukciója a keratinociták proliferációjához vagy differenciációjához kötött, *in vitro* vizsgálatokat végeztünk immortalizált HaCaT keratinocitákon. Kísérleteink egy részében a szinkronizált HaCaT keratinociták modellrendszerét alkalmaztuk és kimutattuk, hogy az FGFR2-IIIb mind mRNS, mind fehérjeszinten az aktívan proliferáló sejtekben fejeződik ki a legmagasabb szinten: mRNS szintű expressziója a sejtnyugalmi fázisból történő kilépést követő 48, míg fehérje expressziós maximuma 72 és 96 óra elteltével látható (5.1.4/2 ábra). Propídium-jodidos DNS festési vizsgálataink szerint (Pivarcsi és mtsai, 2001) a HaCaT keratinociták ezekben az időpontokban proliferálnak a legaktívabban a sejtnyugalmi fázisból történő szinkron kilépést követően.

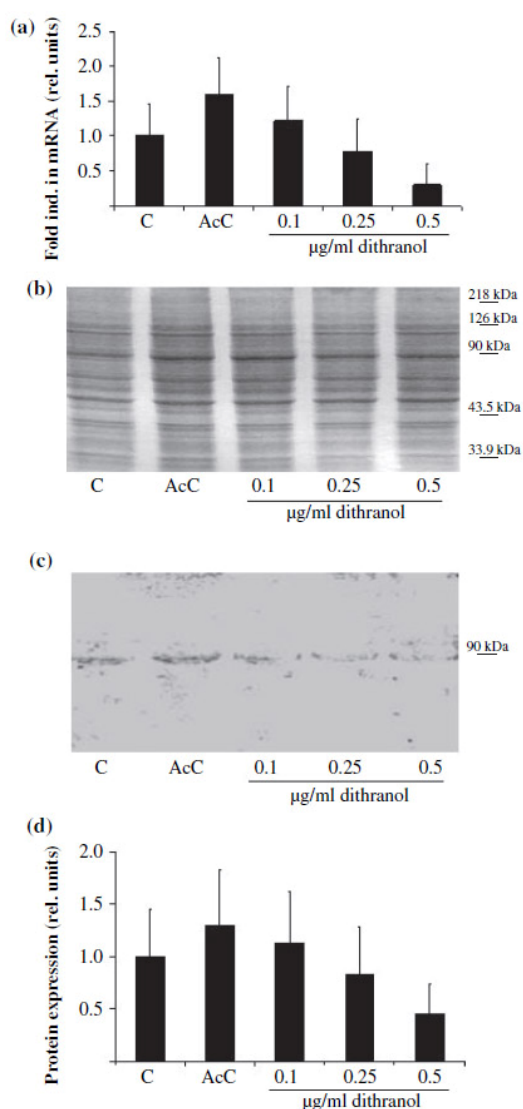


5.1.4/3 ábra. Az FGFR2-IIIb expressziója csökken a HaCaT kartinociták szuszpenzió indukált differenciálódása során. Aktívan proliferáló HaCaT keratinocitákat sejtenyészítő és bakteriális tenyésztő edényekbe passzáltunk, majd a jelzett időpontokban mintákat vettünk. (a) Az FGFR2-IIIb mRNA expresszióját Q-RT-PCR módszerrel mértük, majd a 18S RNS expressziójával normalizáltuk. A grafikonon ábrázolt relatív expressziós értékeket a passzálás előtti sejtekben mért adatokhoz viszonyítva adtuk meg. Az ábrázolt értékeket három független kísérlet átlagolt adataiból számoltuk ki (\pm SE) (ANOVA analízis 48 óránál, $p=0,0359$; 72 óránál $p=0,0315$). (b) Az FGFR2-IIIb fehérje mennyiségi változásainak követéséhez a jelölt időpontokban mintákat vettünk, melyeket SDS-PAGE gélen megfuttattunk, majd CBB festékkel megfestettünk. A gélkép egyenletes mintafelvitelt mutat. (c) Azonos mennyiségű fehérjemintákat nitrocellulóz membránra vittünk át, majd Western blott vizsgálatot végeztünk a rendelkezésünkre álló nyúl poliklonális ellenanyaggal. A 90 KDa magasságában jelentkező csík az FGFR2-IIIb specifikus detektálását jelzi. (d) A CBB gélen kiválasztottunk három konstansan megjelenő csíkot, denzitometriával meghatároztuk az intenzitásukat, kiszámoltuk az átlagukat és ezzel az értékkel normalizáltuk a Western blotton kapott FGFR2-IIIb specifikus csíkok intenzitását. A grafikonon ábrázolt relatív fehérje expressziós értékeket a passzálás előtti sejtekben (C) mért adatokhoz viszonyítva adtuk meg. Az ábrázolt értékeket két független kísérlet átlagolt adataiból számoltuk (\pm SE) (ANOVA analízis 48 óránál $p=0,0242$).

Egy másik kísérleti megközelítésben azt vizsgáltuk, hogy hogyan változik az FGFR2-IIIb magas szintű expressziója, ha az aktívan proliferáló HaCaT keratinociták tenyésztési körülményeit oly módon változtatjuk meg, hogy azokat differenciációra készítjük, vagy anti-proliferatív hatású anyaggal kezeljük.

Az egyik kísérletben a szemi-konfluens HaCaT keratinociták tenyészetének egyik felét sejtenyészítésre alkalmas Petri-csészékbe passzáltuk, ahol lehetőségük volt ismét letapadni és proliferálni. A tenyészet másik felét olyan Petri-csészébe passzáltuk, amelynek felszínét nem kezelték a sejtek letapadását elősegítő anyaggal, (ezeket a csészéket a laboratóriumokban baktériumok és gombák tenyésztésére használják), így a frissen átpasszált sejteknek nincs lehetőségük letapadni, hanem szuszpenzióban maradnak. Jól ismert tény, hogy az adherens sejtekben a letapadás megakadályozása azok differenciációját, majd anoikozisát indukálja. Arra voltunk tehát kíváncsiak, hogy egy ilyen kísérleti rendszerben hogyan változik az FGFR2-IIIb expressziója, vajon az aktív

proliferáció gátlása hogyan hat annak expressziós szintjére. Az FGFR2-IIIb-vel párhuzamosan vizsgáltuk a K10 differenciációs marker expresszióját is a HaCaT keratinocitákban. Eredményeink szerint az FGFR2-IIIb expressziója mind mRNS, mind fehérje szinten nagymértékben lecsökkent a szuszpenzió indukálta differenciáció folyamán (5.1.4/3 ábra): a legkifejezettebb különbséget a 48 és 72 órás minták mutatták a sejtenyészítő edénybe és a bakteriális edénybe passzált HaCaT sejtek között. Az FGFR2-IIIb expressziójával ellenkező kifejeződési mintázatot mutatott a K10 differenciációs marker mind mRNS, mind fehérje szinten. A sejtenyészítő edénybe passzált HaCaT sejtekben a K10 mRNS expressziója nem is volt detektálható, míg a bakteriális edényben, szuszpenzióban növekvő sejtekben megemelkedett a K10 mRNS szintje. A K10 fehérje szintje a sejtenyészítő edényben tartott sejtekben fokozatosan csökkent, míg a szuszpenzió-indukált differenciálódó HaCaT keratinocitákban fokozatosan emelkedett (az adatokat nem mutatom).



5.1.4/4 Az antipszoriátikus hatású dithranol dóziszfüggő módon csökkenti az FGFR2-IIIb expresszióját. Aktívan proliferáló HaCaT sejteket kezeltünk acetóban feloldott (Ac) dithranollal a jelölt koncentrációkban 30 percen keresztül, a dithranol tartalmazó tápfolyadékot eltávolítottuk, további 4 órán keresztül tenyésztettük a sejteket, majd mintákat vettünk Q-RT-PCR vizsgálatokhoz és Western blot analízisekhez. (a) Az FGFR2-IIIb mRNS expresszióját Q-RT-PCR módszerrel mértük, majd a 18S RNS expressziójával normalizáltuk. A grafikonon ábrázolt relatív expressziós értékeket az acetonmentes tápfolyadékban tenyésztett sejtekben (C) mért adatokhoz viszonyítva adtuk meg. Az ábrázolt értékeket három független kísérlet átlagolt adataiból számoltuk ki (\pm SE) (b) Az FGFR2-IIIb fehérje mennyiségi változásainak követéséhez mintákat vettünk, melyeket SDS-PAGE gélen megfuttattunk, majd CBB festékkel megfestettünk. A gélkép egyenletes mintafelvitelt mutat. (c) Azonos mennyiségű fehérjemintákat nitrocellulóz membránra vittünk át, majd Western blot vizsgálatot végeztünk a rendelkezésünkre álló nyúl poliklonális ellenanyaggal. A 90 kDa magasságában jelentkező csík az FGFR2-IIIb specifikus detektálását jelzi. (d) A CBB gélen kiválasztottunk három konstansan megjelenő csíkot, denzitometriával meghatároztuk az intenzitásukat, kiszámoltuk az átlagukat és ezzel az értékkel normalizáltuk a Western bloton kapott FGFR2-IIIb specifikus csíkok intenzitásait. A grafikonon ábrázolt relatív fehérje expressziós értékeket az aceton mentes tápfolyadékban tenyésztett sejtekben (C) mért adatokhoz viszonyítva adtuk meg. Az ábrázolt értékeket két független kísérlet átlagolt adataiból számoltuk (\pm SE)

Másik kísérletünkben a pikkelysömör kezelésében használt anti-proliferatív hatású dithranollal kezeltünk a HaCaT sejteket és vizsgáltuk FGFR2-IIIb expressziójukat. Azt tapasztaltuk (5.1.4/4 ábra), hogy dithranol hatására az FGFR2-IIIb expressziója mind mRNS, mind fehérje szinten dóziszfüggő csökkenést mutatott.

A fenti két kísérletben tehát bizonyítottuk, hogy ha a HaCaT sejtek proliferációját gátoljuk, vagy ha tenyésztési körülményeiket úgy befolyásoljuk, hogy differenciációjukat indukáljuk, az FGFR2-IIIb expressziója nagymértékben lecsökken. Ezeknek a kísérleteknek az eredményei, valamint a szinkronizált HaCaT keratinociták vizsgálata során szerzett adataink mind arra utalnak, hogy az FGFR2-IIIb expressziója a keratinociták aktívan proliferáló állapotát jellemzi, és cáfolják azt a korábban felvetett tézist (Capone és mtsai, 2000; Marchese és mtsai, 1997; Visco és mtsai, 2004), miszerint a receptor a differenciálódó keratinocitákban indukálna. Kimutattuk továbbá azt is, hogy az FGFR2-IIIb mRNS expressziója nem csupán a hiperproliferációval jellemzett tünetes keratinocitákban, hanem a tünetmentes epidermisz pre-aktivált állapotban levő keratinocitáiban is magasabb szinten expresszálódik, mint az egészséges epidermiszben, ez alapján feltételezzük, hogy az emelkedett FGFR2-IIIb kifejeződés hozzájárulhat a tünetmentes keratinociták külső hatásokra adott emelkedett proliferációs válaszkészségéhez.

5.1.5. A D típusú ciklinek a sejtciklus különböző szakaszaiban töltnek be szabályozó szerepet, és expressziójuk különbségeket mutat pikkelysömörben

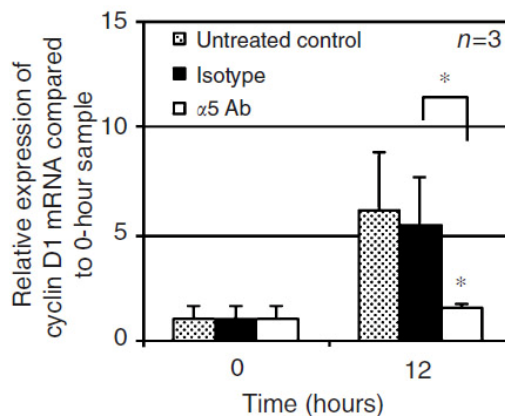
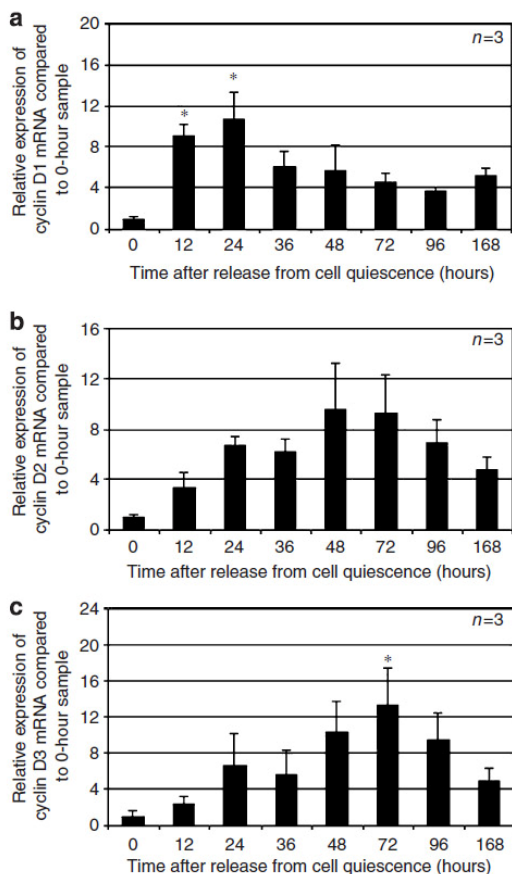
Munkánk korai szakaszában, amikor a szinkronizált HaCaT sejtek modell rendszere kidolgozásra került (Pivarcsi és mtsai, 2001), ill. amikor az acetone és az etilalkohol keratinocita proliferációra gyakorolt hatását tanulmányoztuk (Farkas és mtsai, 2003), már vizsgáltuk a D1 ciklin mRNS expresszióját. Megállapítottuk, hogy a D1 ciklin mRNS magas szintű expressziója a proliferáló HaCaT sejtekben volt a legmagasabb, valamint hogy a HaCaT sejtek növekedését indukáló acetone és etilalkohol a D1 ciklin mRNS expresszióját is indukálja. Ezeket a megállapításainkat agaróz gélen detektált reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR) vizsgálataink eredményei alapján tettük. Munkacsoportunk saját eredményei (Bata-Csörgő és mtsai, 1996) és irodalmi adatok (Bartkova és mtsai, 1998; Xu és mtsai, 2003) is arra utaltak, hogy a D típusú ciklinek (D1, D2 és D3 ciklin,) a sejtciklus különböző szakaszaiban töltnek be szabályozó funkciót. Ezért elhatároztuk, hogy az időközben a laboratóriumunkban bevezetésre került kvantitatív

reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (Q-RT-PCR) segítségével részletesen elemezzük a D típusú ciklinek mRNS expresszióját szinkronizált HaCaT sejtekben, valamint megvizsgáljuk annak a lehetőségét is, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz keratinocitáin abnormálisan magasan kifejeződő $\alpha 5$ integrinnek van-e szerepe a D1 ciklin expressziójának szabályozásában. Végezetül arra is kíváncsiak voltunk, hogy vajon pikkelysömörben látunk-e különbségeket a különböző D típusú ciklinek mRNS és fehérje expressziójában.

Q-RT-PCR kísérleteink eredményei szerint (5.1.5/1 ábra) a sejtnyugalmi fázisból kilépő (0h) HaCaT sejtekben a D1 ciklin expressziója nagyon alacsony volt, majd mértéke ugrásszerűen megnövekedett 12 és 24 órával a sejtnyugalmi fázisból való kilépést követően. Eredményeink tehát arra utaltak, hogy a D1 ciklin mRNS expressziója akkor a legmagasabb, amikor a sejtek szinkron elkezdnek osztódni, majd expressziója a 24. órát követően egyre alacsonyabb lett. Ez az eredményünk jó egyezést mutatott a korábbi, agaróz gélen detektált RT-PCR kísérleteink eredményeivel. A ciklin D2 és D3 mRNS-ek kifejeződési mintázata eltért a D1 ciklin esetében tapasztaltakétól. A D2 és D3 ciklin mRNS-ek is igen alacsony szinten fejeződtek ki a sejtnyugalmi fázisban lévő HaCaT sejtekben (0h), expressziójuk mértéke egyenletesen növekedett és a sejtnyugalmi fázisból való kilépést követő 48 ill. 72 óránál érte el maximumát, majd fokozatosan csökkent (96 és 168 h). Áramlásos citometriai méréseink fehérje szinten is megerősítették a fent ismertetett expressziós változásokat. Eredményeink szerint a D típusú ciklinek a szinkronizált HaCaT sejtek kultúrájában különböző időpontokban fejeződnek ki magas szinten, ami arra utal, hogy a sejtciklus különböző stádiumaiban töltenek be szabályozó szerepet.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az $\alpha 5$ integrin által mediált jelátviteli utak vajon szabályozzák-e a D típusú ciklinek mRNS expresszióját. Kísérleteinket úgy végeztük, hogy a HaCaT keratinocitákat szinkronizáltuk, szérumot tartalmazó táptalajba átpasszáltuk és öt órán keresztül hagytuk őket letapadni, majd a sejtekhez $\alpha 5$ integrin neutralizáló ellenanyagot adtunk. A neutralizáló ellenanyagot azért nem közvetlenül a szétpasszálás után adtuk a sejtekhez, mert a letapadás folyamatát nem akartuk befolyásolni az $\alpha 5$ integrin neutralizálásával. A sejteket ezt követően 7 órán keresztül inkubáltuk a neutralizáló ellenanyaggal, majd Q-RT-PCR módszerrel megvizsgáltuk a D1, D2 és D3 ciklinek expresszióját. A D2 és D3 ciklinek mRNS expresszióját nem befolyásolta az $\alpha 5$ integrin neutralizáló ellenanyaggal való kezelés (az adatokat nem mutatom be), a D1 ciklin kifejeződése azonban szignifikáns módon lecsökkent a kezelés hatására, a kezeletlen és az izotípus ellenanyaggal kezelt sejtekkel összevetve (5.1.5/2 ábra). Eredményeink arra

utalnak, hogy a D típusú ciklinek szabályozásában különböző jelátviteli útvonalak vesznek részt: az $\alpha 5$ integrin mediált jelátviteli folyamatok szerepet játszanak a D1 ciklin szabályozásban, míg a D2 és D3 ciklinekben feltehetően nem.

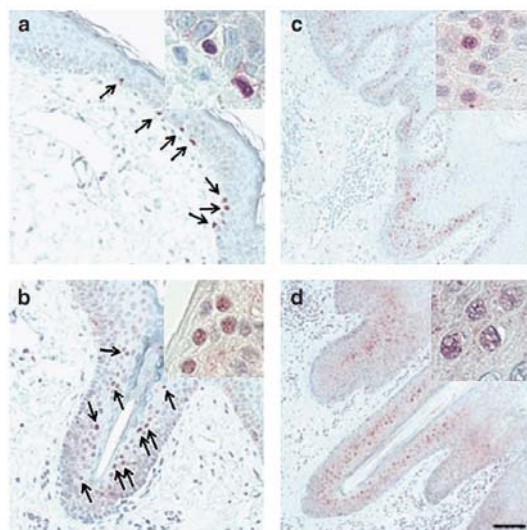
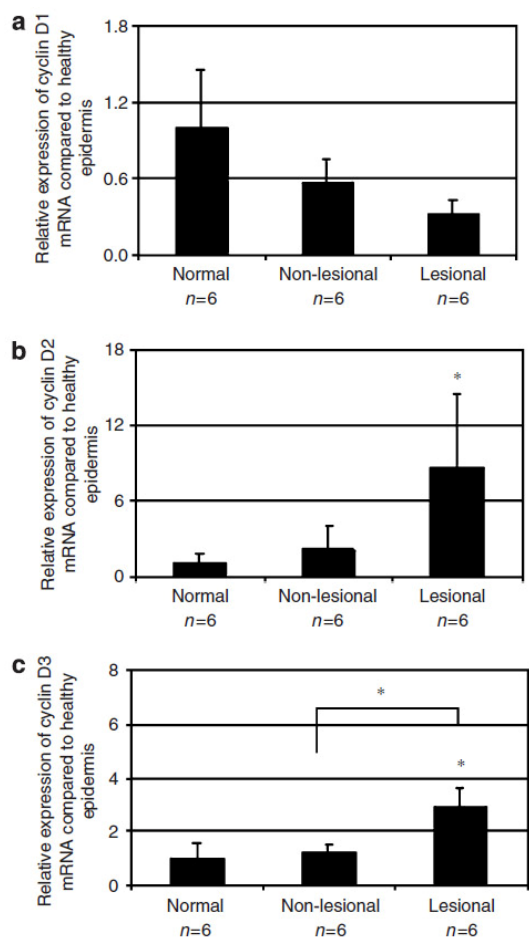


5.1.5/2 Az $\alpha 5$ integrin funkciójának blokkolása a HaCaT sejtek letapadását követően csökkenti a sejtek D1 ciklin mRNS expresszióját. Az $\alpha 5$ integrint neutralizáló monoklonális ellenanyagot a tenyésztőedény aljára éppen letapadt, előzőleg szinkronizált és a sejtnyugalmi fázist elhagyó HaCaT keratinocitákhoz adtuk. A neutralizáló ellenanyag D1 ciklin mRNS expresszióra gyakorolt hatását Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. Az ábrázolt relatív génexpressziós adatokat a kezeletlen (0h) mintákban mért adatokhoz viszonyítva kaptuk (n=3) (átlag \pm SD * $P < 0,05$, Mann-Whitney U-teszt)

5.1.5/1 ábra. A D1, D2 és D3 ciklinek mRNS expressziója szinkronizált HaCaT sejtekben. HaCaT keratinocitákat (n=3) szinkronizáltunk szérumeheztetéssel és kontaktgátlással, majd szérumot tartalmazó táptalajba való passzálással arra készítettük őket, hogy kilépjenek a sejtnyugalmi fázisból és osztódni kezdjenek. A D1, D2 és D3 ciklin mRNS szintek változásait Q-RT-PCR módszerrel mértük a jelzett időpontokban (a-c). Az ábrázolt relatív génexpressziós adatokat a sejtnyugalmi fázisban (0h) levő sejtek mintáiban mért adatokhoz viszonyítva kaptuk (átlag \pm SD * $P < 0,05$, Dunnet's teszt).

Miután azt találtuk, hogy a D típusú ciklinek expressziójának szabályozása HaCaT sejtekben eltér, azt is megvizsgáltuk, hogy vajon pikkelysömörben különbözik-e mRNS és fehérje szintű kifejeződésük. Q-RT-PCR méréseink eredményei szerint (5.1.5/3 ábra) a D1 ciklin expressziója mind a pikkelysömörös tünetes, mind a tünetmentes epidermiszben alacsonyabb volt, mint az egészséges epidermiszben; míg a ciklin D2 és D3 mRNS-ek szignifikánsan magasabb szinten fejeződtek ki a tünetes epidermiszben, mind a tünetmentes, mind az egészséges epidermiszhez viszonyítva. Génexpressziós vizsgálatunk eredményeinek megerősítésére kétféle fehérje expressziós módszert is alkalmaztunk. Áramlási citometriás méréseink szerint a D típusú ciklinek különböző mértékben fejeződnek ki a keratinocitákban, eltérést azonban az egészséges, pikkelysömör tünetes és

tünetmentes epidermiszből izolált keratinocitákon nem tudunk detektálni (az adatokat nem mutatom).



5.1.5/4 ábra. A D1 és D3 ciklinek kimutatása immunhisztokémiával egészséges és pikkelysömörös tünetes epidermiszben. A D1 ciklint kifejező sejtek száma igen alacsony, a festődés citoplazmás és az egészséges epidermisz bazális sejteire jellemző (a). A tünetes pikkelysömörös epidermiszben mind a bazális, mind a szuprabazális sejtekben kimutatható a D1 ciklin kifejeződése, a festődés a sejtmagban erős, a citoplazmában gyengébb (c). D3 ciklin festődést a sejtmagban, és a citoplazmában is ki tudunk mutatni, de ez az expresszió kizárólag a szórtüszők szuprabazális sejteiben volt megfigyelhető mind az egészséges (b), mind a pikkelysömörös tünetes (d) bőrben. Az ábrázolt egység = 50 μ m. A jobb felső sarokban bemutatott részletek nagyítása 40X.

5.1.5/3 ábra. A D1, D2 és D3 ciklin mRNS-ek expressziója pikkelysömörös tünetes, tünetmentes és egészséges epidermiszben. A D1 (a), a D2 (b) és a D3 (c) ciklin mRNS-ek expresszióját Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk egészséges (n=6), pikkelysömörös tünetmentes (n=6) és tünetes (n=6) epidermisz mintákban. Az ábrázolt relatív génexpressziós adatokat az egészséges epidermisz mintákban mért adatokhoz viszonyítva kaptuk (átlag \pm SD * P <0,05, Student's teszt).

Immunhisztokémiai vizsgálatainkkal a D1 ciklin és D3 ciklin fehérjéket detektálni tudtuk az egészséges és a pikkelysömörös mintákban. D2 ciklint nem tudunk kimutatni a mintákban, melynek oka nem technikai okokra volt visszavezethető, mivel a pozitív kontroll melanoma és elszarusodó laphámrák mintákban ugyanazzal az eljárással tudtuk detektálni a ciklin D3-at kifejező sejteket. Immunhisztokémiai vizsgálataink tanúsága szerint (5.1.5/4 ábra) az egészséges epidermiszben kizárólag magi festődést tapasztaltunk és csak nagyon kisszámú sejt festődött a bazális és a szuprabazális rétegekben. A tünetes epidermiszben ellenben nem csupán magi, hanem kismértékű citoplazmás festődést is megfigyeltünk, és a D1 ciklin pozitív sejtek száma jóval magasabb volt, mint az egészséges epidermiszben. D3 ciklin festődést mind a sejtmagban, mind a citoplazmában kimutattunk az egészséges epidermiszben, de kizárólag a folliculusok szuprabazális

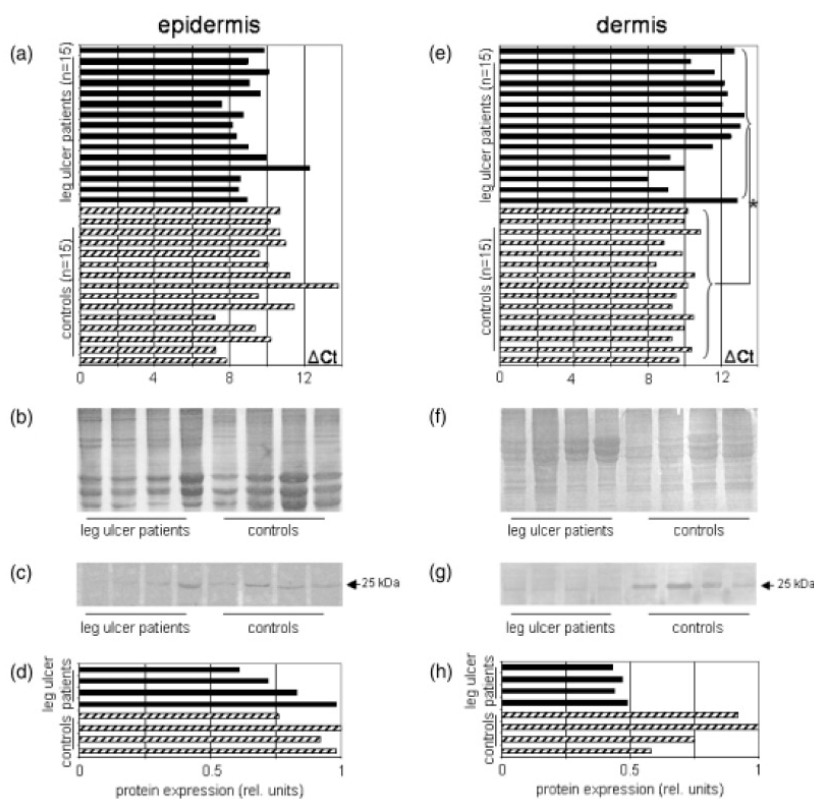
rétegeiben, az interfollikuláris területeken nem. A D3 ciklin pozitív sejtek száma nem volt magasabb a pikkelysömörös tünetes epidermiszben, mint az egészséges epidermiszben.

5.1.6. A szindekán-4 heparán szulfát proteoglikán alacsony expressziója a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek tünetmentes bőrében hozzájárulhat a betegségre való hajlam kialakításához

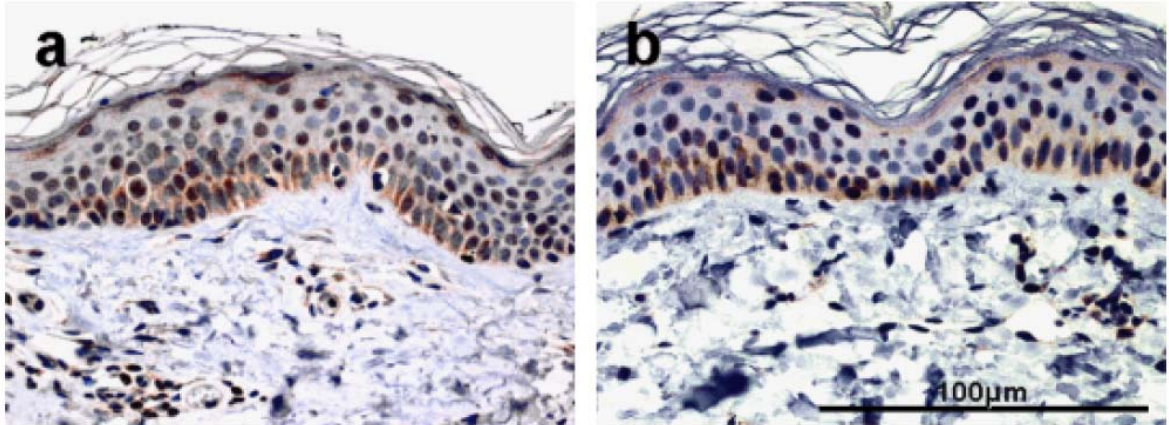
A vénás eredetű lábszárfekély, hasonlóan a pikkelysömörhöz, multifaktoriális bőrbetegség. Ismert, hogy a betegség pathogenezisében rendkívül fontos szerepet játszanak a környezeti faktorok, de genetikai predisponáló faktorok is részt vesznek a betegségre való hajlam kialakításában (Wallace és mtsai, 2006); erre vonatkozóan az utóbbi években saját közleményeink is jelentek meg (Nagy és mtsai, 2005; Nagy és mtsai, 2007). A vénás eredetű lábszárfekély pathomechanizmusának megértéséhez nagymértékben hozzájárulhatnak azok a kísérletek, amelyek a normál sebgyógyulásban szerepet játszó molekuláris folyamatokat vizsgálják a zavart sebgyógyulással jellemzett vénás eredetű lábszárfekélyben. Mivel lábszárfekélyben végzett polimorfizmus vizsgálataink középpontjában az FGFR2 receptor molekula állt, elhatároztuk, hogy olyan molekulák expressziójának rendellenességeit próbáljuk feltárni ebben a kórképben, amelyek funkcionális kapcsolatban állnak az FGF/FGFR2 ligand-receptor rendszerrel. Így esett a választásunk a szindekán-4 heparán szulfát proteoglikánra és a neurofilin-1-re. A szindekán-4 molekuláról ismert, hogy az FGFR2 ko-receptora és egyaránt képes kötődni az FGF2-höz és az FGFR2-höz, valamint magas szintű kifejeződése indukálja az FGF2/FGFR2 mediált jelátviteli mechanizmusokat (Mundhenke és mtsai, 2002; Zhang és mtsai, 2003). A neurofilinnek, melynek expresszióját mindeddig neuronokban, endotél sejtekben és keratinocitákban írták le (Gagnon és mtsai, 2000), két ligandja van: az egyik a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), a másik az FGF2. Mindkét molekuláról ismert továbbá, hogy szerepet játszanak a normál sebgyógyulásban (Echtermeyer és mtsai, 2001; Heldin and Westermark, 1999; Kurschat és mtsai, 2006; Mundhenke és mtsai, 2002; Takashima és mtsai, 2002), a szindekán-4-gyel kapcsolatosan pedig olyan adat is a rendelkezésünkre állt, miszerint a fekélyes sebszélről származó mintákban a szindekán-4 fehérje intracelluláris lokalizációja eltér az egészséges bőrben tapasztaltakétól (Lundqvist és Schmidtchen, 2001). Azzal kapcsolatosan azonban még senki nem végzett vizsgálatokat, hogy a szindekán-4 és/vagy a neurofilin-1 molekulák mutatnak-e eltérő expressziót a lábszárfekélyes betegek tünetmentes bőrében, amellyel hozzájárulnak a

betegségre való hajlam kialakításához. Kísérleteinkben megvizsgáltuk tehát, hogy van-e különbség a szindekán-4 és a neurofilin-1 mRNS és fehérje szintű expressziójában az egészséges és tünetmentes bőrben.

Q-RT-PCR és Western blott kísérleteinket Dispase-zal szétválasztott epidermisz és dermisz mintákon végeztük el. Eredményeink szerint a szindekán-4 expressziója mind mRNS, mind fehérje szinten alacsonyabbnak bizonyult a vénás lábszárfekélyben szenvedő betegek tünetmentes dermiszében, mint az egészséges dermiszben, ugyanakkor az epidermiszben nem tapasztaltunk különbséget (5.1.6/1 ábra). Immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei (5.1.6/2 ábra) megerősítették a Western blottal kapott adatokat: az epidermiszben nem tapasztaltunk különbséget a festődés intenzitásában vagy eloszlásában, a dermiszben azonban, ahol a fibroblasztok, a perikapillaris gyulladásos sejtek, valamint a kapillaris endotél mutatott pozitivitást, a tünetmentes bőr esetén valamivel alacsonyabb szintű festődést láttunk, mint az egészséges bőrben. A neurofilin-1 esetében nem találtunk sem mRNS, sem fehérje szintű expressziós különbséget az egészséges bőr és a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőre között, melyet immunhisztokémiai vizsgálataink eredménye is megerősített (az eredményeket nem mutatom).



5.1.6/1 ábra. A szindekán-4 expressziója vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők bőrében. Gén- és fehérje expressziós vizsgálatokat egészséges és vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrén végeztünk, külön a dermiszben és az epidermiszben. A szindekán-4 mRNS expressziót Q-RT-PCR módszerrel mértünk, az adatokat a 18S RNS expressziójával normalizáltuk, külön az epidermiszben (a) és a dermiszben (e). A dermiszben szignifikánsan alacsonyabb szindekán-4 mRNS expressziót detektáltunk a vénás lábszárfekélyben szenvedőktől vett mintákban (n=15), mint az egészséges egyénektől vett mintákban (n=15) (egyutas ANOVA $p=0,0136$), de az epidermisz minták között nem detektáltunk expresszió különbséget. CBB festéssel ellenőriztük az epidermiszből (b) és a dermiszből (f) izolált fehérje minták egyenletes mintafelvitelét. A szindekán-4 fehérje expresszióját Western blott módszerrel vizsgáltuk. A szindekán-4 fehérje molekula tömege 25 kDa, amelyet mind az epidermiszben (c), mind a dermiszben (g) detektáltunk. A szindekán-4 fehérje szintjét Western blottok szemikvantitatív analízise nem mutatott különbséget az epidermisz mintákban (d), a dermisz mintákban (h) azonban szignifikáns különbséget láttunk az egészséges egyénektől (n=4) és a lábszárfekélyes betegektől (n=4) származó mintákban (egyutas ANOVA $p=0,0432$).



5.1.6/2 ábra. A szindekán-4 fehérje expressziójának vizsgálata immunhisztokémiával vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrén. A bemutatott ábra három független bőrmintán kapott eredményeinket reprezentálja. A szindekán-4 fehérje az egészséges (a) és a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes epidermiszében (b) a bazális és a szuprabazális keratinocitákban fejeződik ki, elsősorban citoplazmás és sejtmag körüli festődést figyeltünk meg. Az egészséges bőrben és a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrén a dermiszben a fibroblasztok, a perikapilláris gyulladós sejtek és a kapillaris endotél mutatott pozitivitást. A dermisz szemi-kvantitatív analízisének eredménye szerint a szindekán-4 alacsonyabb szinten fejeződik ki a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrén, mint az egészséges bőrben. Az ábrázolt egység = 100 µm.

Eredményeink arra utalnak, hogy a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes dermiszében tapasztalható alacsonyabb szintű szindekán-4 expresszió hozzájárulhat a betegség pathomechanizmusához, a krónikus sebgyógyulásra való hajlam kialakításához.

5.2. Multifaktoriális bőrbetegségekre hajlamosító polimorfizmusok azonosítása és vizsgálata

Mutáció és polimorfizmus vizsgálatokat három multifaktoriális bőrgyógyászati kórkép, a malignus melanoma, a vénás eredetű lábszárfekély és a vitiligo esetében végeztünk. Melanomában végzett kutatásainknak az volt célja, hogy a sejtciklus szabályozásban fontos szerepet játszó és a malignus melanoma pathogenezisében bizonyítottan részt vevő ciklin dependens kináz 2A (CDKN2A) gén mutációit vizsgáljuk a Klinikánk gondozásában álló, familiáris melanomában szenvedő betegeknél és családtagjaiknál. Mind a vitiligo, mind a vénás eredetű lábszárfekély esetében ismert, hogy kóros immunfolyamatok is hozzájárulnak a betegség kialakulásához. A vitiligo esetében azt vizsgáltuk, hogy a elsődlegesen melanocitákban kifejeződő α -melanocita stimuláló hormon receptort (MSHR) kódoló melanokortin-1 receptor (MC1R) génen tudunk-e olyan polimorfizmust azonosítani, amely a fehérje antigenicitási sajátosságainak megváltozásához vezet és a vitiligóban ismert destruktív autoimmun folyamatokat indukálja. Vénás eredetű lábszárfekélyben két lehetséges pathogenetikai tényezőt elemeztük: egyrészt a normál sebgyógyulás folyamatában bizonyítottan szerepet játszó tumor nekrozis faktor α (TNF α) gén egy promóter polimorfizmusának hajlamosító szerepét tisztáztuk, másrészt azt vizsgáltuk, hogy a fibroblaszt növekedési faktor receptor 2 (FGFR2) polimorfizmusai lehetnek-e hajlamosító genetikai faktorok ennek a kórképnek a kialakításában.

5.2.1. A melanokortin-1 receptor gén Arg160Trp polimorfizmusa protektív genetikai faktor a vitiligo pathogenezisében

Mivel a vitiligóban a destruktív autoimmun folyamatok célsejtjei a melanociták, feltételeztük, hogy melanocita-specifikus autoantigének szerepet játszhatnak a betegség pathogenezisében. Célunk tehát az volt, hogy olyan gének polimorfizmusait vizsgáljuk, amelyek bizonyítottan elsősorban melanocitákon fejeződnek ki, és az általuk kódolt fehérjék egyes szakaszai autoantigénként szerepelhetnek. Választásunk az MC1R géne esett, amely a melanociták MSHR fehérjéjét kódolja. Ismert, hogy az MC1R gén és annak polimorfizmusai fontos szerepet játszanak a humán pigmentáció kialakításában (Garcia-Borron és mtsai, 2005). Kutatásaink tehát két irányban folytak: egyrészt megvizsgáltuk (Magyarországon elsőként), hogy az MC1R polimorfizmusok hogyan vesznek részt a

magyar lakosság pigmentációjának kialakításában; másrészt az is elemeztük, hogy ugyanezek a polimorfizmusok allél frekvenciái eltérnek-e az egészséges egyének és a vitiligos betegek csoportjaiban, lehetnek-e a betegségre hajlamosító genetikai faktorok.

A vizsgálatokba 164 vitiligós beteget vontunk be, adataikat táblázatban összesítettem (5.2.1/1 táblázat). Ezek tanúsága szerint a nők körében gyakoribb a vitiligo, valamint gyakrabban számoltak be társuló egyéb autoimmun betegségről is. A betegség szignifikánsan ($P = 0,0002$) hosszabb ideje állt fenn a vizsgálatba bevont nőbetegek esetében, mint a férfibetegekében. Mivel a nők (35 év) és a férfiak (39 év) átlag életkora közel azonos volt, ez az adat azt sugallja, hogy a nők esetében a betegség fiatalabb életkorban kezdődik. A betegek 30%-a számolt be a vitiligo családi előfordulásáról; ez az adat megfelel az irodalomban korábban közölteknek, valamint ez a penetrancia nagyon jellemző a multifaktoriális/multigenikus betegségekre, amelyek közé a vitiligo is tartozik.

Rögzítettük a vizsgálatba bevont vitiligós betegek és egészséges egyének bőrszínét (Fitzpatrick besorolás I, II, III és IV). Annak érdekében, hogy összehasonlításainkat homogén betegcsoportokon tudjuk elvégezni, a genetikai adatok elemzéséhez olyan csoportokat alakítottunk ki a betegek és az egészségesek köréből, amelyekben a világos (Fitzpatrick I és II) és sötétebb (Fitzpatrick III és IV) bőrűek egyforma arányban fordultak elő. Eredményeink alapján azt a megállapítást tettük, hogy a vitiligós betegek között jóval magasabb volt a sötétebb (Fitzpatrick III és IV) bőrűek aránya, mint az egészségesek körében.

| Vitiligo patients (n = 164) | Gender | |
|---------------------------------|--------|------|
| | Women | Men |
| Average age, years | 60% | 40% |
| Duration of symptoms, years (%) | 39 | 35 |
| <1 | 4.3 | 18.2 |
| 1-5 | 36.2 | 37.6 |
| 5-10 | 14.5 | 15.0 |
| > 10 | 45.0 | 18.2 |
| Other autoimmune diseases | 26.6 | 10.8 |
| Family history (%) | | |
| Yes | 27.8 | 31.2 |
| No | 72.2 | 68.8 |

5.2.1/1 táblázat. A vizsgálatba bevont vitiligos betegek klinikai jellemzése

| MC1R allele | Skin type | | Hair color | | Eye color | |
|-------------|-------------------|---------------------|------------|------|-----------|------|
| | Fitzpatrick I, II | Fitzpatrick III, IV | Fair | Dark | Fair | Dark |
| Val60Leu | 0.13 | 0.10 | 0.11 | 0.11 | 0.13 | 0.08 |
| Val92Met | 0.09 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 |
| Arg151Cys | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.05 | 0.03 | 0.05 |
| Arg160Trp | 0.13 | 0.04 | 0.05 | 0.02 | 0.06 | 0.04 |
| Arg163Gln | 0.06 | 0.05 | 0.04 | 0.09 | 0.03 | 0.08 |

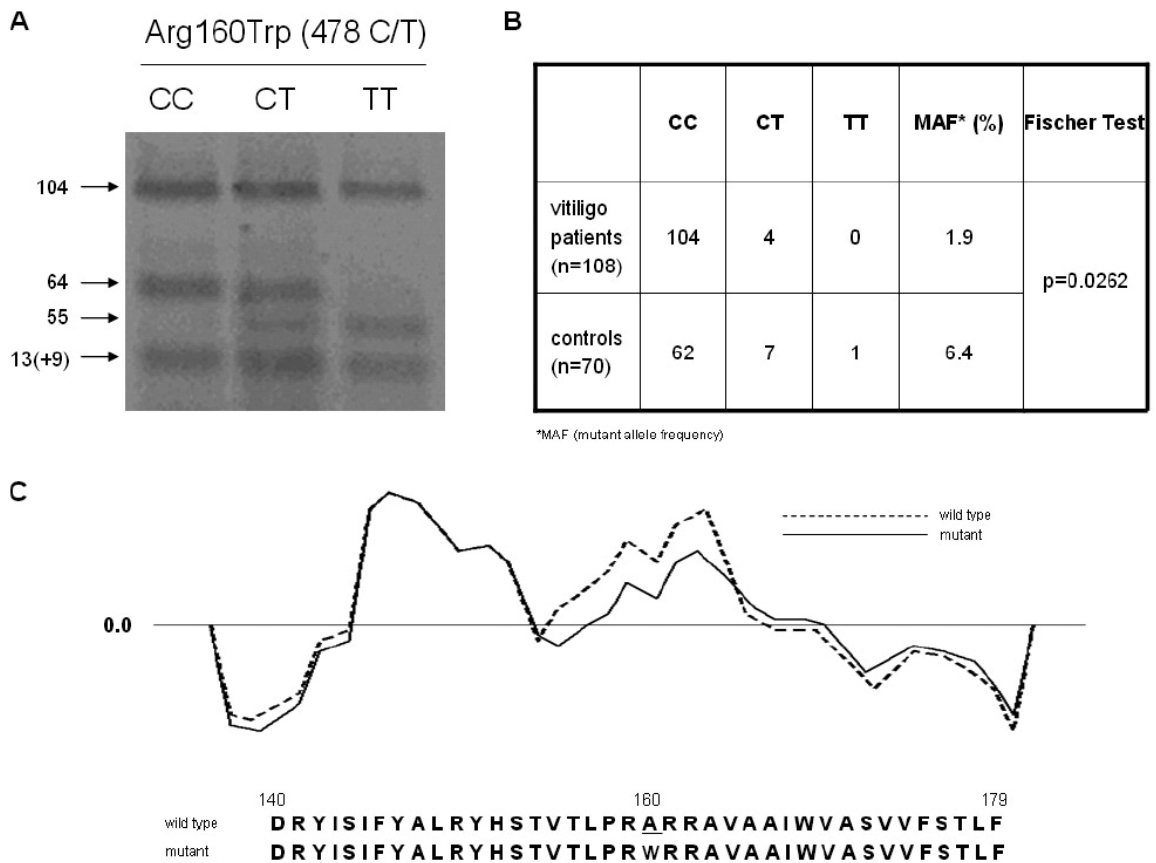
5.2.1/2 táblázat. A vizsgált öt MC1R polimorfizmus allélfrekvenciái a különböző bőr-, haj- és szemszínű magyar egyéneknél.

Az MC1R gén polimorfizmusainak azonosítását szekvenálással végeztük, 230 egyén (164 vitiligós beteg és 66 egészséges) bevonásával. Vizsgálatuk során 10 MC1R polimorfizmust azonosítottunk, melyek közül ötnek az allél frekvenciája alacsonyabb volt, mint 0,01, ezeket a további analíziseinkből kizártuk. Ezek között szerepelt egy új polimorfizmus is (Gly89Arg), amelyet eddig még nem írtak le az irodalomban. Olyan ritka

polimorfizmust is találtunk (Gln233Gln) a magyar populációban, amelyet mindeddig egyszer említettek egy szardíniai egyén esetében. Végezetül öt polimorfizmus – Val60Leu, Val92Met, Arg151Cys, Arg160Trp és Arg163Gln – allél frekvenciáit vetettük össze a vizsgált sötét és a világos bőrű egyének között, oly módon, hogy az összehasonlításokba a haj és a szemszínre vonatkozó adatokat is bevontuk. Eredményeink szerint a vizsgált polimorfizmusok közül az Arg160Trp polimorfizmus allél frekvenciája szignifikánsan ($P = 0,0243$, OR [95% CI] = 4.3 [0,0173-0,04198]) eltért a sötét és a világos bőrű egyének között (5.2.1/2 táblázat).

Szekvenálási vizsgálataink adatait oly módon is kiértékeljük, hogy összevetettük a fenti öt MC1R polimorfizmus allél frekvenciáját világos és sötét bőrszínű vitiligos betegekben és egészséges egyénekben. Mivel a sötét bőrszínű egyének száma igen alacsony volt, a genotípus adatok statisztikai feldolgozása ezekben a csoportokban nem vezetett értékelhető konklúzióra. A világos bőrszínűek körében elvégzett statisztikai elemzések szerint azonban az Arg160Trp polimorfizmus allél frekvenciája különbséget mutatott a vitiligos betegek és az egészségesek közötti összehasonlításban. A polimorfizmus detektálására ezért kidolgozunk egy PCR-RFLP módszert, mellyel jóval egyszerűbben lehet a vizsgálatokat elvégezni, mint a szekvenálással (5.2.1/1 ábra; A panel).

Végezetül 108 világos bőrszínű vitiligos beteg és 70 világos bőrszínű egészséges egyén szekvenálással és PCR-RFLP-vel kapott Arg160Trp genotípus adatait összesítettük. Az adatok statisztikai kiértékelése szerint a mutáns allél szignifikánsan ($P = 0,0262$, OR [95% CI] = 3,6 [0,0046-0,1003]) magasabb arányban fordul elő az egészséges egyének körében, mint a vitiligos betegek között (5.2.1 ábra; B panel). Adataink tehát arra utalnak, hogy az MC1R gén Arg160Trp polimorfizmusa a vitiligo kialakulása szempontjából protektív genetikai faktorként működik. Ezt a feltételezésünket erősíti azon *in silico* analízis eredménye is, amely során a vad típusú és a polimorf génszakasz által kódolt fehérje részlet antigenicitási paramétereit hasonlítja össze (5.2.1 ábra; C panel). Ez alapján az arginin aminosav triptofánra történő cseréje az epitóp részlet antigenicitási sajátságát csökkenti, feltételezzük tehát, hogy a polimorfizmus által érintett fehérje szakasz kisebb valószínűséggel indukálhat melanocita-specifikus autoimmun folyamatokat. Ily módon értelmezhetővé válik a mutáns allél protektív szerepe vitiligóban.



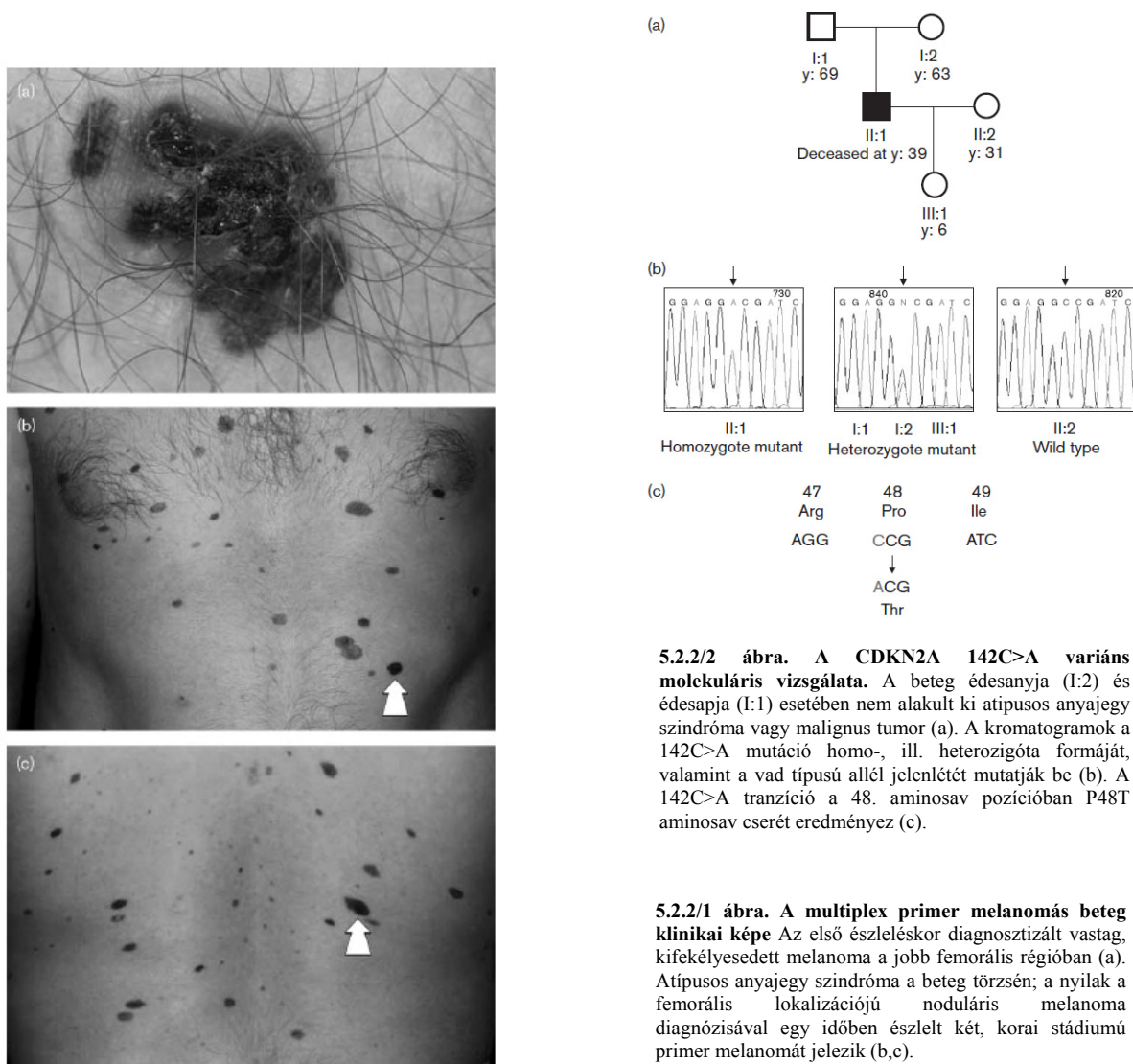
5.2.1/1 ábra. Az MC1R gén C478T SNP-jének PCR-RFLP vizsgálata (A). Vitiligós betegek és egészséges egyének C478T SNP-jének szekvenálással és PCR-RFLP-vel történő vizsgálatának összegzése (B). Az Arg160Trp aminosav cseréje által érintett 40 aminosav hosszúságú epitóp antigenicitási vizsgálata (C).

5.2.2. A CDKN2A gén ritka, prolin-48-threonin aminosav cserét okozó ivarsejtvonal-beli mutációja egy multiplex primer melanómában szenvedő magyar betegben és családjában

A melanoma incidenciája világszerte és Magyarországon is nő. A melanomás esetek kb. 10% ún. familiáris melanoma, amely azt jelenti, hogy a kórkép egyes családokban halmozottan fordul elő. Mindez arra utal, hogy a betegségnek ezekben az esetekben meghatározó genetikai háttere van (Hayward, 2003) Familiáris melanomát halmozottan mutató családok genetikai kapcsoltságai vizsgálatai felderítették, hogy a kórképerért a ciklin dependens kináz 2A (CDKN2A) gén mutációi a felelősek (Cannon-Albright és mtsai, 1992). Ez a felismerés a 90-es évek elején született és az azóta eltelt időben világszerte több ezer familiáris melanomát halmozottan mutató család vizsgálatával a CDKN2A génen több mint 100 melanómára hajlamosító mutációt azonosítottak, melyeket a Human Gene Mutation Database internetes oldalon tartanak számon

(<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Magyarországon mindeddig nem készült átfogó felmérés a familiáris melanoma genetikai hátteréről, ezért 2005-ben egy programot indítottunk, amelynek keretében a Klinikánk gondozásában álló a betegségben szenvedő betegek és családtagjaik CDKN2A génjének analízisét végezzük el. A program megkezdése óta megközelítőleg 100 vizsgálatra került sor, jelen munkában az eddig legérdekesebbnek tartott esetünkről számolok be.

Az akkor harmincéves férfibeteg 1997-ben jelentkezett Klinikánkon egy vastag noduláris melanomával a bal combján. Ez a tumor a diagnózis idején már 2 cm nagyságú volt, és kifehélyesedett. A beteg felvételekor további kettő elsődleges, korai stádiumban levő melanoma diagnózisára került sor, valamint az is nyilvánvaló volt, hogy a beteg atipikus anyajegy szindrómában szenved. Ez utóbbi tünet együttest melanomára erősen predisponáló állapotként tartjuk számon. A háromszoros primér melanoma fiatal korban való megjelenése, valamint az atipikus anyajegy szindróma arra utalt, hogy a fiatalember betegségének genetikai háttere lehet.



5.2.2/2 ábra. A CDKN2A 142C>A variáns molekuláris vizsgálata. A beteg édesanyja (I:2) és édesapja (I:1) esetében nem alakult ki atipikus anyajegy szindróma vagy malignus tumor (a). A kromatogramok a 142C>A mutáció homo-, ill. heterozigóta formáját, valamint a vad típusú allél jelenlétét mutatják be (b). A 142C>A tranzíció a 48. aminosav pozícióban P48T aminosav cserét eredményez (c).

5.2.2/1 ábra. A multiplex primer melanomás beteg klinikai képe Az első észleléskor diagnosztizált vastag, kifehélyesedett melanoma a jobb femorális régióban (a). Atipikus anyajegy szindróma a beteg törzsén; a nyilak a femorális lokalizációjú noduláris melanoma diagnózisával egy időben észlelt két, korai stádiumú primér melanomát jelezik (b,c).

Elvégeztük a multiplex melanomában szenvedő beteg genetikai vizsgálatát, melynek során megszekvenáltuk a CDKN2A gén mind a négy exonját. A szekvencia adatokat összevetettük a publikus adatbázisokban található szekvenciákkal és azt találtuk, hogy a CDKN2A gén 1 α exonjában, a 142. nukleotid pozícióban a beteg homozigóta formában hordozta a C > A transzverziót, amely a fehérje 48 pozíciójában levő prolin > treonin aminosav cserét okozza (P48). Vizsgálatainkat a beteg hozzátartozóira is kiterjesztettük. Megszekvenáltuk a CDKN2A gén 1 α exonját a beteg édesanyja, édesapja, felesége és kislánya esetében, és azt találtuk, hogy feleség kivételével mindannyian heterozigóta formában hordozzák a P48T mutációt. Tehát a multiplex primér melanomában szenvedő beteg mind az édesapjától, mind az édesanyjától a mutáns P48T allélt örökölte, majd továbbörököltette azt kislányának is (5.2.2/2 ábra).

Érdemes megemlíteni, hogy a multiplex primér melanomában szenvedő beteg szülei heterozigóta státuszuk ellenére nem szenvednek melanomában vagy egyéb tumoros betegségben, és az atípusos anyajegy szindróma jeleit sem mutatják. Saját eredményeink tehát arra utalnak, hogy az általunk detektált P48T CDKN2A mutáció csak homozigóta formában hajlamosít atípusos anyajegy szindrómára és melanomára.

Az irodalom alapos tanulmányozása szerint a CDKN2A gén P48T mutációját mindeddig négy közleményben említették: legelőször egy olasz hasnyálmirigy karcinomás beteg genetikai analízise során azonosították (Moore és mtsai, 2000), ezt követően egy olasz multiplex primér melanomában (Mantelli és mtsai, 2004), majd egy olasz származású familiáris melanomában szenvedő brazil beteg esetében (Huber and Ramos, 2006). Ezekben a közleményekben a szerzők nem számoltak be arról, hogy a betegek családtagjainak genetikai analízisét is elvégezték volna. A P48T mutációt mindeddig egy kutatócsoport vizsgálta részletesen egy melanomát halmozottan mutató olasz családban és azt találták, hogy a mutáció egyéb rosszindulatú betegségekre is hajlamosít (Della és mtsai, 2001). A fent említett közlemények mind arról számoltak be, hogy a genetikai vizsgálatok minden esetben heterozigóta formában detektálták a P48T CDKN2A gén mutációját és heterozigóta formában hajlamosítottak melanomára és egyéb malignus betegségekre. Ez annak fényében nagyon érdekes, hogy saját analízisünk a primér multiplex melanomában szenvedő beteg szüleit a mutáció heterozigóta hordozóinak azonosította, akik magas koruk mellett is egészségesek, semmiféle malignus betegségben nem szenvednek, amely arra utal, hogy a CDKN2A gén P48T mutációja heterozigóta formában önmagában nem jár a fenotípus kialakulásával, ahhoz egyéb genetikai és/vagy környezeti faktorok is szükségesek.

A másik nagyon érdekes megfigyelésünk az volt, hogy eddig csak olasz és olasz származású betegekben, ill. családtagjaikban azonosították a P48T CDKN2A mutációt. A mi tanulmányunk volt mindaddig az első, amely nem olasz egyénekben mutatta ki ezt a melanoma predisponáló mutációt. Természetesen felmerülhet az a kétség is, hogy ezt a mutációt csak azért nem detektálták más populációk hasonló betegeiben, mert nem történt kellő mennyiségű ilyen jellegű vizsgálat. Egy közelmúltban megjelent adat szerint azonban Ausztráliában, Európában és az Amerikai Egyesült Államokban mindaddig 385 familiáris melanomában szenvedő család CDKN2A analízisét végezték el, és csupán a fent említett olasz cikkek és saját tanulmányunk számolt be a gén P48T mutációjáról (Nelson és Tsao, 2009). Mindezek fényében kijelenthetjük, hogy genetikai vizsgálataink során egy rendkívül ritka melanoma predisponáló CDKN2A mutációt azonosítottunk.

Felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon milyen egyéb genetikai predisponáló faktorok játszhattak még szerepet a multiplex primér melanomában szenvedő beteg állapotának kialakulásában. Az utóbbi évek eredményei arra utalnak, hogy az MC1R gén polimorfizmusai genetikai hajlamosító faktorként járulnak hozzá a melanomára való hajlam kialakulásához. Az első ilyen jellegű vizsgálatról (Box és mtsai, 2001) számoltak be, melynek során olyan ausztrál familiáris melanomában szenvedő betegeket és családtagjaikat tanulmányozták, akik esetében bizonyított volt, hogy betegségük hátterében CDKN2A mutációk álltak. A kutatók arra voltak kíváncsiak, hogy az MC1R gén polimorfizmusai vajon hogyan módosítják a nagy penetranciájú CDKN2A mutációk melanoma predisponáló hatását. A felmérés eredménye szerint azoknál a CDKN2A mutáció hordozóknál, akik MC1R polimorfizmusokat nem hordoznak, az első melanoma jelentkezésének ideje 58,1 éves kor volt, míg azok, akik CDKN2A mutációt és MC1R polimorfizmust is hordoztak, az első tünetek már jóval fiatalabb életkorban, átlagosan 37.8 évesen jelentkeztek. A CDKN2A mutációk melanoma predisponáló hatását legnagyobb mértékben az Arg151Cys, Arg160Trp és Asp294His MC1R polimorfizmusok befolyásolták. Számos kutatócsoport foglalkozott azzal a kérdéssel is, az MC1R polimorfizmusok önmagukban milyen mértékben hajlamosítanak a melanoma kialakulására. Természetesen ezekben a vizsgálatokban azt is figyelembe kell venni, hogy az MC1R polimorfizmusok alapvetően befolyásolják a humán bőr pigmentációját, tehát elképzelhető, hogy hatásuk nem közvetlenül, hanem a világos bőrszín kialakításán keresztül érvényesül. Bebizonyosodott, hogy a kilenc leggyakrabban előforduló MC1R polimorfizmus közül hét önmagában is szignifikánsan hozzájárul a melanomára való hajlam kialakításához (Raimondi és mtsai, 2008), és ami kimondottan meglepő felismerés

volt, az az, hogy az MC1R polimorfizmusok olyan egyének esetében is érvényesítették melanoma predisponáló hatásukat, akik sötétebb bőrszínűek (Fitzpatrick III és IV) voltak (Palmer és mtsai, 2000). A fentiek ismeretében elhatároztuk, hogy a CDKN2A gén részletes elemzése után a beteg és családtagjai esetében elvégeztük az MC1R gén analízisét is.

Három MC1R polimorfizmust detektáltunk a multiplex primér melanomában szenvedő beteg és családjának vizsgálata során (5.2.2/1 táblázat): Val92Met, Arg142His és Arg151Cys, melyek közül az Arg142His és az Arg151Cys polimorfizmusokat melanoma predisponáló genetikai faktorként tartja számon az irodalom (Nelson és Tsao, 2009). Betegünk két polimorfizmust (Val92Met és Arg151Cys) hordozott heterozigóta formában, édesapjától a Val92Met, édesanyjától pedig az a Arg151Cys polimorfizmust örökölte. A vizsgálat arra is fényt derített, hogy a beteg felesége is hordoz egy MC1R polimorfizmust (Arg142His) heterozigóta formában, melyet továbbörökített most 8 éves közös gyermeküknek, aki így két melanoma predisponáló MC1R polimorfizmus (Arg142His és Arg151Cys) heterozigóta hordozója, valamint heterozigóta a P48T CDKN2A mutációra is.

| association with | Mutation and AA change | nt | III:1 | II:2 | I:2 | I:1 | II:1 |
|---------------------------------------|------------------------|---------|-------|------|-----|-----|------|
| weakly associated with skin type NMSC | GTG>ATG Val92Met | 274 G>A | GA | GG | GA | GG | GA |
| red hair/light colours NMSC, melanoma | CGC>CAC Arg142His | 425 G>A | GA | GA | GG | GG | GG |
| red hair/light colours NMSC, melanoma | CGC>TGC Arg151Cys | 451 C>T | CC | CC | CC | CT | CT |

5.2.2/1 táblázat. A multiplex primér melanomában szenvedő beteg (II:1) és családtagjainak MC1R polimorfizmus vizsgálata. I:1 és I:2: a beteg édesapja és édesanyja; II:2: a beteg felesége; III:1: a beteg gyermeke. NMSC: non-melanoma skin cancer

Eredményeink tehát azt mutatták, hogy a multiplex primér melanomában szenvedő beteg azon felül, hogy homozigóta formában hordozta a melanoma predisponáló P48T CDKN2A mutációt, heterozigóta volt két MC1R polimorfizmusra is, mely közül egyik bizonyítottan hozzájárul a melanomára való hajlam kialakításához. A beteg továbbörökítette gyermekének a CDKN2A mutációt, melyet ő heterozigóta formában hordoz, valamint édesanyjától még egy melanoma-predisponáló MC1R polimorfizmust (Arg142His) is örökölt, melynek szintén heterozigóta hordozója. A világos bőrszínű kislány további bőrgyógyászati gondozása során mindenféleképpen figyelembe kell venni édesapja kórtörténetet, valamint a genetikai vizsgálatok alapján feltárt melanoma-predisponáló CDKN2A mutáció és MC1R polimorfizmus meglétét.

5.2.3. A vénás eredetű lábszárfekély kialakulására hajlamosító genetikai tényezők azonosítása

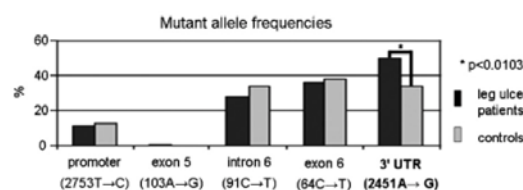
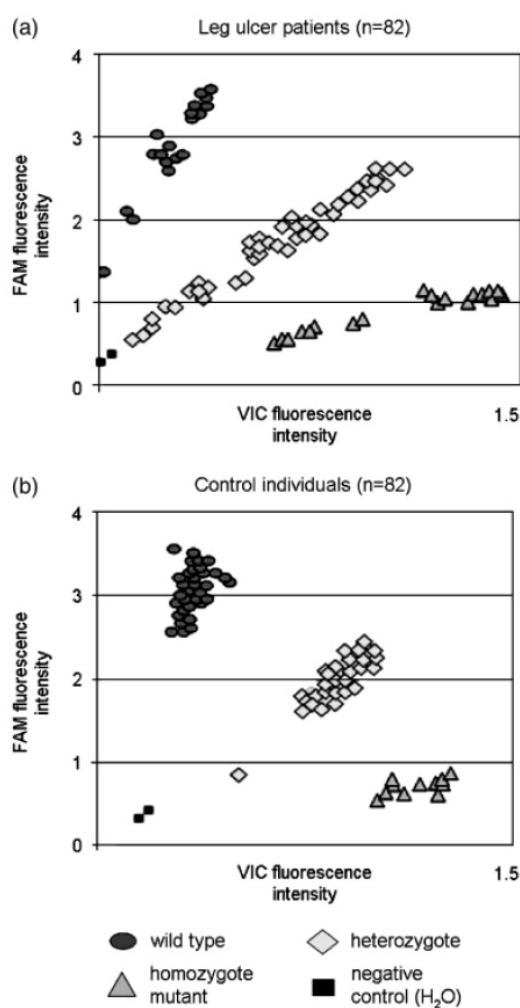
A vénás eredetű lábszárfekély az érintett betegek számára az életminőség igen nagymértékű leromlásával jár. A multifaktoriális bőrgyógyászati kórkép elsősorban az idősebb korosztály betegsége, de a betegsége hajlamos egyének már igen fiatalon is szenvedhetnek a krónikus, nehezen gyógyuló sebektől. A betegség pontos pathomechanizmusa még mindig nem ismert részleteiben, azt azonban tudjuk, hogy kialakulásában rendkívül fontos szerepet játszanak a környezeti és az életmódbeli tényezők. Az is ismert, hogy a kórkép gyakran családi halmozódást mutat, amely genetikai hajlamosító faktorok szerepére is utal. Az elmúlt években számos közlemény jelent meg, amelyekben a vénás lábszárfekélyre hajlamosító polimorfizmusokat azonosítottak. A témában közölt korai közlemények elsősorban a véralvadásban szerepet játszó faktorokat kódoló géneket vizsgálta, és azonosított egy-egy polimorfizmust a protrombin (Jebeleanu és Procopciuc, 2001) ill. a XIII. véralvadási faktor (Gemmati és mtsai, 2004) géneken, amelyek a kórkép kialakulására hajlamosítanak. Munkacsoportunk célul tűzte ki a kóros sebgyógyulásban megfigyelhető hámosodási zavarok háttérében álló genetikai hajlamosító faktorok azonosítását. Ezért választásunk a fibroblaszt növekedési faktor receptor-2 (FGFR2) génre esett. Az FGFR2 génnek két splicing variánsa van, amely két fehérje terméket eredményez: az egyik az FGFR2-IIIb, vagy más néven keratinocita növekedési faktor receptor (KGFR), a másik az FGFR2-IIIc, vagy más néven BEK (bacterially expressed kinase). Az FGFR2-IIIb/KGFR variáns elsősorban epitel sejteken, míg az FGFR2-IIIc/BEK variáns a mezenchimális sejteken fejeződik ki. A KGFR és a BEK fehérjék transzmembrán tirozin kinázok, amelyek a hozzájuk kötődő fibroblaszt növekedési faktorok (FGF) hatását közvetítik. Ismert, hogy közvetlenül a sebzés után a dermális fibroblasztok FGF-7(=KGF-1)-et és FGF-10(=KGF-2)-et kezdenek termelni, amely aztán az epidermiszbe feljutva ott a keratinociták osztódását indukálja (Maas-Szabowski és mtsai, 2001).

Munkánk során öt polimorfizmust választottunk ki az FGFR2 gén különböző régióiban, melyek feltehetően eltérő funkcióval bírnak.

| Location in FGFR-2 gene | Exact position ^a | Possible alteration in gene function | ID number in applied database |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Promoter | 2753T → C | Transcription activity | C_12126064_10 |
| Exon 5 | 103A → G | Thr → Met | C_2414603_10 |
| Intron 6 | 91C → T | Splicing | C_2917358_1_ |
| Exon 6 | 64C → T | Val → Val | C_8899692_1_ |
| 3' UTR | 2451A → G | mRNA stability | C_2917245_10 |

5.2.3/1 táblázat. A vizsgált FGFR2 polimorfizmusok leírása. (a) A nukleotid pozíciókat a NCBI honlapján elérhető AF360695 számú szekvencia alapján tüntettük fel.

A vizsgálatokba 82 vénás elégtelenség talaján kialakult lábszárfekélytől szenvedő beteget vontunk be. A beválasztás kritériuma a minimum hat hete fennálló lábszárfekély volt, és kizárási kritériumként az artériás elégtelenség vagy cukorbetegség szerepelt. A bevont betegek tüneteinek átlagosan 5,84 éve álltak fenn, és 24,2%-uknak volt a vizsgálatot megelőzően mélyvénás trombózis. A betegek átlagéletkora 66 év volt, akik 58%-a volt nő. A kontroll csoportba 82 olyan egészséges embert vontunk be, akik sem vénás, sem artériás elégtelenségben nem szenvedtek, és vérnyomás problémáik sem voltak. A kontroll csoport mind korban, mind a nemek összetételében jól egyezett a betegek csoportjával.



5.2.3/2 ábra. A vizsgált öt SNP mutáns allél frekvenciájának megoszlása. Az öt bemutatott oszlop pár a vizsgált öt SNP-t jelöli. A sötét oszlop a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek körében (n=82), míg a világos színű oszlop az egészséges kontrollok (n=82) körében mért mutáns allél frekvenciát jelöli. Eredményeink szerint a gén 3'UTR régiójában található SNP mutáns allél frekvenciája szignifikánsan (χ^2 próba $p = 0,0103$) eltér a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek és az egészséges kontrollok között. A statisztikai korrekciók (Bonferroni $p = 0,0515$; False Discovery Rate Determination $p = 0,0515$) határértékkel bár, de megerősítették az öt különböző SNP-re felállított többszörös hipotézist. A másik négy SNP mutáns allél frekvenciája, amelyek a promóter régióban, exon 5-ben, exon 6-ban és intron 6-ban helyezkednek el, nem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport között.

5.2.3/1 ábra. Az FGFR2 gén 3'UTR SNP genotípus eloszlása. A vizsgálatba bevont 164 egyén 49,39%-a heterozigóta mutáns, 18,29%-a homozigóta mutáns és 32,32%-a vad típusú volt. (a) A vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek (n=82) között a heterozigóta mutánsok aránya 53,66%, a homozigóta mutánsoké és a vad típusúaké pedig egyaránt 23,17% volt. (b) A kontroll csoporton (n=82) belül a heterozigóták aránya 45,12%, a homozigóta mutánsoké 13,42%, míg a homozigóta vad típusúaké 41,46% volt. Az FGFR2 gén 3'UTR SNP-t homozigóta mutáns formában közel kétszer annyi vénás lábszárfekélyben szenvedő beteg hordozta, mint egészséges kontroll egyén. Ennek következtében a genotípusok eloszlása szignifikáns (χ^2 próba $p = 0,0103$) különbséget mutatott a beteg és az egészséges kontroll csoport között.

Az 5.2.3/1 táblázatban felsorolt FGFR2 polimorfizmusokat az Assay-on-Demand SNP analízáló rendszerrel vizsgáltuk. A vad típusú és a polimorf allél eloszlását a beteg és

a kontroll csoportban χ^2 próbával elemeztük. Eredményeink szerint az FGFR2 gén 3' UTR-ben található SNP-je szignifikánsan ($p = 0,0103$) magasabb arányban fordul elő a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegekben, mint az egészséges egyéneknél (5.2.3/1 ábra). A heterozigóták aránya a beteg körében 53,66%, míg a kontrollok között 45,12% volt, a mutáns allélt homozigóta formában a betegek 23,17%-a, míg az egészségesek 13,42%-a hordozta. Mivel egyszerre öt SNP vizsgálatát végeztük el ebben a tanulmányban, a Bonferroni korrekciót is alkalmaztuk, amely szerint a genotípusok megoszlása a kontroll és a betegpopuláció között a továbbra is szignifikánsnak bizonyult ($p = 0,0515$).

A mutáns allél frekvenciák kiszámítása is arra utalt, hogy a megvizsgált öt SNP közül egyedül a 3'UTR-ben található eloszlása mutatott szignifikáns különbséget a betegek és a kontroll egyének csoportja között (5.2.3/2 ábra). Eredményeink alapján az FGFR2 gén egy 3'UTR régiójában található polimorfizmusa hajlamosító faktor a vénás eredetű lábszárfekély kialakulására.

A bőrgyógyászati gyakorlatban megfigyeltek szerint a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek között igen magas az elhízottak aránya, és általánosan elfogadott az is, hogy az obezitás egyike a lábszárfekély kialakulását előidéző tényezőknek. A következő munkánkban azt mutatjuk meg, hogy a tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) -308 promóter polimorfizmusa az obezitásra való hajlam kialakításában feltehetően szerepet játszó genetikai faktor, amelynek aztán áttételesen a vénás eredetű lábszárfekély pathomechanizmusában is szerepe van.

A TNF- α egy rendkívül széleskörű funkcióval bíró proinflammatorikus citokin, amely számos immunológiai folyamat, a lipid metabolizmus, a véralvadás, az inzulin rezisztencia, az endotél funkciók és még jónéhány egyéb fiziológiás és patológiás folyamat szabályozásában is szerepet játszik. A TNF- α fontos faktor a normál sebgyógyulás folyamatának szabályozásában (Babbar és mtsai, 2006; Crist és mtsai, 2004), valamint azt is kimutatták, hogy a TNF- α szintje alacsonyabb a terápia rezisztens fekélyekben, mint azokban, amelyekben a sebgyógyulás folyamata lezajlott (Wallace és Stacey, 1998). Az alacsonyabb TNF- α szintet elsőként leíró ausztrál munkacsoport ezt követően megvizsgálta, hogy vannak-e a TNF- α génnek olyan polimorfizmusai, amelyek a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek csoportjában magasabb arányban fordulnak elő és hajlamosító genetikai faktorként szerepelhetnek a kórkép kialakulásában, ill. felelősek lehetnek a TNF- α alacsonyabb szintjéért a sebváladékban. Wallace és

munkatársai arra az eredményre jutottak, hogy a TNF- α gén -308 pozícióban levő polimorfizmusa (G/A SNP) a vénás eredetű lábszárfekélyre hajlamosító faktor.

A TNF- α -308 A allélját számos egyéb multifaktoriális kórképben szerepet játszik, többek között az inzulin rezisztencia és az obezitás kialakulásával is kapcsolatba hozták (Brand és mtsai, 2001; Hoffstedt és mtsai, 2000), míg más szerzők ezt az összefüggést nem tudták igazolni (Walston és mtsai, 1999). A fenti irodalmi adatok figyelembe vételével azt feltételeztük, hogy a Wallace és munkatársai által a TNF- α -308 A allél és a lábszárfekélyre való hajlam között feltárt összefüggés nem közvetlen, hanem a polimorfizmus elsődlegesen obezitásra hajlamosít, és ezen keresztül fejti ki a hatását a vénás eredetű lábszárfekély kialakulására. Az ausztrál munkacsoport azonban közleményében nem tett arról említést, hogy a vizsgálatukba bevont lábszárfekélyes betegek körében mennyi volt az elhízottak aránya.

Elhatároztuk tehát, hogy a Klinikánk gondozásában álló vénás eredetű lábszárfekélyes betegek (n=151) és a vizsgálatban bevont kontroll egyének (n=92) csoportjait normál testsúlyúakra (Body Mass Index, BMI < 25 kg/m²) és obezekre bontjuk (BMI > 25 kg/m²), és az így előállt csoportokban megvizsgáljuk a TNF- α -308 A allél gyakoriságát. A polimorfizmus vizsgálatát PCR-RFLP módszerrel végeztük. A -308 A allél és a lábszárfekély ill. az obezitás közötti összefüggéseket Fisher exact valószínűségi teszttel analizáltuk, valamint esélyhányadost (odds ratio, OD) is számoltunk 95% konfidencia intervallummal (CI). Annak érdekében, hogy adatelemzésünk eredményei összevethetőek legyenek a Wallace és munkatársai által közöltekkel (Wallace és mtsai, 2006), logisztikus regressziós analízist is végeztünk az adatainkon.

A TNF- α -308 A allél eloszlása nem mutatott szignifikáns különbséget, ha a normál testsúlyú (BMI < 25 kg/m²) kontroll egyének (n=92) és normál testsúlyú vénás lábszárfekélyben szenvedők (n=110) csoportjait hasonlítottuk össze (5.2.3/1 táblázat). Ugyanakkor a -308 TNF- α SNP mutáns allél frekvenciája szignifikáns eltérést mutatott (Fisher exact valószínűségi teszt $P = 0,0273$; OR (95% CI) = 1,88 (0,9533-3,6877)): logisztikus regressziós analízis: $P = 0,0514$), ha az obez vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek (n=41) és a normál testsúlyú kontroll egyének között végeztük el az összehasonlítást. Elemzéseinket természetesen elvégeztük oly módon is, hogy nem vettük figyelembe a betegek és a kontrollok testtömeg indexét: ily módon összevetve a TNF- α -308 A allél eloszlását a lábszárfekélyes betegek (n=151) és a kontroll egyének (n=92) csoportjai között nem találtunk szignifikáns eltérést. Ha viszont a lábszárfekély betegség meglétét hagyjuk figyelmen kívül, és a TNF- α -308 A allél megoszlását az obez (BMI > 25

kg/m²) és normál testsúlyú (BMI < 25 kg/m²) egyének között vizsgáltuk, azt kaptuk, hogy a mutáns allél gyakorisága szignifikánsan magasabb (Fisher exact valószínűségi teszt $P = 0,0457$; OR (95% CI) = 1.72 (0,8567-3,4549)) az obezek körében, mint a normál testsúlyúakéban. Ezzel az eredménnyel a Hoffstedt és Brand (Brand és mtsai, 2001; Hoffstedt és mtsai, 2000) által közölt összefüggést tudtuk megerősíteni, miszerint a TNF- α -308 A allél hajlamosító faktorként szerepelhet az obezitás kialakulásában. Nem tudtuk megerősíteni azonban a Wallace és munkatársai (Wallace és mtsai, 2006) által leírt közvetlen összefüggést, miszerint a TNF- α -308 A allél magára a vénás eredetű lábszárfekélyre hajlamosítana. Feltételezzük, hogy az ausztrál munkacsoport által vizsgált vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek között igen magas lehetett az obezek aránya, és a Wallace és munkatársai által feltárt összefüggés ennek volt köszönhető. Saját adataink elemzése megerősíti azt a feltételezést, hogy az elsődleges összefüggés a TNF- α -308 A allél és az obezitásra való hajlam között áll fenn, és a polimorfizmus hatása a vénás eredetű lábszárfekélyre való hajlam kialakítására feltehetően ezen keresztül érvényesül.

| TNF α gene –308 G/A SNP | GG | | GA | | AA | | G | A | Fisher's ¹ test | Odds ratio | 95% CI of OR |
|--|----------------|----------------|----------|-----|----|------------|------|---------------|----------------------------|------------|--------------|
| | M ² | F ² | M | F | M | F | | | | | |
| Leg ulcer patients with BMI > 25 kg/m ² (n=41) (group 1) | 25 (60.98) | 14 (34.15) | 2 (4.88) | 64 | 18 | $P=0.0273$ | 1.88 | 0.9533–3.6877 | | | |
| | 9 | 16 | 6 | 8 | 1 | 1 | | | | | |
| Leg ulcer patients with BMI < 25 kg/m ² (n=110) (group 2) | 76 (69.09) | 31 (28.18) | 3 (2.73) | 183 | 37 | $P=0.0643$ | 1.35 | 0.7732–2.3498 | | | |
| | 31 | 45 | 12 | 19 | 1 | 2 | | | | | |
| All leg ulcer patients (n=151) (group 1+2) | 101 (66.89) | 45 (29.80) | 5 (3.31) | 247 | 55 | $P=0.0334$ | 1.49 | 0.8834–2.4948 | | | |
| | 40 | 61 | 18 | 27 | 2 | 3 | | | | | |
| Leg-ulcer-free controls with BMI > 25 kg/m ² (n=39) (group 3) | 24 (61.54) | 14 (35.90) | 1 (2.56) | 62 | 16 | $P=0.0457$ | 1.72 | 0.8567–3.4549 | | | |
| | 0 | 24 | 0 | 14 | 0 | 1 | | | | | |
| Leg-ulcer-free controls with BMI < 25 kg/m ² (n=92) (group 4) | 68 (73.91) | 24 (26.09) | 0 | 160 | 24 | | | | | | |
| | 29 | 39 | 11 | 13 | 0 | 0 | | | | | |
| All leg-ulcer-free controls (n=131) (group 3+4) | 92 (70.23) | 38 (29.01) | 1 (0.76) | 222 | 40 | $P=0.0888$ | 1.20 | 0.6963–2.0724 | | | |
| | 29 | 63 | 11 | 27 | 0 | 1 | | | | | |

5.2.3/1 táblázat. A TNF- α -308 G/A polimorfizmus PCR-RFLP adatai. A zárójelbe tett számok az adott alcsoport százalékos arányát mutatják. ¹ A Fisher exact valószínűségi teszt elvégzésekor az A és a G allélok frekvenciai adatait használtuk. ² M, az alcsoporton belül a férfiak száma; F, az alcsoporton belül a nők száma.

5.3. A PRINS nem-kódoló RNS azonosítása, szerepe a sejtek stresszválaszában és a pikkelysömör pathogenezisében

Munkánk célja az volt, hogy nagyskálájú génextpressziós vizsgálatokkal olyan transzkripciós szintű változásokat azonosítsunk a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz és az egészséges epidermisz között, amelyek szerepet játszanak a pikkelysömörös nem léziós keratinociták inherensen felfokozott érzékenységének kialakításában, így a pikkelysömör patogenezisében. Alapvetően kétfajta módszerrel lehet nagyskálájú génextpressziós vizsgálatokat végezni. Az „zárt” rendszerekben, (pl. a DNS chip vizsgálatokban) már ismert, általában azonosított funkciójú gének expressziójának összehasonlítása folyik (Marshall és Hodgson, 1998), a „nyílt” rendszerekben lehetőség van mindaddig nem azonosított, ismeretlen funkciójú gének expressziójának összehasonlítására a különböző mintákban (Green és mtsai, 2001). Az elmúlt évtizedben megjelent számos közleményben mindkét megközelítési módot alkalmazták a pikkelysömörös léziókra (Nomura és mtsai, 2003), illetve a pikkelysömörös nem léziós epidermiszre jellemző (Bowcock és mtsai, 2001) génextpressziós változások követésére.

A pikkelysömörrre jellemző génextpressziós változások vizsgálata lehetőséget nyújtott már ismert fehérjék új izoformáinak azonosítására (Abts és mtsai, 1999), valamint a pre-mRNS érése során keletkező új, ún. „splice variáns”-ok kimutatására is (Wolf és mtsai, 2003). Ezek az eredmények arra hívják fel figyelmünket, hogy a „nyílt” rendszerű génextpressziós vizsgálati módszerek amellet, hogy információt szolgáltatnak a pikkelysömörrre való hajlam és/vagy a pikkelysömörös tünetek kialakításában részt vevő génextpressziós változásokról, lehetőséget nyújtanak új, eddig ismeretlen funkciójú tarszkriptumok azonosítására is.

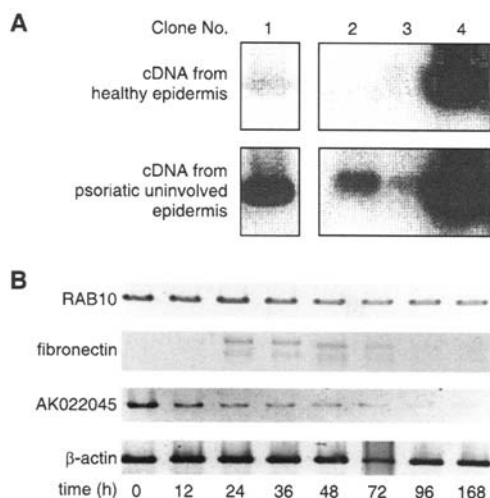
Az általunk alkalmazott „nyílt” rendszerű differential display génextpressziós vizsgálatot 2 egészséges és 2 pikkelysömörös beteg tünetmentes epidermiszének felhasználásával végeztük el. A radioaktívan jelölt és akrilamid gélen elválasztott csíkok közül az exponálást követően csak azokat vágtuk ki és dolgoztunk velük a továbbiakban, amelyek konzekvensen különbséget mutattak. 125 ilyen csík kivágására került sor, a bennük levő DNS tartalmat vízben forralással extraháltuk, egy újabb kör PCR-ral felszaporítottuk és pSK vektorba klónoztuk. A klónozott fragmentek közül reverz Southern blott kísérlet alapján választottuk ki, hogy melyekkel dolgozunk tovább. A reverz Southern blott során a klónozott fragmenteket restrikiós endonukleázos kezeléssel kivágtuk a pSK vektorból, két párhuzamos agaróz gélen futtattuk, majd átblottoltuk nylon membránra. Az egyik nylon membránhoz a radioaktívan jelölt, egészséges epidermiszből származó cDNS

mintát, míg a másik nylon membránhoz a szintén radioaktívan jelölt, pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből származó cDNS-t hibridizáltuk. Ily módon lehetséges a differential display vizsgálat eredménye alapján esetleges fals negatív klónok szelektálása és a további vizsgálatokból való kizárása.

Az 5.3/1 ábrán (A panel) 4 független klón reverz Southern vizsgálata látható. Az 1-2-3 számokkal jelzett minták határozott aktivitás különbséget mutattak a kétfajta jelölt cDNS-sel való hibridizálást követően, ezek differential display eredménye tehát igazolást nyert. A 4. klón aktivitása azonban megközelítőleg azonos szintűnek bizonyult, ezért ezt a klónt további vizsgálatainkból kizártuk. Az 1-2-3 számú klónokat szekvenáltattuk, ily módon információt nyertünk arról, hogy mely génről átíródó transzkriptumok adtak konzekvens különbséget a pikkelysömörös tünetmentes és egészséges epidermisz közötti összehasonlításban, mind a differential display, mind a reverz Southern blott vizsgálatok alapján. Az 1. izolátum a RAB10, vezikuláris transzportban szerepet játszó fehérjét kódolja, a 2. izolátum az extracelluláris mátrix fehérjét, a fibronektint, a 3. izolátum pedig a mindeddig funkcióval nem rendelkező, AK022045 számon nyilvántartott cDNS-sel egyezett meg.

Mivel a pikkelysömör az epidermális keratinociták proliferációs/differenciációs folyamatainak zavarával járó bőrbetegség, további vizsgálatainkban arra voltunk kíváncsiak, hogy a RAB10, a fibronektin és AK022045 gének milyen kifejeződési mintázatot mutatnak a keratinociták különböző proliferációs és differenciációs szakaszaiban. Erre a célra a laboratóriumunk által kifejlesztett (Pivarcsi és mtsai, 2001) HaCaT keratinocita szinkronizációs modell rendszert használtuk. RT-PCR kísérlettel demonstráltuk (5.3/1 ábra, B panel), hogy a RAB10 gén expressziója a széruméheztetéssel és kontakthatással végrehajtott szinkronizációt (0h minta) követően az aktívan proliferáló (24h-96h minták), valamint a differenciálódás jeleit mutató konfluens kultúrában (168h minta) megközelítően azonos szintű. A fibronektin gén az aktívan proliferáló keratinocitákban (48h-96h minták) fejeződik ki legmagasabb szinten, a széruméheztetett (0h minta), valamint a konfluens kultúrában (168h minta) expressziója jóval alacsonyabb szintű. Az AK022045 nyilvántartási számú, mindeddig ismeretlen funkciójú cDNS a széruméheztetett, kontakthatolt HaCaT sejtekben (0h minta) mutatta a legmagasabb szintű kifejeződést, a szérum visszaadása és a sejtek szétpasszálása után bekövetkező aktív proliferáció során a gén expressziója nagymértékben csökken (24h-96h minták) és a konfluens kultúrában (168h minta) sem emelkedik meg szintje. Mindezekből azt a következtetést vontuk le, hogy az AK022046 gén expressziója azokban a sejtekben a

legmagasabb, amelyek stressz körülményeknek vannak kitéve, az aktívan proliferáló sejtekben expressziója nagymértékben csökken.

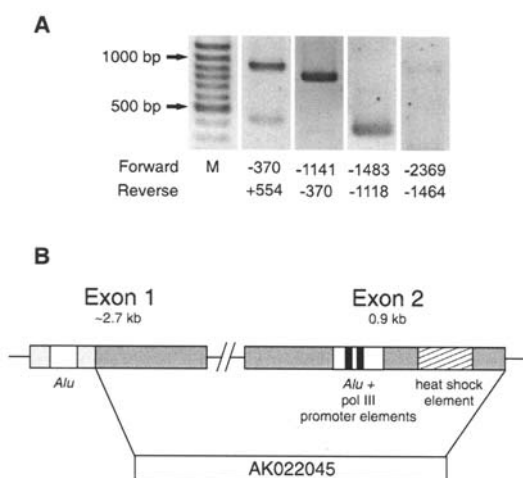


5.3/1 ábra. A pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben azonosított transzkriptumok eltérő kifejeződésének visszaigazolása és vizsgálatuk a keratinocita proliferáció és differenciáció folyamán. *A*, A differential display módszerrel azonosított fragmentekhez egészséges és pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből átírt, radioaktívan jelölt cDNS-eket hibridizáltunk (ún. reverz Southern blott). Az 1. 2. és 3. jelű minták esetében igazoltuk az expressziós különbséget, míg a 4. minta megközelítőleg ugyanazt a jelintézetést adta mindkét próbával. *B*, A RAB10, a fibronectin és az AK022045 transzkriptumok (amelyek az *A* panel 1., 2., és 3. jelű mintáinak felelnek meg) mennyiségét RT-PCR módszerrel vizsgáltuk a sejtnyugalmi fázisból kiengedett, szinkronizált HaCaT sejtekben, a 4.5/1 táblázatban ismertetett primerekkel.

Ezt követően *in silico* vizsgálatokat végeztünk annak felderítésére, hogy az AK022045 jelű, mindeddig azonosított funkcióval nem rendelkező cDNS milyen fehérjét kódol. Az interneten <http://www.expasy.org/tools/dna.html> címen elérhető programmal végrehajtottuk a cDNS mind a hat leolvasási keretben történő átírását, melynek eredménye szerint az AK022045 cDNS-ről nem íródik át fehérje. További internetes homológia vizsgálataink eredményei azonban arra irányították figyelmünket, hogy az AK022045 nyilvántartási számú gén által kódolt transzkriptum egy fehérjévé át nem íródó, szabályozó RNS-t kódol. A gén szerkezeti vizsgálata alapján a HaCaT sejtekben átíródó teljes hosszúságú cDNS 3,7 kb hosszúságú, benne 2 *Alu* ismétlődő elem, valamint egy olyan szakasz található, amely megközelítőleg 70% hasonlóságot mutat a *Tetrachymena thermophyla* egysejtű hőtoleranciájának kialakításában szerepet játszó szabályozó nem-kódoló RNS génnel (Fung és mtsai, 1995). A teljes hosszúságú transzkriptumot PRINS-nek (Psoriasis Susceptibility-related RNA Gene Induced by Stress) nevezzük a továbbiakban (5.3/2 ábra A panel).

Annak érdekében, hogy a teljes hosszúságú transzkriptum 5' végét feltérképezzük, RT-PCT kísérleteket végeztünk a 4.5/1 táblázatban feltüntetett primer párokkal, a primerek számozása során azt tüntettük fel, hogy azok az AK022045 transzkriptum 5' végéhez képest milyen távolságban helyezkednek el a határoló genomi DNS-en. A kísérletekhez a PRINS gént magasan expresszáló, szérum éheztetett és kontaktgátolt HaCaT sejtekből átírt cDNS-t használtunk. A 5.3/2 ábra B panelje azt mutatja, hogy az AK022045 5' végétől 1483 nt távolságra levő primer volt a legtávolabbi, amely még PCR terméket eredményezett,

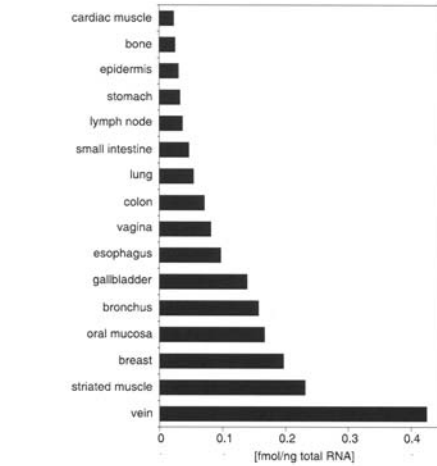
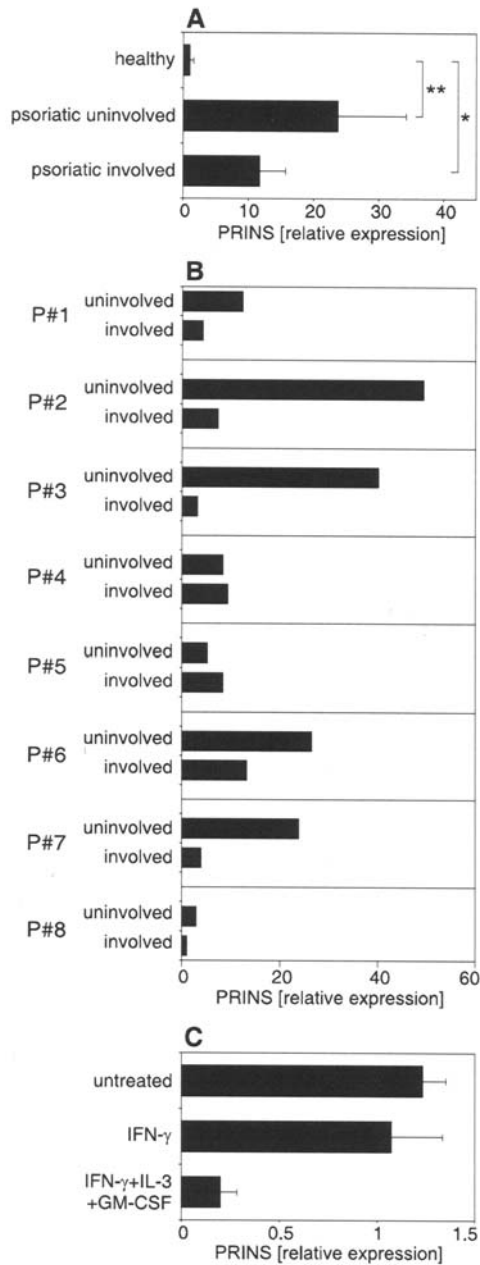
feltételezzük tehát, hogy a teljes hosszúságú PRINS transzkript 5' vége ebben a régióban lehet. Feltételezésünket az is megerősíti, hogy *in silico* analízissel a TFIIB transzkripciósfaktor egy lehetséges kötőhelyét azonosítottuk ebben a régióban.



5.3/2 ábra. A HaCaT sejtekben kifejeződő teljes hosszúságú PRINS transzkriptum. *A*, Totál RNS-t izoláltunk HaCaT keratinocitákból, átírtuk cDNS-sé, majd RT-PCR reakciókat végeztünk a 4.5/1 táblázatban felsorolt primerekkel. A primereket az AK022045 számon regisztrált, valamint az azt 5' irányban határoló genomi szekvencia alapján terveztük. (*M*, DNS molekulásúly marker). Az AK022045 transzkriptumtól 5' irányban legmesszebb eső primer már nem eredményezett megfelelő hosszúságú PCR terméket, amely arra utal, hogy a HaCaT sejtekben kifejeződő teljes hosszúságú transzkriptum minimum 1483 és maximum 2369 nukleotiddal hosszabb, mint az eredetileg megszekvenált AK022045 jelű cDNS. *B*, A cDNS és genomi adatok összevetése megmutatta, hogy az AK022045 transzkriptum két exonból áll. Homológia keresések eredménye szerint a PRINS szekvencián belül két *Alu* elem található, valamint egy szekvencia részlet, amely megközelítőleg 70% homológiát mutat a *T thermophila*-ban azonosított, a sejtek termotoleranciájának kialakításában szerepet játszó G8 kis citoplazmás RNS-sel.

A differential display és a reverz Southern kísérletek egybe csengő adatai egyértelműen arra utaltak, hogy a PRINS gén a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben magasabb szinten fejeződik ki, mint az egészséges epidermiszben, tehát feltehetően szerepet játszik a pikkelysömörre való hajlam kialakításában vagy markere a pikkelysömörre való hajlamnak. E kérdés tisztázásának céljából további független egészséges (n=14), pikkelysömörös tünetes (n=14) és tünetmentes (n=13) epidermisz mintákban hasonlítottuk össze a PRINS gén expresszióját. Ezekben a kísérletekben a nagy érzékenységű és kvantitatív eredményeket biztosító Q-RT-PCR vizsgálatokat alkalmaztuk. Ismét igazolást nyert (5.3/3 ábra, A panel), hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben a PRINS gén expressziója szignifikánsan ($p < 0,01$) magasabb, mint az egészséges epidermiszben, ám ezúttal az érzékeny és kvantitatív módszernek köszönhetően azt is megállapítottuk, hogy az overexpresszió mértéke átlagosan huszonnégyszeres. Új és némileg meglepő eredmény volt, hogy a pikkelysömörös tünetes epidermiszben, bár magasabb a PRINS gén expressziója, mint az egészséges epidermiszben (az overexpresszió szignifikánsnak [$p < 0,05$] bizonyuló mértéke nyolcszoros), mégis alacsonyabb szintű, mint a tünetmentes epidermiszben. Eredményeinket nyolc páciens esetében egyesével is bemutatjuk, azt demonstrálandó, hogy a PRINS gén overexpressziója a tünetmentes epidermiszben nagy egyéni különbségeket mutat, két minta pár esetén (P#4 és P#5) például a tünetmentes és a tünetes epidermisz között nem is jelentkezett különbség (5.3/3 ábra, B panel). Mindent összevetve, adataink arra utalnak, hogy a PRINS gén valószínűleg a

pikkelysömörre való hajlam kialakításának egyik tényezője, és nem a pikkelysömörös tünetek kialakulásában részt vevő faktor.



5.3/4 ábra. A PRINS gén expressziója különböző humán szervekben. Totál RNS-t izoláltunk különböző szervekből származó szövetmintákból, majd a PRINS RNS abundanciáját Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. A feltüntetett adatok az 1 ng totál RNS-re vonatkoztatott PRINS RNS mennyiségét adják meg fmol-ban kifejezve. Az ábrán három-öt minta expressziós értékének átlagát tüntettük fel.

5.3/3 ábra. A PRINS gén expressziója emelkedett a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben, és T-limfokinekkal való kezelést ezt az emelt szintű expressziót csökkenti. A, A PRINS gén expresszióját Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk egészséges (n=14), pikkelysömörös tünetmentes (n=13) és tünetes (n=14) epidermisz mintákban. A vizsgálatokhoz a 4.5/2 táblázatban megadott primereket használtuk. Az ábrázolt relatív génextpressziós adatokat az egészséges epidermisz mintákban mért adatokhoz viszonyítva kaptuk (átlag \pm SD * p <0,05, ** p <0,01, Student's teszt). B, A PRINS gén expresszióját pikkelysömörös betegek tünetmentes-tünetes epidermisz minta párjaiban is összevetettük Q-RT-PCR módszerrel (n=8). A bemutatott relatív génextpressziós értékek az egészséges epidermisz mintákban mért átlag PRINS expresszióhoz viszonyítva kerültek kiszámításra. C, Pikkelysömörös tünetmentes bőrmintákat három napon keresztül T-limfokinek keverékével kezeltük organotipikus kultúrában. Totál RNS-t izoláltunk az epidermiszből és a PRINS gén expresszióját Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. A bemutatott relatív expressziós értékek az egészséges, kezeletlen epidermisz mintákban mért átlag PRINS expresszióhoz viszonyítva kerültek kiszámításra (átlag \pm SD). IL-3, interleukin-3; GM-CSF, granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor; IFN γ , interferon- γ .

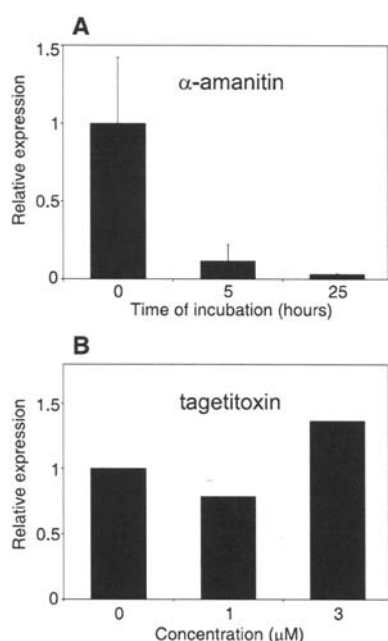
Ezt a feltételezésünket támasztotta alá az organotipikus bőrmintákon elvégzett kísérletünk is. Egészséges (n=5) és pikkelysömörös tünetmentes (n=5) bőrmintákat kezeltünk azokkal a T-sejt citokinekkal (1 ng/ml IFN- γ , ill. 1 ng/ml IFN- γ , 1 ng/ml GM-

CSF és 0,3 ng/ml IL-3 keveréke), amelyek ismertén fontos szerepet játszanak a pikkelysömörös tünetek kialakulásában, és korábbi eredményeink (Bata-Csörgő és mtsai, 1995) szerint a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből szeparált *ex vivo* keratinocitákat hiperproliferációra serkentik. Q-RT-PCR kísérleteink eredményei szerint az egészséges epidermiszben a T-sejt citokinekkal való indukció nem változtatta meg jelentősen a PRINS gén expresszióját (az adatot nem mutatom), ezzel szemben a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszekben ötödére csökkentette a PRINS transzkriptum abundanciáját (5.3/3 ábra, C panel). Ez az eredmény jó egyezést mutat korábbi összehasonlító vizsgálataink eredményével, amelyben a PRINS gén expressziója alacsonyabbnak bizonyult a pikkelysömörös tünetes epidermiszben, mint a tünetmentes epidermiszben.

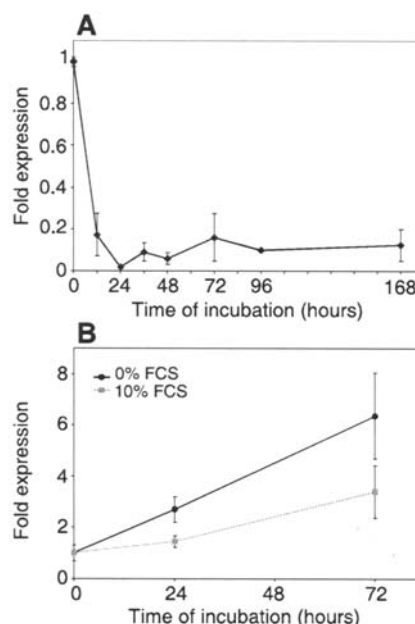
A PRINS gén azonosítására és a pikkelysömör patogenezisében való részvételének tanulmányozására epidermisz mintákon, illetve az immortalizált HaCaT keratinocitákon végeztünk kísérleteket. Természetesen felmerül a kérdés, hogy a PRINS gén expressziója milyen mértékben jellemző specifikusan az epidermiszre, és vajon egyéb humán szervekben és szövetekben kifejeződik-e. E kérdés megválaszolására totál RNS, illetve azokról átírt cDNS bankot hoztunk létre 16 különböző humán szervből és szövetből, az egyes szövettípusokat 3-5 független eredetű minta reprezentálta kísérletünkben. Q-RT-PCR eredményeink szerint az összes vizsgált humán szövettípusban kifejeződik a PRINS gén és expressziójának mértéke igen nagy különbséget mutat (5.3/4 ábra): a legalacsonyabb szinten a szívizom, a legmagasabb szinten pedig a véna expresszálja a PRINS gént, az expresszió mértékének különbsége huszonötszörös e két szövet típusban. Az epidermiszben, amelyben a PRINS transzkriptum elsődleges azonosítása történt, igen alacsony a gén expressziója a többi vizsgált szövethez viszonyítva. Eredményünk arra utal, hogy a PRINS génről átíródó nem-kódoló, szabályozó RNS feltehetően általános regulátorként működik a humán sejtekben és szövetekben, expressziójának mértéke azonban erős szövetspecifikus kontroll alatt áll.

Szekvencia analíziseink szerint a PRINS transzkriptum poly(A) farkat is hordoz. A poly(A) fark megléte arra utal, hogy a PRINS gént feltehetően RNS polimeráz II írja át; de mivel magán a génen azonosítottunk RNS polimeráz III indítóhelyet is, nem zárhattuk ki annak a lehetőségét sem, hogy a PRINS gén átírását RNS polimeráz III végzi. Ennek eldöntésére olyan *in vitro* kísérleteket végeztünk, amelyekben HaCaT keratinocitákat az RNS polimeráz II és III specifikus inhibitoraival, az α -amanitinnal és a tagetitoxinnal tenyésztettük együtt. Mivel a PRINS gén expresszióját az α -amanitinnal való tenyésztés

nagymértékben, míg a tagetitoxinnal való inkubálás egyáltalán nem érintette, arra a következtetésre jutottunk, hogy a PRINS gén RNS-sé történő átírását feltehetően az RNS polimeráz II végzi.



5.3/5 ábra. A PRINS gén átírását az RNS polimeráz II végzi. HaCaT keratinocitákat együtt tenyésztettünk az RNS polimeráz II specifikus inhibitorával, α -amanitinnal (20 $\mu\text{g/ml}$) 5 ill. 25 órán keresztül (n=3) (A) és az RNS polimeráz III specifikus inhibitorával, a tagetitoxinnal (1 és 3 $\mu\text{g/ml}$) 12 órán keresztül (n=2) (B). Az inhibitorok PRINS expresszióra gyakorolt hatását Q-RT-PCR vizsgálattal követtük. A bemutatott relatív expressziós értékek a kezeltetlen mintákban mért PRINS expresszióhoz viszonyítva kerültek kiszámításra. Három független α -amanitinnal végzett kísérlet eredményeiből számolt S.D. értéket tüntettünk fel.



5.3/6 ábra. A PRINS gén expressziója függ a keratinociták proliferációs/differenciációs állapotától és a sejtek szérumezethetése indukálja azt. A, A HaCaT keratinocitákat szérumezethetéssel és kontaktgátlással szinkronizáltuk, majd a sejtnyugalmi fázisból való kiengedést követően mintákat gyűjtöttünk a jelzett időpontokban. A PRINS gén expresszióját Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. Az ábrázolt relatív génextpressziós adatokat a sejtnyugalmi fázisban (0h) levő sejtek mintáiban mért adatokhoz viszonyítva kaptuk. Az értékeket három független kísérletből számoltuk \pm S. E. B, HaCaT keratinocitákat normál tenyésztési körülmények között (10% FBS) és szérumentes táptalajban tenyésztettünk 24 és 72 órán keresztül. A PRINS gén expresszióját Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. Az értékeket három független kísérletből számoltuk \pm S. E.

Elsődleges vizsgálatainkban RT-PCR módszerrel megmutattuk, hogy az AK022045 transzkriptum a legnagyobb mennyiségben a sejtnyugalmi fázisban lévő, differenciált HaCaT keratinocitákban van jelen, majd csökken, amikor a keratinociták elkezdnek osztódni (5.3/1 ábra). Az RT-PCR vizsgálattal megegyező eredményt kaptunk akkor is, amikor a PRINS gén expresszióját a jóval érzékenyebb Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk: legmagasabb szintű expresszióját a szérumezethetett, kontaktgátolt sejtekben láttuk, és 12 órával a keratinociták sejtnyugalmi fázisból való kilépését követően a szintje egyötödére csökkent, majd 24 óra elteltével szinte detektálhatatlanná vált. Ezt követően kismértékű expressziós emelkedést figyeltünk meg, de ennek szintje nem érte el a sejtnyugalmi

fázisban lévő sejtekben (0h) mért érték egytizedét sem. Ez a kísérletünk ismét megerősítette, hogy a PRINS expressziója erősen stressz indukált, valamint nagyon jó egyezést mutatott a pikkelysömörben kapott eredményeinkkel, miszerint a gén expressziója magas a tünetmentes epidermiszben, de amikor a keratinociták a tünetes epidermiszben hiperproliferálnak, a PRINS expressziója lecsökken (5.3/6 ábra, A panel).

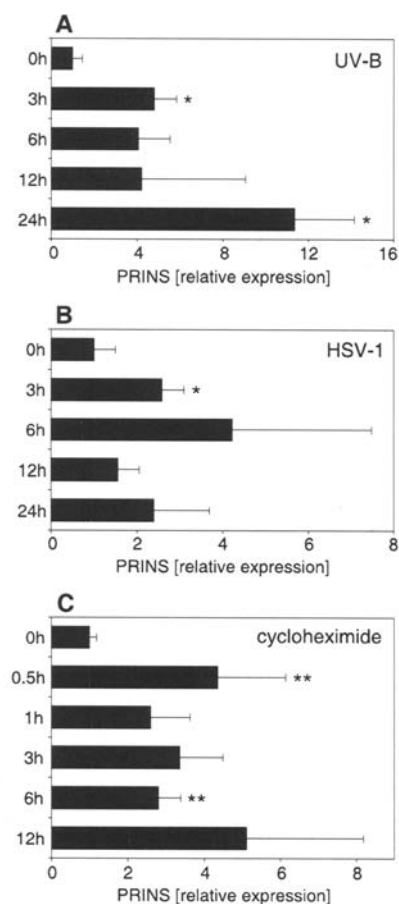
A következő kísérletben azt vizsgáltuk, hogy vajon a PRINS expressziójának indukációjához szükséges-e egy időben a kontaktgátlás és a széruméheztetés, vagy ez utóbbi önmagában is indukálja a gén magasabb szintű kifejeződését. Ezért aktívan osztódó HaCaT keratinocitákat két részre osztottunk, egy részüket tovább tenyésztettük normál körülmények között, 10% FBS tartalmú táptalajban, míg a másik részüktől megvontuk a szérumot. 24 és 72 óra elteltével mintákat vettünk a tenyészetekből és Q-RT-PCR módszerrel mértük a PRINS gén expresszióját. Eredményeink azt mutatták (5.3/6 ábra, B panel), hogy a széruméheztetés, mint stressz faktor önmagában is elegendő ahhoz, hogy a PRINS gén magasabb szinten expresszálódjon a HaCaT keratinocitákban.

A fenti kísérletek eredményei, melyekben széruméheztetésnek és kontaktgátlásnak tettük ki a HaCaT sejteket arra utalnak, hogy a PRINS gén expressziója stresszindukált, ezért egyéb stresszfaktorok hatását is megvizsgáltuk. Mivel az UV sugárzás az egyik legjelentősebb környezeti stressz, melynek elsődleges célszerve a bőr, megvizsgáltuk, hogy vajon UV sugárzás hatására a PRINS RNS mennyisége megváltozik-e hámsejtekben. *In vitro* kísérleteinkben 110 mJ/cm² dózisú UV-B besugárzásnak tettük ki a HaCaT keratinocitákat, majd 24 órán keresztül követtük a PRINS RNS mennyiségi változásait. Ez a sugárdózis a sejtek vitalitását nem befolyásolta. Q-RT-PCR kísérleteink tanúsága szerint (5.3/7 ábra, A panel) UV-B besugárzás hatására a PRINS gén expressziója indukálódik: már három órával a besugárzást követően szignifikánsan megnőtt ($p < 0,05$) a PRINS RNS mennyisége, amely aztán a maximális, a besugározatlan sejtekhez viszonyított közel tizenkétszeres mennyiségét 24 órával a besugárzás után érte el.

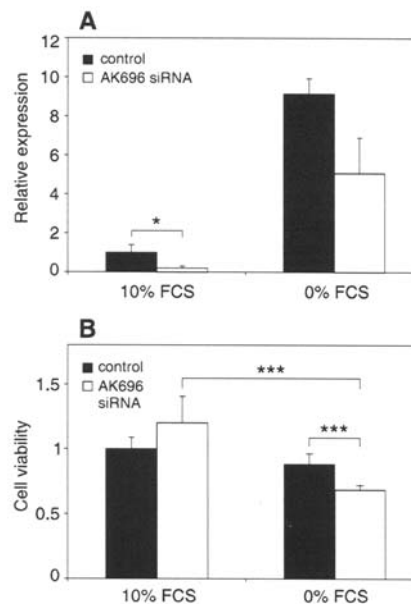
Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy vírusfertőzés hatására indukálódik-e a PRINS gén expressziója. HaCaT keratinocitákat együtt tenyésztettünk Herpes Simplex Vírus-1-gyel (HSV-1), melynek titere 0,01 PFU/sejt volt. A fertőzést követően 24 órán keresztül követtük a PRINS gén expresszióját és Q-RT-PCR kísérleteink eredménye szerint a HSV-1 vírussal való tenyésztés szintén szignifikánsan ($p < 0,05$) megnövelte a PRINS RNS mennyiségét a HaCaT keratinocitákban. A génextpresszió indukciója már igen hamar, a tenyésztés harmadik órájában jelentkezett, majd maximumát 6 óránál érte el (5.3/7 ábra, B panel). Mivel ismert, hogy a vírus fertőzések a gazdasejtben a fehérjék átírását gátolják,

arra is kíváncsiak voltunk, hogy a transzláció direkt gátlása vajon hatással van-e HaCaT keratinocitákban a PRINS gén expressziójára. Ezért a HaCaT keratinocitákat 20 µg/ml koncentrációjú cikloheximiddel kezeltük, majd tizenkét órán át követtük a PRINS RNS mennyiségi változásait. A cikloheximid hatása igen gyorsan, már félóra elteltével jelentkezett, amikor is szignifikáns mértékben ($p < 0,01$) megemelkedett a PRINS gén expressziója, a cikloheximid indukáló hatása tizenkét órán keresztül megfigyelhető volt (5.3/7 ábra, C panel).

HaCaT keratinocitákkal végzett *in vitro* kísérleteink eredményei mind arra utaltak, hogy a PRINS nem kódoló RNS gén expresszióját különböző stresszfaktorok nagymértékben indukálják. Felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon a PRINS RNS szerepet játszik-e a sejtek stresszválaszának kialakításában. Ennek eldöntésére funkcionális vizsgálatokat végeztünk, melyekben egy vektor alapú RNS csendesítési módszerrel csökkentettük a PRINS RNS mennyiségét HaCaT sejtekben, majd azt vizsgáltuk, hogy mindez hatással van-e a sejtek stresszválaszára. A PRINS gén három különböző szakaszára terveztünk csendesítő oligókat (siRNA), ill az egyik szekvencia random módon összekevert nukleoditjaival negatív kontroll oligót állítottunk elő. Az AK696 jelű siRNS szignifikánsan csökkentette HaCaT sejtekben a PRINS RNS mennyiségét (5.3/8 ábra, A panel), ami arra utalt, hogy ez az oligo alkalmas a PRINS gén csendesítésére. Rendkívül érdekes volt az a megfigyelésünk is, és megerősítette a korábbi stresszindukációs kísérleteink eredményeit, miszerint a PRINS gén expressziója szérumentes körülmények között tenyésztett HaCaT keratinocitákban magasabb volt, mint a normál körülmények között tenyésztettekben; az AK696 siRNS konstrukció azonban ezt az emelkedett szintű expressziót is képes volt gátolni. Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a PRINS gén expressziójának csökkentése milyen hatással van a sejtek viabilitására stressz körülmények között. MTT esszével követtük a normál és szérumentes körülmények között tenyésztett HaCaT keratinociták viabilitását, melyek vagy a kontroll, vagy a csendesítő AK696 siRNS konstrukciót hordozták. Eredményeink szerint a normál körülmények között (10% FCS) tenyésztett HaCaT keratinocitákban a PRINS gén expressziójának csendesítése nem volt hatással a sejtek viabilitására, ellenben a szérumentes (0% FCS) táptalajban tartott HaCaT keratinocitákban a PRINS gén expressziójának csendesítése a sejtek viabilitásának szignifikáns csökkenését okozta ($p < 0,001$) (5.3/8 ábra, B panel). Ezzel a kísérlettel bizonyítottuk, hogy a PRINS gén stressz körülmények között megfigyelhető expresszió növekedése nem csupán kísérő jelensége a sejtek stresszválaszának, hanem a PRINS nem kódoló RNS szerepet játszik a keratinociták stresszválaszának kialakításában.



5.3/7 ábra. Környezeti stressz faktorok indukálják a PRINS gén expresszióját. A, HaCaT keratinocitákat UV-B fényel besugaraztunk (110 mJ/cm²), majd mintákat vettünk a jelzett időpontokban. B, HaCaT keratinocitákat 0,01 PFU HSV-1-gyel tenyésztettünk együtt, majd a jelzett időpontokban mintákat vettünk. C, Cikloheximid transzláció gátló szerrel (20 µg/ml) kezeltük a HaCaT keratinocitákat, majd a jelzett időpontokban mintákat vettünk. A PRINS gén expresszióját Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. Az ábrázolt relatív génextpressziós eredményeket a kezeletlen sejtekben mért adatokhoz viszonyítva kaptuk. Az értékeket négy független kísérletből számoltuk ±S.E. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Student's teszt).



5.3/8 ábra. A PRINS gén expressziója specifikus siRNS konstrukcióval hatékonyan csendesíthető, és a csendesítés csökkenti a sejtek viabilitását stresszkörülmények között. A, A PRINS gén expresszióját specifikusan csendesítő oligót (AK696) és a kontroll oligót tartalmazó pSilencer vektorral transzfektált HaCaT keratinocitákat 10% és 0% FCS-t tartalmazó táptalajban tenyésztettünk 72 órán keresztül. A PRINS gén expresszióját Q-RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. Az ábrázolt relatív génextpressziós eredményeket a 10% FCS-ben tenyésztett sejtekben mért adatokhoz viszonyítva kaptuk. Az értékeket három független kísérletből számoltuk ±S.E. (* $p < 0,05$, Student's teszt). B, A PRINS gén expresszióját specifikusan csendesítő oligót (AK696) és a kontroll oligót tartalmazó pSilencer vektorral transzfektált HaCaT keratinocitákat 10% és 0% FCS-t tartalmazó táptalajban tenyésztettünk 168 órán keresztül. A sejtek viabilitását MTT esszével mértük. Az ábrázolt eredményeket a 10% FCS-ben tenyésztett kontroll sejtekben mért adatokhoz viszonyítva kaptuk. Az értékeket tíz független kísérletből számoltuk ±S.D. (** $p < 0,001$, Student's teszt).

6. Megbeszélés

6.1. A keratinocita proliferáció szabályozásának vizsgálata multifaktoriális bőrbetegségekben

Munkánk korai fázisában, a 2000-es évek elején arra törekedtünk, hogy létre hozzunk és molekulárisan jellemezzünk egy olyan *in vitro* rendszert, amelynek segítségével a munkacsoportunkat érdeklő gének és fehérjék expresszióját jellemezni tudjuk a keratinocita proliferáció és differenciáció során, valamint az így nyert eredményeinkkel, adatainkkal a kutatásaink középpontjában álló multifaktoriális bőrbetegségek pathogenezisére vonatkozó következtetéseket is le tudunk vonni.

Ily módon került sor a szinkronizált HaCaT sejtek *in vitro* kultúrájának kidolgozására, amelynek első molekuláris jellemzését az $\alpha 5$ integrin, a D1 ciklin, valamint a K1 és K10 molekulák expressziós mintázatának feltérképezésével végeztük el. Eredményeink szerint az $\alpha 5$ integrin és a D1 ciklin molekulák expressziója egyértelműen a sejtek aktív proliferációs állapotához voltak köthetők. A K1 és K10 gének expressziója nagymértékben lecsökkent, ahogy a sejtek proliferálni kezdtek (tehát új fehérjék szintézisére feltehetően már nem került sor), de az igen hosszú féléletidejű K1 és K10 fehérjék jelenléte az aktívan proliferáló HaCaT sejtekben is megfigyelhető volt. Irodalmi adatok utalnak rá, hogy a keratin molekulák nem csupán mechanikai szerepet töltenek be a keratinocitákban, hanem szabályozó funkciójuk is van (Paramio és mtsai, 1999), mivel az ektópiásan expresszáltatott K10 fehérje a HaCaT sejtek proliferációját gátolja. Feltételezzük, hogy olyan poszttranszlációs módosítások történnek a lassan lebomló, reziduális K10 fehérjén, hogy ezt a szabályozó funkcióját már nem tudja betölteni a sejtekben.

Eredményeink arra utalnak, hogy a különböző körülmények között tenyésztett HaCaT keratinociták jó modelljei a normál humán keratinocitáknak: a széruméheztetett, sejtnyugalmi fázisban levő sejtek a szuprabazálisan elhelyezkedő, nem proliferáló, differenciált (K1/K10⁺) keratinocitákat, míg a sejtnyugalmi fázisból kilépő, proliferáló ($\alpha 5$ integrin⁺ és K1/K10⁺) HaCaT sejtek az aktivált ún. tranziensen amplifikálódó normál humán keratinocita populációt reprezentálják. A szinkronizált HaCaT sejtek modellrendszere ezt követően lehetővé tette számunkra, hogy különböző, a pikkelysömör pathomechanizmusában feltehetően szerepet játszó tényezők keratinocita proliferációra/differenciációra gyakorolt hatását tanulmányozni tudjuk.

A kísérleti rendszer bevezetését követően első vizsgálataink arra irányultak, hogy a szérum faktorok és az etilalkohol, ill. az aceton keratinocita proliferációra gyakorolt hatásait vizsgáljuk. Kísérleteink adatai szerint a szérum faktorok HaCaT keratinocitákban indukáló hatással vannak a proliferáló sejtekre jellemző $\alpha 5$ integrin gén expressziójára és gátló hatással a differenciálódó keratinocitákat markerező K1 gén kifejeződésére. Ismert, hogy a normál sebgyógyulás folyamán a keratinociták direkt kapcsolatba kerülnek szérum faktorokkal, és ez indukálja a keratinociták proliferációját, például a szérum egyik komponense, a fibronectin az $\alpha 5$ integrin ligandja és indukáló hatással van annak expressziójára (Delcommenne és Streuli, 1995; Huang és mtsai, 1994; LaFlamme és mtsai, 1992). A tünetes és a tünetmentes pikkelysömörös bőr bazális membránjára jellemző strukturális abnormalitásokat olyan „mikro sebekként” is értelmezhetjük, amelyek lehetővé teszik a dermisz felől szérum faktorok beszűrődését az epidermiszbe és ott direkt módon is befolyásolhatják a keratinociták proliferációját. Ugyanezt a gondolatmenetet követve értelmezhetjük azt az eredményünket is, hogy az etanolnak és az acetonnak direkt proliferációt serkentő hatása van a keratinocitákra, és ennek szerepe lehet a pikkelysömör pathogenezisében. Ismert tény, hogy az aceton az alkoholisták vérében magasabb koncentrációban van jelen, mint a nem italozó egyének vérében, és hogy a vér aceton koncentrációja jó indikátora az alkoholfogyasztásnak. *In vitro* kísérleteink eredményei tehát hozzájárultak annak a klinikai megfigyelésnek az értelmezéséhez, miszerint a fokozott alkoholfogyasztás a pikkelysömörös betegek tüneteinek romlását eredményezi.

Egy másik kísérletsorozatunkkal a pikkelysömörös tünetmentes bőrben megfigyelhető abnormalis extracelluláris mátrix egyik komponensét, az EDA motívumot hordozó fibronectin izoformát elemeztük részletesen. *In vitro* kísérleteinket HaCaT sejtekkel végeztük, és eredményeink arra utalnak, hogy a HaCaT sejtek immortalizált sajátosságaihoz hozzájárul az a tény, hogy a normál humán keratinocitákhoz viszonyítva ezek a sejtek jóval nagyobb mennyiségű fibronectint termelnek és az EDA⁺ fibronectin aránya ezen belül jóval magasabb. A sejtek által termelt és az extracelluláris térbe kibocsátott EDA⁺ fibronectin hozzákötődik receptorához, az $\alpha 5$ integrinhez, ily módon stabilizálja azt, és hozzájárul annak magasabb szintű membrán expressziójához (Xia és Culp, 1995). Feltételezzük, hogy a fent leírt folyamat hozzájárul ahhoz a pikkelysömörben megfigyelhető jelenséghez, miszerint a tünetmentes bőrben magasabb az $\alpha 5$ integrin fehérje expressziója, anélkül, hogy az $\alpha 5$ integrin mRNS szintje magasabb lenne. Az eredmények arra utalnak, hogy a megnövekedett $\alpha 5$ integrin szintért nem transzkripció

szintű indukció a felelős, hanem az EDA⁺ fibroektin által kiváltott receptor stabilitás növekedés. Eredményeink szerint maguk a keratinociták a forrásai az EDA⁺ fibroektinnek, tehát feltehetően egy autokrin stimuláló folyamat eredménye a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták magasabb $\alpha 5$ integrin fehérje expressziója, és ennek következtében a keratinociták fokozott proliferációs válaszkészsége a külső stimulusokra.

Annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy vajon milyen molekuláris folyamatok állnak a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták EDA⁺ fibroektin termelése mögött, további vizsgálatokat igényel. Irodalmi adatokból azonban tudjuk, hogy a transzformáló növekedési faktor béta 1 és 2 (TGF- $\beta 1$ és TGF- $\beta 2$) megemelik az EDA⁺/EDA⁻ fibroektin izoforma arányt sertés trabekuláris sejtekben (Li és mtsai, 2000). Ismert az is, hogy pikkelysömörben mind a TGF- β család tagjai, mind receptoraik magasabb szinten fejeződnek ki (Leivo és mtsai, 1998; Wataya-Kaneda és mtsai, 1996), feltételezzük tehát, hogy hozzájárulnak a pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban elsőként általunk kimutatott emelkedett EDA⁺ fibroektin expresszióhoz.

További, a pikkelysömör pathogeneziséhez feltehetően hozzájáruló keratinocita rendellenességre mutattak rá azok a vizsgálataink is, amelyekben az FGFR2-IIIb receptor molekula keratinocita proliferáció szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltuk. *In vitro* kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy az FGFR2-IIIb magas szintű expressziója a keratinociták aktív proliferációs állapotához kötött. Ezekkel a kísérletekkel az volt a célunk, hogy egy, az irodalomban évek óta fennálló ellentmondást oldjunk fel, miszerint az FGFR2-IIIb expressziójának indukciója a keratinocita differenciáció (Capone és mtsai, 2000; Marchese és mtsai, 1997; Visco és mtsai, 2004), vagy az aktív proliferáció (Finch és mtsai, 1997; Zhou és mtsai, 1996) során következik be. Kísérleteink eredményei egyértelműen arra utalnak, hogy az FGFR2-IIIb expressziójának indukciója a keratinociták proliferatív aktivációjához kapcsolható, és nem a K10 expresszióval jellemzett differenciációs programhoz.

Az irodalomban mindezidáig csak olyan adatok jelentek meg az FGFR2-IIIb pikkelysömörben történő vizsgálatáról, ahol a szerzők a pikkelysömörös tünetes és tünetmentes bőrt vetették össze. Az FGFR2-IIIb mRNS expresszióját elsőként a mi munkacsoportunk hasonlította össze egészséges, pikkelysömörös tünetes és tünetmentes epidermiszben. Eredményeink szerint nem csupán a hiperproliferáló keratinocitákkal jellemzett tünetes epidermiszben, hanem a tünetmentes epidermiszben is magasabb az FGFR2-IIIb mRNS expressziója. Feltételezzük, hogy ez a tény is hozzájárulhat a

pikkelysömörös tünetmentes epidermisz keratinocitáinak munkacsoportunk által is demonstrált (Bata-Csörgő és mtsai, 1995a) pre-aktivált állapotához, amely aztán a T sejt limfokin indukció során tapasztalható fokozott proliferatív válaszkészségben mutatkozik meg. Kísérleteink azonban nem csupán az FGFR2-IIIb pikkelysömörben tapasztalható expressziós vizsgálatát célozták, hanem a betegség gyógyításában használt dithranol hatásmechanizmusát is szerettük volna mélyebben megvizsgálni. Eredményeink szerint a dithranol, mely az eddig elfogadott nézetek szerint közvetlenül a pikkelysömörös keratinociták hiperproliferációját gátolja, és ez úton fejt ki hatását, az FGFR2-IIIb mRNS és fehérje expresszióját is gátolja. Elsőként szolgáltatunk adatot arra nézve, hogy az FGFR2-IIIb is azon növekedési faktor receptorok között van, úgy mint az epidermális növekedési faktor receptorok (Kemény és mtsai, 1993), interleukin-8 receptor (Kemény és mtsai, 1994), amelyek expresszióját a dithranol gátolja. A tény, miszerint a dithranol hatására kialakuló keratinocita proliferáció gátlás az FGFR2-IIIb expressziójának csökkenésével jár együtt, tovább erősíti azt a megállapításunkat, hogy a receptor magas szintű expressziója az aktívan proliferáló, nem pedig a differenciálódó keratinociták sajátja.

A D típusú ciklinek a sejtciklus G1 fázisának kulcsfontosságú szabályozói. Számos irodalmi adat utal rá, hogy a D ciklinek specifikus funkciókkal bírnak, miszerint a D1 ciklin a őssejt kompartmentből való kilépés fázisában játszik szerepet (Xu és mtsai, 2003), míg a D3 ciklin nagymértékű felhalmozódását a posztreplicatív, differenciálódó keratinocitákban találták a legmagasabb szintűnek (Bartkova és mtsai, 1998). Munkacsoportunk D ciklinekkel kapcsolatos korábbi adatait tenyésztett normál keratinociták tanulmányozása során szerezte, áramlásos citometriai vizsgálatokkal (Bata-Csörgő és mtsai, 1996). Ezek szerint a G_0 sejtnyugalmi fázisban lévő $K1/K10^-$ normál keratinociták a D1 ciklint fejezik ki elsőként, amikor az első sejtciklusba belépnek, majd a D1 ciklin expressziója lecsökken és a D2 ciklin kifejeződése válik detektálhatóvá. A normál humán tenyésztett keratinocitákon kapott adatokat nagymértékben megerősítették szinkronizált HaCaT keratinociták tanulmányozása során kapott eredményeink. Ezek szerint egyértelműen kijelenthetjük, hogy a D típusú ciklinek funkciója keratinocitákban nem redundáns, hanem diszkrét funkciókkal bírnak: a D1 ciklin a G_0 sejtnyugalmi fázisból való kilépés egyik szabályozó faktora, míg a D2 és D3 ciklinek a gyors egymást követő osztódásokon áteső sejtekben töltenek be szabályozó szerepet. D ciklinekkel kapcsolatos kísérleteink eredményei azt is megerősítették, hogy a szinkronizált HaCaT sejtek milyen

érzékeny és jól használható modell rendszert nyújtanak a keratinocita proliferáció és differenciáció tanulmányozásához, hiszen 12 órás különbséggel bekövetkező gén-és fehérje expressziós különbségeket is rendkívül megbízhatóan tudunk vele kimutatni.

Ismert, hogy az keratinocita integrinek, hasonlóan más sejttípusokhoz, fontos szabályozó szerepet töltenek be az epidermisz homeosztázisának fenntartásában. Az extracelluláris mátrix egyik fontos komponense a celluláris fibronectin, melynek receptora keratinocitákon az $\alpha 5$ integrin. Munkacsoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták emelt szinten fejezik ki az $\alpha 5$ integrint (Bata-Csörgő és mtsai, 1998), valamint hogy maguk a keratinociták a forrásai az EDA⁺ fibronectinnek (Széll és mtsai, 2004), melynek jelenlétét a tünetmentes bőrben elsőként Ting és munkatársai írták le (Ting és mtsai, 2000). Vizsgálataink szerint a fibronectin- $\alpha 5$ integrin ligand-receptor indukált jelátviteli folyamatok részt vesznek a D1 ciklin mRNS expressziójának szabályozásában és hozzájárulnak a pikkelysömörben megfigyelhető keratinocita hiperproliferációhoz. Saját eredményeinkkel összhangban az SCC12 jelű laphámkarcinoma sejtvonalban az $\alpha 5$ integrin funkciójának GT1b ganglioziddal való gátlása szintén a D1 ciklin expressziójának gátlását eredményezte (Wang és mtsai, 2001).

A D ciklinek kifejeződését mind mRNS, mind fehérjeszinten megvizsgáltuk pikkelysömörben. Mivel a pikkelysömörben tapasztalható hiperproliferációért a fiziológias körülmények között sejtnyugalmi fázisban levő K1/K10⁻ $\beta 1$ integrin⁺ keratinociták aktivációja a felelős, arra számítottunk, hogy a D1 ciklin emelkedett szintű kifejeződését fogjuk találni a pikkelysömörös tünetes epidermiszben mind mRNS, mind fehérjeszinten. Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy a tünetes epidermiszben a D1 ciklin mRNS expressziója nem mutat szignifikáns különbséget az egészséges és a tünetmentes pikkelysömörös epidermiszhez viszonyítva, viszont az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei szerint fehérje szinten a D1 ciklin magasabb szinten, és eltérő intracelluláris mintázattal fejeződik ki a tünetes epidermisz keratinocitáiban, mint az egészséges epidermiszben. A gén-és fehérje expressziós szinten tapasztalt ellentmondás magyarázata az lehet, hogy a D típusú ciklinek expressziója nem csupán transzkripció és poszt-transzkripció szabályozás alatt áll, hanem ubiquitin-mediált célzott lebontásuk is fontos szabályozó tényező (Chung és mtsai, 2006; Diehl és mtsai, 1998; Okabe és mtsai, 2006; Yang és mtsai, 2007). A tény, miszerint a tünetes epidermisz bazális és szuprabazális keratinocitái között nagyobb számú D1 ciklin pozitív sejtet figyeltünk meg, anélkül, hogy tünetes epidermisz mRNS szinten magasabban expresszálta volna a D1 ciklin-t, mint az egészséges epidermisz, arra utal, hogy a pikkelysömörös tünetes keratinocitákban a D1

ciklin lebontása valamilyen módon zavart szenved. Feltételezzük, hogy a lebontási folyamatok zavara miatt fennálló magasabb D1 ciklin fehérje expresszió hozzájárul ahhoz, hogy a $K1/K10^- \beta1$ integrin⁺ aktívan proliferáló bazális keratinociták valamilyen mértékben megtartsák összejt potenciáljukat. Ezt a feltételezésünket erősíti az a Yamamoto és munkatársai (Yamamoto és mtsai, 2002) által közölt eredmény is, miszerint a D1 ciklin-t transzgenikusan kifejező keratinocitákat nem lehet kalciummal differenciáltatni, mert rezisztensek erre a differenciációt indukáló hatásra.

Molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk vénás eredetű lábszárfekélyben is, amely szintén egy zavart keratinocita proliferációval jellemzett multifaktoriális bőrbetegség. Célunk az volt, hogy két olyan receptor molekula, a szindekán-4 és a neurofilin-1, expresszióját tanulmányozzuk, amelyekről ismert, hogy szerepet játszanak a normál sebgyógyulás folyamatában (Echtermeyer és mtsai, 2001; Heldin and Westermarck, 1999; Kurschat és mtsai, 2006; Mundhenke és mtsai, 2002; Takashima és mtsai, 2002). Ismert, hogy a keratinociták mindkét molekulát kifejezik (Gagnon és mtsai, 2000; Lundqvist és Schmidtchen, 2001). Vizsgálatainkhoz egészséges egyénektől vett bőrmintákat és vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrmintáit használtuk. Ezzel a kísérleti felállással azt szeretnénk volna megállapítani, hogy a két receptor molekulának van-e olyan expressziós eltérése a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrmintáiban, amely a kóros sebgyógyulást predisponálja és így hozzájárul a kórképre való hajlam kialakításához.

A vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrmintáinak és az egészséges egyének bőrmintáinak megfestésével mi is igazoltuk, hogy mind a szindekán-4-et, mind a neurofilin-1-et kifejezik az epidermális keratinociták, de az epidermiszben egyik receptor molekula esetében sem találtunk expressziós különbséget, sem fehérje, sem mRNS szinten az egészséges és a lábszárfekélyes tünetmentes minták összehasonlítása során. Eredményeink arra utalnak, hogy ennek a két receptor molekulának nincs olyan expressziós eltérése a keratinocitákban, amely esetleg befolyásolná a két receptor molekula működését a vénás eredetű lábszárfekélyben és pathogenetikai faktorként szerepelne.

A dermisz tanulmányozása során azonban azt találtuk, hogy a szindekán-4 mind mRNS, mind fehérje szinten kisebb mennyiségben expresszálódik a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrmintáiban. Feltételezzük, hogy a szindekán-4 dermiszben tapasztalt alacsonyabb szintű expressziója valamilyen módon befolyásolja annak működését, és ezzel hozzájárul a lábszárfekélyben tapasztalható kóros sebgyógyulás

kialakulásához. Annak megválaszolása, hogy a dermisz mely sejtjeinek abnormális szindekán-4 expressziója bír pathogenetikai szereppel, további vizsgálatokat igényel. Immunhisztokémiai vizsgálataink azt mutatták, hogy a szindekán-4 a dermisz sejtjei közül a fibroblasztokban, a perikapilláris gyulladáisos sejtekben, valamint a kapilláris endotélben fejeződött ki. Echtermeyer és munkatársai (Echtermeyer és mtsai, 2001) eredményei szerint a szindekán-4 hiányos egerekben megfigyelhető kóros sebgyógyulás során abnormális angiogenezist és gyulladási folyamatokat találtak, elképzelhető tehát, hogy a vénás lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrének dermiszében általunk kimutatott alacsonyabb szintű expressziója hozzájárul ezeknek a folyamatoknak a kóros regulációjához. Ismert azonban az is, hogy a szindekán-4 az FGFR2 ko-receptorra (Echtermeyer és mtsai, 2001; Mundhenke és mtsai, 2002), melynek IIIc izoformája kifejeződik a fibroblasztokon (Baraniak és mtsai, 2003). Nem zárhatjuk ki tehát annak a lehetőségét sem, hogy a szindekán-4 csökkent expressziója az FGFR2-IIIc-szindekán-4 receptor-ko-receptor által mediált jelátviteli utak működését befolyásolja a dermisz fibroblasztjaiban és ezzel hozzájárul a kóros sebgyógyulás kialakulásához.

6.2. Multifaktoriális bőrbetegségekre hajlamosító polimorfizmusok azonosítása és vizsgálata

Munkánk során három multifaktoriális bőrbetegségben végeztünk polimorfizmus vizsgálatokat.

- Ennek eredményeképpen azonosítottunk egy polimorfizmust a humán pigmentáció kialakításában alapvető szerepet játszó MC1R génen, amely feltehetően protektív genetikai faktor a vitiligo betegség kialakulása szempontjából.
- Kimutattuk, hogy az FGFR2 gén egy 3' nem transzlálódó régiójában elhelyezkedő SNP-je a vénás eredetű lábszárfekély kialakításában hajlamosító genetikai faktor lehet, valamint hogy ugyanebben a multifaktoriális bőrgyógyászati kórképben a TNF α gén -308 promóter polimorfizmusa feltehetően áttételesen, az obezitás kialakításában betöltött hajlamosító szerepén keresztül fejt ki a vénás eredetű lábszárfekélyben is megfigyelhető genetikai predisponáló hatását.

- Egy familiáris melanómában szenvedő férfibetegben azonosítottunk egy rendkívül ritkán előforduló CDKN2A mutációt, amelynek homozigóta formában történő megjelenését elsőként mi ismertettük az irodalomban.

A vitiligo egy komplex pigmentációs betegség, melyről ismert, hogy háttérben multigenikus hajlamosító faktorok állnak. A legújabb adatok szerint az MHC génjei, valamint az antigén prezentációban résztvevő fehérjéket kódoló gének polimorfizmusai is szerepet játszhatnak a betegség kialakításában (Blomhoff és mtsai, 2005; Casp és mtsai, 2003). Ezek a genomikai adatok nagyon jól alátámasztják a vitiligo autoimmun betegségként való, régóta fennálló megítélését. Számos adat utal ugyanakkor arra is, hogy immunszabályozás génjein kívül egyéb gének polimorfizmusai is hozzájárulhatnak a betegségekre való hajlam kialakításához (Casp és mtsai, 2002; Jin és mtsai, 2004a; Jin és mtsai, 2004c; Le Poole és mtsai, 2001; Nath és mtsai, 2001; Tursen és mtsai, 2002). Mindeztidáig azonban csupán egy olyan közlemény látott napvilágot, amely a humán pigmentáció kialakításában szerepet játszó gének (MC1R és ASIP) polimorfizmusainak vitiligo pathogenezisében való szerepét vizsgálta. Na és munkatársai (Na és mtsai, 2003) koreai betegek vizsgálata során kapott adatai azonban arra utaltak, hogy egyik gén polimorfizmusai sem járulnak hozzá a vitiligóra való hajlam kialakításához. Mivel ismert, hogy az MC1R polimorfizmusok gyakorisága és a multifaktoriális bőrbetegségekre való hajlamosító szerepe különböző etnikai csoportokban nagy eltéréseket mutat (Harding és mtsai, 2000; Nelson és Tsao, 2009), a koreai munka negatív eredménye ellenére elhatároztuk, hogy a magyar populációban megvizsgáljuk annak lehetőségét, hogy az MC1R gén polimorfizmusai szerepet játszanak-e a vitiligo pathogenezisében. Azt is elemeztük, hogy ugyanezek a polimorfizmusok hogyan vesznek részt a magyar populáció pigmentációjának kialakításában.

Munkánk során kilenc, már eddig is ismert és egy új, mindeddig leírásra nem került MC1R polimorfizmust azonosítottunk a magyar lakosság körében. A tíz polimorfizmus közül az öt leggyakrabban előfordulót vizsgáltunk abból a szempontból, hogy hogyan vesznek részt a pigmentáció kialakításában ill. a vitiligo pathogenezisében. Adataink jó egyezést mutattak a korábban főleg Nyugat- és Észak-Európában végzett kutatások eredményeivel (Harding és mtsai, 2000), és ugyanazokat a polimorfizmusokat azonosítottuk mi is, mint a korábbi tanulmányok. Érdekes módon azonban a magyar lakosság körében nagyon alacsony allél frekvenciával fordul elő az Asp294His polimorfizmus, amelyet a nyugat- és észak-európai tanulmányok a világos bőrszín

kialakításáért felelős egyik legfontosabb allélként tartanak számon (Valverde és mtsai, 1995). Az általunk elemzett öt polimorfizmus közül egynek az allél frekvenciája tért el szignifikánsan a vizsgált sötét (Fitzpartick III és IV) és világos (Fitzpartick I és II) bőrű magyar egyének körében. Az Arg160Trp allél minden bizonnyal szerepet játszik a magyar lakosság körében a világos bőrszín kialakításában. Erről a polimorfizmusról ismert, hogy az általa érintett aminosav az MSHR fehérje második intracelluláris doménjében helyezkedik el, amely az MSHR fehérje által mediált jelátviteli utak, és ezen keresztül a pigmentáció szabályozásában is szerepet játszik (Garcia-Borron és mtsai, 2005; Hawn és mtsai, 2005; Schioth és mtsai, 1999).

Ugyancsak az Arg160Trp polimorfizmus volt az, amely adataink szerint protektív genetikai faktor lehet a vitiligo pathogenezisében. Eredményeink szerint ez a polimorfizmus szignifikánsan magasabb arányban fordul elő a betegség által nem érintett magyar lakosok körében, mint a vitiligos betegek között. Munkahipotézisünket, miszerint melanocita-specifikusan kifejeződő fehérjék (például az MSHR) epitópjai szerepet játszhatnak a vitiligóban bizonyítottan lejátszódó, a melanociták destrukciójához vezető autoimmun folyamatok inicializálásában, genetikai és *in silico* elemzéseink is alátámasztják. Eredményeink arra utalnak, hogy az arginin aminosav triptofánra történő cseréje az MSHR fehérje érintett epitóp részletének antigenitási sajátságát csökkenti. Feltételezzük, hogy a polimorfizmus által érintett fehérje szakasz kisebb valószínűséggel indukálhat melanocita-specifikus autoimmun folyamatokat, és protektív genetikai faktorként működik a vitiligo kialakulásával szemben. Természetesen annak a lehetőségét sem zárhatjuk ki, hogy a polimorfizmus nem az MSHR fehérje antigenitási tulajdonságainak, hanem az általa indukált, a melanin pigment képződést szabályozó melanocita jelátviteli utak megváltoztatása révén vesz részt a betegség pathogenezisében.

Munkánk jelentőségét egyrészt abban látjuk, hogy mindeközül nem jelent meg olyan közlemény, amely a közép-európai, és azon belül is a magyar lakosság bőrszínét szabályozó genetikai faktorokat vizsgálta volna; másrészt mi szolgáltatunk az első adatot arra nézve, hogy MC1R gén nem csupán a pigmentáció szabályozásában, de pigmentációs rendellenességgel járó multifaktoriális bőrbetegség, a vitiligo pathogenezisében is szerepet játszik.

Egy másik munkánkban a szintén multifaktoriális bőrbetegségnek tekintett malignus melanoma genetikai hátterét tanulmányoztuk. Egy multiplex primér melanomában szenvedő férfibeteg és családjának genetikai analízise során azonosítottunk

egy rendkívül ritkán előforduló CDKN2A mutációt. Ezt az igen ritka ivarsejtvonal-beli mutációt mindezidáig négy esetben írták le. Elsőként egy olasz hasnyálmirigy carcinomában szenvedő betegben detektálták (Moore és mtsai, 2000), majd egy olasz multiplex primer melanomában megbetegedett páciensnél (Mantelli és mtsai, 2004), ill. egy olasz származású brazil melanomás betegben (Huber és Ramos, 2006). Ezek a betegek mindannyian heterozigóta formában hordozták a P48T mutációt. Az említett munkák egyikében sem vizsgálták az egyenes ági rokonok genetikai státusát, ezért ezekben az esetekben a P48T mutáció és a beteg fenotípus összefüggéséről sem lehetett következtetéseket levonni.

Della Torre és munkatársai (Della és mtsai, 2001) egy nagy, melanomára hajlamos családon végzett, kiterjedt genetikai vizsgálata feltárta, hogy a P48T mutáció hordozói nem kizárólag melanomára, hanem más malignus betegségekre is fogékonyabbak. Az ugyanebben az aminosav pozícióban bekövetkező, de eltérő nukleotid csere által okozott P48L mutáció tumoros megbetegedésre hajlamosító voltát is ismertette egy svéd munkacsoport (Platz és mtsai, 1997). A családtagokra is kiterjesztett analízis során kimutatták, hogy ez a mutáció malignus tumorokra, köztük melanomára, kifejezett hajlamot eredményez. Egy endogám holland közösség vizsgálata során Gruis és kutatócsoportja (Gruis és mtsai, 1995) a következőt figyelte meg: a CDKN2A gén exon 2-ben bekövetkezett kis delécióját (mely nagy valószínűséggel alapító mutáció) homozigóta formában hordozó melanomás családtagoknál nem volt klinikailag észlelhető különbség a betegség súlyosságában a heterozigóta hordozókhoz viszonyítva. Mindent egybevetve, a fenti adatok és jelen eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a CDKN2A gén mutációi mind homo-, mind heterozigóta formában erős melanoma predisponáló faktorok, azonban egyéb addicionális genetikai eltérések, mint például az MC1R gén egyes genetikai variációinak megléte is szükségesek lehetnek a betegség manifesztációjához.

A jelenleg ismertett magyarországi eset arra enged következtetni, hogy a CDKN2A génben létrejött P48T mutáció szorosan összefügg a multiplex primer melanoma kialakulásával. Esetünk támogatja azt az elméletet is, mely szerint a melanomára való hajlam multifaktoriális természetű: az allélok penetranciája nagyban függ környezeti, ill. egyéb genetikai tényezőktől, és földrajzi területenként nagyfokú változatosságot mutat (Bishop és mtsai, 2002). Betegünk heterozigóta mutáns szüleinél (akik jelenleg 65 ill. 71 évesek) máig nem manifesztálódott sem atípusos anyajegy szindróma, sem melanoma, sem egyéb malignus betegség, annak ellenére, hogy mezőgazdasággal foglalkoznak, így egész életükben erős napfény expozíciónak voltak kitéve. A fentiekén kívül esetünk amiatt is

ritkaságnak számít, mert a CDKN2A gén mutációit homozigóta formában csak elvétve detektálják. Ezek az esetek kiemelkedő jelentőségűek, hiszen egy alapvető sejtciklus szabályozó génben bekövetkező változások hatásának vizsgálatát teszik lehetővé a tumor képződésre.

Habár a beteg szüleinek nincsen tudomása a családban előfordult rokonházasságról, az a tény, hogy a rendkívül ritka P48T CDKN2A mutációt mind a ketten heterozigóta formában hordozzák, arra enged következtetni, hogy generációkkal korábban ez esetleg mégis bekövetkezhetett. Figyelemre méltó az a tény is, hogy ezt a mutációt mindezidáig kizárólag észak-olaszországi ősök leszármazottaiban detektálták. Az érintett magyar család viszont nem ismer olasz származású családtagot. Annak tisztázása, hogy vajon ez a mutáció függetlenül jött-e létre, vagy esetleg alapító mutáció keletkezett generációkkal ezelőtt, amely Észak-Olaszországból hazánkba vándorolt, vagy akár fordítva, további vizsgálatokat igényel.

Összefoglalva, a bemutatott eset megerősítette a rendkívül ritka P48T mutáció melanomára hajlamosító szerepét, azonban azt is kijelenthetjük, hogy a heterozigóta állapot önmagában nem vezet a betegség kialakulásához, hanem egyéb befolyásoló tényezők is szerepet játszanak annak manifesztációjában.

A vénás eredetű lábszárfekélyre való hajlam genetikai hátterének kutatása során azt találtuk, hogy az FGFR2 gén egy 3'UTR-ben található SNP-je feltehetően szerepet játszik a kórképre való hajlam kialakításában. Az általunk vizsgált, az adatbázisokban rs313581 számon nyilvántartott polimorfizmus a különböző humán rasszokban nagyon nagy különbségekkel detektálható: az afrikai fekete populációban gyakorlatilag nincs jelen, az ázsiai populációkban, Kínában és Japánban, 32 és 21%-os allél frekvenciával fordul elő, míg a kaukázusi populációban rendkívül magas, 42%-os a mutáns allél előfordulási gyakorisága az általános populációban. A mi, magyar populáción végzett tanulmányunk adatai is megerősítették az SNP magas előfordulási gyakoriságát a kaukázusi nagyasszban. Adatainkkal különböző populációgenetikai számításokat is végeztünk, és azt találtuk, hogy az FGFR2 gén általunk vizsgált 3'UTR SNP alléljainak megoszlása megfelelt a Hardy-Weinberg ekvilibriumnak, ami arra utal, hogy ez az SNP nincsen hatással a populációban lezajló természetes szelekcióra.

Egyre több adat utal arra, hogy a gének 3'UTR régiójában található genetikai variációknak szerepe van egyes kórképek kialakításában, oly módon, hogy a génről átíródó elsődleges mRNS transzkriptum stabilitását megváltoztatják, és ezáltal a „végtermékek”

tekinthető fehérje mennyiségét megnövelik, vagy lecsökkentik (Chen és mtsai, 2006; Chen és mtsai, 2006; Di Paola és mtsai, 2002; Vasilopoulos és mtsai, 2004). Feltételezzük, hogy az FGFR2 gén 3'UTR régiójában általunk vizsgált, a kontroll és betegcsoportban eltérő allél frekvenciával előforduló SNP is módosítja az elsődleges FGFR2 mRNS transzkript stabilitását. Ennek következtében az elsődleges transzkriptról alternatív splicing révén keletkező fehérjetermék(ek), a KGFR és/vagy a BEK mennyisége megváltozik, ami hatással lehet a re-epitelizáció (Maas-Szabowski és mtsai, 2001) és/vagy a sebgyógyulással asszociált angiogenezis (Auguste és mtsai, 2001; Shan és mtsai, 2004) folyamataira. A jövőben expressziós kísérletekkel tervezzük bizonyítani ezeket a feltételezéseinket, amelyek során a különböző genotípusú egyének bőréből származó mintákban hasonlítjuk össze a BEK és a KGFR gének/fehérjék expresszióját.

Érdekes kérdés még az is, hogy vajon az FGFR2 gén 3'UTR SNP általunk detektált allél frekvencia eltérése elsődlegesen a vénás elégtelenséggel áll-e összefüggésben, és az arra való hajlam kialakításán keresztül másodlagosan hajlamosít a nehezen gyógyuló lábszárfekély kórképének kialakítására. Ennek a kérdésnek a megválaszolására a jövőben olyan vizsgálatokat tervezünk, ahol az FGFR2 gén 3' UTR SNP előfordulását külön vizsgáljuk olyan vénás elégtelenségben szenvedő betegekben, akiknél kialakultak lábszárfekélyek és olyanokban is, akiknél nem.

A multifaktoriális betegségek genetikai hajlamosító faktorainak felderítése során nagy jelentősége van annak, hogy a vizsgálatokat minél homogénebb betegcsoportokon végezzük el, illetve, hogy az „eset” és a „kontroll” csoportok magán a vizsgálni kívánt multifaktoriális betegségen kívül minél jobban megfeleltethetők legyenek egymásnak. Egy-egy genetikai faktor multifaktoriális betegségekben játszott szerepének felderítése során nagyon fontos lehet a beteg (és gyakran ezzel együtt a kontroll) csoport ún. sztratifikálása, tehát bizonyos szempontok szerint való alcsoportokra osztása (Amos, 2007). Erre nagyon jó példa az a vénás eredetű lábszárfekély kutatása során végzett munkánk, melynek során azt vizsgáltuk, hogy a TNF- α -308 A allél milyen módon hajlamosít a kórkép kialakulására. A vizsgálat elvégzésére az sarkallt bennünket, hogy (Wallace és mtsai, 2006) egy sztratifikálatlan ausztrál vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegcsoport analízise során azt találták, hogy a TNF- α -308 A allélja genetikai faktorként szerepet játszhat a betegségre való hajlam kialakításában. Mivel ugyanerről a polimorfizmusról az is ismert volt, hogy inzulin rezisztenciára és obezitásra hajlamosít (Brand és mtsai, 2001; Hoffstedt és mtsai, 2000), valamint a klinikai gyakorlatból tudott,

hogy a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők között emelkedett az elhízottak aránya, elhatároztuk, hogy a beteg és a kontroll populációk testtömeg index alapján sztratifikált csoportjaiban megvizsgáljuk a TNF- α -308 A allél gyakoriságát. Eredményeink megerősítették Hoffstedt és Brand (Brand és mtsai, 2001; Hoffstedt és mtsai, 2000) adatait, miszerint ez a polimorfizmus feltehetően részt vesz az obezitásra való hajlam kialakításában. Rámutattunk arra is, hogy a Wallace és munkatársai által felfedett összefüggés a TNF- α -308 A allél és a vénás eredetű lábszárfekély kialakulása között feltehetően nem közvetlen, hanem másodlagos; az elsődleges összefüggés a polimorfizmus és az obezitás között áll fenn, és a TNF- α -308 A polimorfizmus az obezitásra való hajlam kialakításán keresztül játszik szerepet a vénás eredetű lábszárfekély pathogenezisében.

6.3. A PRINS nem-kódoló RNS azonosítása, szerepe a sejtek stresszválaszában és a pikkelysömör pathogenezisében

A kilencvenes évek végén csoportunk egy olyan kutatási programot indított, melynek elsődleges célja a pikkelysömör betegségekre hajlamosító, elsősorban keratinociták szintjén jelentkező pathogenetikai faktorok azonosítása volt. Erre a célkitűzésre az sarkallt bennünket, hogy előzetes eredményeink szerint a pikkelysömörös betegeknek már a tünetmentes keratinocitái is mutatnak olyan molekuláris és sejtszintű eltéréseket, amelyek a tünetek kialakulását előidéző immunológiai trigger faktorokkal szemben fokozott érzékenységgel ruházzák fel őket (Bata-Csörgő és mtsai, 1995). Programunkat egy nagyskálájú génexpressziós ún. differential display kísérlettel indítottuk, melynek elsődleges célja az volt, hogy olyan transzkripció szintű különbségeket azonosítsunk az egészséges és pikkelysömörös tünetmentes epidermisz minták között, amelyek szerepet játszhatnak a pikkelysömörre való hajlam kialakításában. Vizsgálataink során jónéhány olyan eltérő expressziójú gént azonosítottunk a két rendszerben, amelyekről átíródó fehérjék funkciója már ismert volt. Az egyik ilyen fehérje az extracelluláris mártix protein, a fibronektin, melynek EDA⁺ onkofötális formájáról Ting és munkatársai kimutatták (2000), hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a dermális-epidermális junction (DEJ) területén kifejeződik, amely kifejeződés nem jellemző az egészséges bőrre. A tény, hogy differential display kísérletünkkel mi is eltérő fibronektin expressziót igazoltunk az egészséges és tünetmentes pikkelysömörös epidermisz között azt bizonyította, hogy az általunk használt kísérleti megközelítés alkalmas volt kérdésünk megválaszolására. További vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy maguk a pikkelysömörös tünetmentes

keratinociták is képesek expresszálni a fibronektint és annak EDA⁺ onkofötális formáját (Széll és mtsai, 2004), így részben forrásai lehetnek a Ting és munkatársai által leírt (Ting és mtsai, 2000) fibronektinnek a DEJ területén.

Vizsgálataink során magasabb szintű expressziót mutatott mind a differential display, mind a reverz Southern kísérletekben egy olyan transzkriptum, amelynek funkciója ismeretlen volt. A cDNS-t (amelynek szekvenciája 10 napos humán embrió cDNS könyvtárból származik) az adatbázisokban AK022045 azonosítási számon lehet tanulmányozni. A cDNS *in silico* átírása nem eredményezett fehérje terméket, további homológia vizsgálataink viszont arra utaltak, hogy az AK022045 transzkriptum (melynek általunk 5' irányban meghosszabbított, teljes hosszúságú változatát PRINS-nek nevezzük) egy fehérjévé át nem íródó, szabályozó nem-kódoló RNS. 2008 óta a teljes hosszúságú PRINS transzkriptum is elérhető a nyilvános adatbázisokban GeneID: 100169750 azonosítási számon.

A kilencvenes évek közepétől jelentek meg azok a közlemények (Eddy, 1999; Moore, 1996), amelyek arra hívták fel figyelmünket, hogy a humán genom fehérjéket nem kódoló „junk DNS” szakaszairól számos olyan transzkriptum keletkezik, amely RNS-ként tölt be szabályozó funkciót. Ekkor már ismert volt a PRINS génnel nagyfokú szerkezeti homológiát mutató nem kódoló RNS gén, a BC200 is, amely neuron specifikusan fejeződik ki (Martignetti és Brosius, 1993), és az emberben és főemlősökben is konzervált struktúrát mutató monomerikus *Alu* retrotranspozíciós elemet hordoz (Cheng és mtsai, 1997). A BC200 nem kódoló RNS abnormális expressziója számos nem neuronális eredetű tumoros szövetben is detektálható (Chen és mtsai, 1997); és az 90-es évek végén valamint a 2000-es évek elején végzett intenzív kutatásoknak köszönhetően arra is fény derült, hogy BC200 nem kódoló RNS a dendritek posztszinaptikus területén, mint poszttranszkripciós modulátor funkcionál, egyes fehérjék expressziós szintjének szabályozójaként (Kobayashi és mtsai, 1998). A nem kódoló RNS-ek funkciójának megértéséhez elengedhetetlen a hozzájuk kapcsolódó nukleinsavak és/vagy fehérjék azonosítása. A BC200 nem kódoló RNS a legújabb kutatási eredmények szerint a „synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA interacting protein” (SYNCRIP) nevű fehérjével kölcsönhatva részét képezi a citoplazma nagy mRNS transzport granulumjainak és a poszt-szinaptikus fehérje szintézis szabályozásában vesz részt (Duning és mtsai, 2008). A PRINS gén BC200-zal, és más nem kódoló RNS-ekkel, úgy mint a BORG, H19 és PCGEM1 (Brannan és mtsai, 1990; Srikantan és mtsai, 2000; Takeda és mtsai, 1998) való szerkezeti homológiája azt sugallta, hogy az általunk azonosított gén az úgynevezett mRNS-szerű nem kódoló RNS gének

körébe tartozik. Ezekről a génekről ismert, hogy az mRNS molekulákhoz hasonlóan érési folyamatokon (splicing, poliadeniláció) esnek át, de róluk fehérjetermék nem képződik, hanem RNS-ként töltik be sejten belüli szabályozó funkciójukat a sejtben (Széll és mtsai, 2008).

Az *Alu* elemeket hordozó, fehérjévé át nem íródó, de a sejtekben stabil RNS-ként detektálható géntermékekről általánosan elfogadott tény, hogy expressziójuk magas szintje akkor figyelhető meg, ha a sejteket valamilyen formában stressz éri (Li és mtsai, 1999; Li és Schmid, 2001; Liu és mtsai, 1995; Rubin és mtsai, 2002). A PRINS gén esetében ezt a stresszt a HaCaT sejt kultúra kontaktgátlásával, széruméheztetéssel, UV-B besugárzással, víruskezeléssel, ill. direkt transzlációgátlással értük el. Eredményeink szerint bármilyen stresszhatás érte a HaCaT keratinocitákat, azok a PRINS gén expressziójának indukciójával válaszoltak. Eredményeink szerint tehát az *Alu* szekvenciákat hordozó nem kódoló RNS génekkel nem csupán szerkezeti homológiát mutat a PRINS gén, hanem stresszhatásokra adott expressziós válasza is jó egyezést mutatott ezzel a géncsoporttal.

Ezek a kísérletek egyrészt arra hívták fel a figyelmünket, hogy a PRINS valószínűleg tagja annak az *Alu* szekvenciákat hordozó RNS-ként működő géncsaládnak, amely szerepet játszik a sejtek stresszválaszának kialakításában; másrészt jól értelmezhető az a PRINS génextpressziós különbség is, amelyet a pikkelysömörös tünetmentes és tünetes epidermiszben tapasztaltunk. Számos irodalmi adat (Fleischmajer és mtsai, 2000; Ting és mtsai, 2000) és saját kutatási eredményeink (Bata-Csörgő és mtsai, 1995a; Széll és mtsai, 2004) is arra hívják fel a figyelmünket, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben az abnormális extracelluláris milió a keratinociták számára stresszt jelent, és feltételezzük, hogy ez is hozzájárul a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták külső indukciókra adott inherens, felfokozott reakciókészségéhez. Amikor azonban a pikkelysömörös tünetek kialakulásához vezető keratinocita hiperproliferáció külső hatásra indukálódik (lásd pikkelysömörös epidermisz és a T-limfokinekkal indukált pikkelysömörös tünetmentes epidermisz), a keratinociták felszabadulnak e stresszhatás alól és a PRINS gén expressziója határozottan csökkenni kezd.

Kísérleti eredményeink alapján feltételezzük, hogy a PRINS gén magasabb szintű kifejeződésének inkább a pikkelysömörre való hajlamnak, nem pedig magának a pikkelysömörös tünetnek a kialakításában van szerepe. Érdekes megfigyelésünk volt az is, hogy a PRINS gén expressziója igen nagy egyéni különbségeket mutatott, amikor tünetes/tünetmentes pikkelysömörös epidermisz mintákban hasonlítottuk azt össze: bár a minták átlaga azt mutatta, hogy a tünetmentes epidermiszben szignifikánsan magasabb a

gén expressziója, két beteg anyagában mégis azt találtuk, hogy a tünetes és a tünetmentes epidermiszben megközelítőleg egyenlő mértékű volt a PRINS expressziója. Feltételezzük, hogy azonosítottunk egy olyan újabb faktort, amelynek nagy egyedi különbségeket mutató kifejeződése a pikkelysömör klinikai heterogenitását tükrözi. Azt sem zárhatjuk ki azonban, hogy a PRINS gén nagy egyéni különbségeket mutató kifejeződése annak köszönhető, hogy valamely még nem azonosított, az expresszióját befolyásoló faktor működése tér el nagymértékben a pikkelysömörös betegek körében. Elképzelhető, hogy a PRINS magasszintű kifejeződése a pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban az őket körülvevő abnormális extracelluláris környezet hatását tükrözi, de nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy a PRINS nem kódoló RNS valamilyen módon részt vesz a keratinociták proliferációjának/differenciációjának szabályozásában. Erre vonatkozó előzetes adataink szerint a PRINS nem kódoló RNS szabályozza az antiapoptotikus hatású, G1P3 mRNA expresszióját (Szegedi és mtsai, elbírálás alatt), valamint fizikailag kölcsönhat a nukleofozmin nevű fehérjével (Szegedi és mtsai, a kézirat előkészítés alatt). A nukleofozminról a közelmúltban kimutatták (Liu és mtsai, 2008), hogy a kromatin tartalmú CCCTC kötő faktorról (CTCF) együttműködve részt vesz a D1 ciklin expressziójának szabályozásában. A D1 ciklin fehérje pikkelysömörben megfigyelhető emelkedett expresszióját munkacsoportunk is részletesen elemezte (Belső és mtsai, 2008). Pikkelysömörrel kapcsolatos kutatómunkánk egyik ígéretes aspektusának tartjuk, hogy a betegség pathogenezisét kétfajta, sejtbiológiai és molekuláris biológiai, megközelítésből vizsgáló munkánk eredményei ezen a ponton feltételezhetően találkozni fognak. A PRINS-nukleofozmin komplex keratinociták D1 ciklin expressziójában és sejtciklus szabályozásban betöltött szerepének tisztázására további kísérleteket fogunk végezni a közeljövőben.

A PRINS nem kódoló RNS-t saját kísérleteink során humán epidermiszben azonosítottuk, valamint elsődleges jellemzését is egy immortalizált keratinocita sejtvonalon végeztük el. Természetesen kíváncsiak voltunk arra is, hogy a PRINS nem kódoló RNS expressziója csak a bőrre korlátozódik-e vagy egyéb humán szövetekben és szövetekben is kifejeződik. Eredményeink szerint a PRINS gén az általunk tanulmányozott összes humán szervben és szövetben kifejeződik, tehát ellentétben a szoros neuron specifikus kifejeződést mutató BC200 nem-kódoló RNS génnel, a PRINS nem kódoló RNS gén feltehetően a sejtek általános stresszválaszának kialakításában szerepet játszó szabályozó RNS. Az a tény azonban, hogy a különböző szövet típusok között a PRINS gén expressziója nagymértékű eltérést mutat, arra utal, hogy kifejeződése nem konstitutív,

hanem szerv- és szövetspecifikusan szabályozott. További kutatások tárgyát képezi annak a kiderítése, hogy a PRINS nem kódoló RNS gén szövetspecifikus expressziójának szabályozásáért milyen faktorok felelősek. Eredményeink szerint a legmagasabb szintű PRINS RNS expresszió a vénákban figyelhető meg. Ismert, hogy a pikkelysömörös tünetes bőrben a dermisz mikrovaskulaturája megváltozik (Creamer és mtsai, 2002; Detmar és mtsai, 1994) és hogy ezek a változások már a tünetek kialakulásának kezdő fázisában megfigyelhetők (Creamer és mtsai, 2002). A vénákban mért magas PRINS RNS expresszió azt sugallja, hogy feltehetően az endotél sejtekben is kifejeződik a gén, ahol az angiogenezishez kapcsolódó folyamatok szabályozásában vehet részt.

A fehérjévé át nem íródó, szabályozó funkciójukat RNS-ként betöltő génekkel kapcsolatos kutatások az elmúlt néhány év nagy figyelmet keltő területévé váltak: 2002-ben a Science magazin az év első számú, nagy áttöréseként értékelte az ezzel kapcsolatos vizsgálatok eredményeit (Kennedy, 2002). Az azóta eltelt időben a téma kutatása hihetetlen lendületet kapott, egyre több információval rendelkezünk a nem-kódoló RNS-ek intracelluláris funkciójáról, ill. szerepükről a humán betegségek pathogenezisében (Xie és mtsai, 2008). A nem kódoló RNS-ek nagy családjának tagjai közül a legtöbb információval az ún. mikroRNS-ekről rendelkezünk (Erson és Petty, 2008; Sonkoly és mtsai, 2008), de az ún. mRNS-szerű nem kódoló RNS-ekről is, mely csoportba a PRINS RNS is tartozik, egyre többet tudunk (Széll és mtsai, 2008).

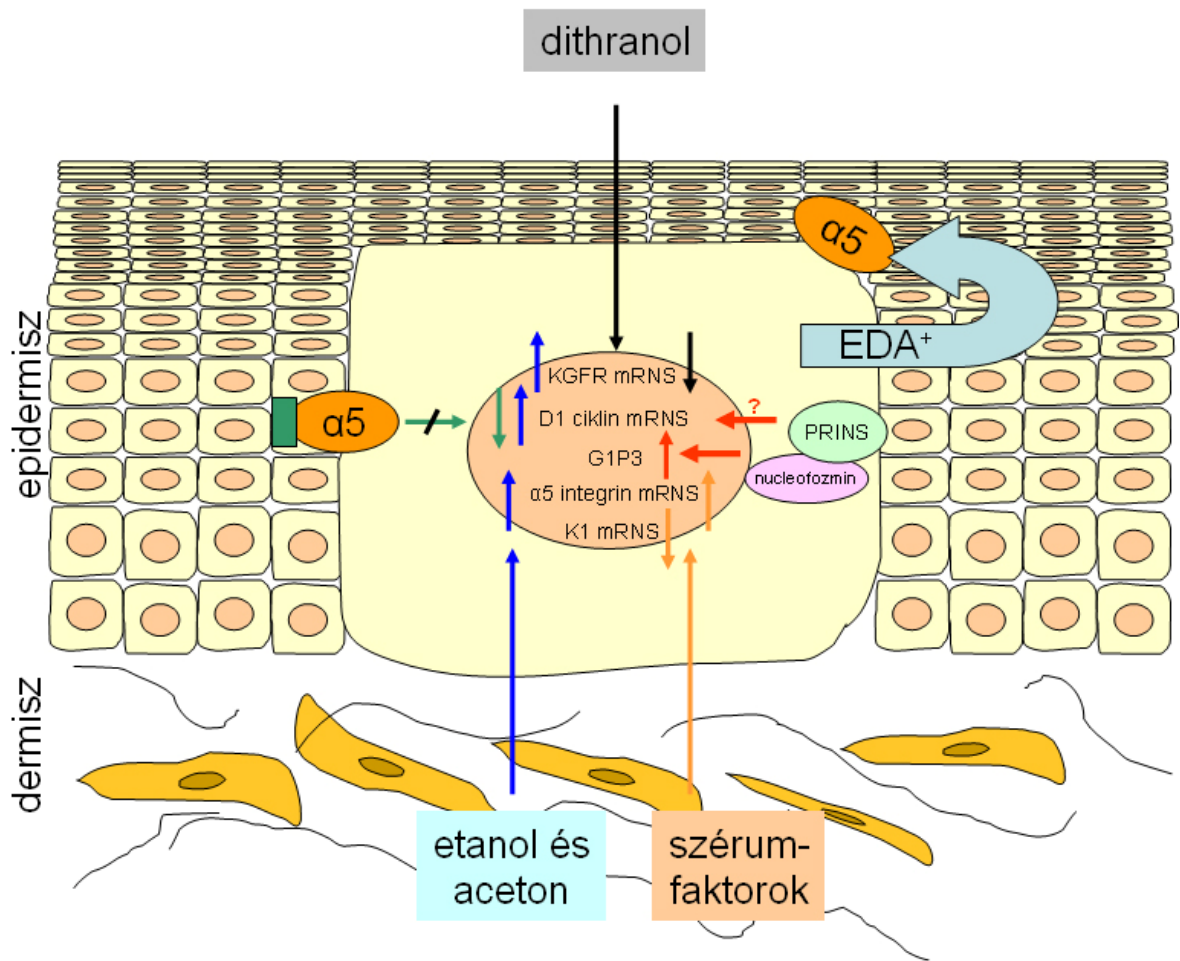
A PRINS nem kódoló RNS-sel kapcsolatos, jelenleg is folyó munkánk jelentőségét abban látjuk, hogy egyrészt hozzájárulunk a pikkelysömörre hajlamosító molekuláris faktorok azonosításához, másrészt napjaink molekuláris biológiai kutatásainak egyik új ágához, a nem-kódoló szabályozó RNS-ek azonosításához és funkcióik megismeréséhez is csatlakoztunk.

7. Összefoglalás

A dolgozatban bemutatott vizsgálataink célja immunmediált multifaktoriális bőrgyógyászati kórképek molekuláris és genomikai vizsgálata volt. Munkánk során mutációkat és polimorfizmusokat azonosítottunk, gén-és fehérje expressziós ill. funkcionális vizsgálatokat végeztünk, amelyek során a pikkelysömör, a vitiligo, a vénás eredetű lábszárfekély és a malignus melanoma pathogenezisében szerepet játszó genomikai és molekuláris faktorokat vizsgáltuk. Munkánk egy részét a fenti betegségek által érintett bőrmintákon végeztük, ill. *in vitro* vizsgálatainkhoz normál humán tenyésztett keratinocitákat és HaCaT keratinocitákat használtunk.

Pikkelysömörben végzett kutatásaink elsődleges célja azoknak a molekuláris faktoroknak az azonosítása és jellemzése, amelyek a tünetek kialakulását előidéző immunológiai trigger faktorokkal szemben fokozott érzékenységgel ruházzák fel a tünetmentes keratinocitákat, így szerepet játszanak a pikkelysömörre való hajlam kialakításában. Mivel a pikkelysömör a keratinociták kóros proliferációjával és differenciációjával járó multifaktoriális kórkép, munkánk kezdeti szakaszában kidolgoztunk egy *in vitro* modellrendszert, amelynek segítségével követni tudtuk a pikkelysömör pathomechanizmusában szerepet játszó faktorok keratinocita proliferációra és differenciációra gyakorolt hatását.

- Megállapítottuk, hogy a szérumfaktorok, amelyek feltehetően a pikkelysömörös tünetes bőrben a basális membránjának folytonossági hiányain keresztül jutnak az epidermiszbe, a keratinociták K1 differenciációs markerének expresszióját csökkenti, míg a proliferációs marker $\alpha 5$ integrin kifejeződését serkenti.
- Kimutattuk, hogy az etilalkohol és az aceton indukálja a proliferációs markergének ($\alpha 5$ integrin, D1 ciklin és KGFR) expresszióját és a keratinociták proliferációját. Feltételezzük, hogy ezek az anyagok szintén átjutnak a pikkelysömörös bőr basális membránján és ott aktiválják az epidermális keratinocitákat. Ez is magyarázata lehet annak a klinikai megfigyelésnek, miszerint a nagymértékű alkoholfogyasztás a pikkelysömörös betegek tüneteinek romlásához vezet.
- Kimutattuk, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz aktivált keratinocitái kifejezik a fibronektin EDA motívumot hordozó izoformáját, melyről ismert, hogy receptorához, az $\alpha 5$ integrinhez kötődve annak nagyobb stabilitást biztosít. Feltételezzük, hogy ez az autokrin szabályozási rendszer áll a pikkelysömörös



7/1 ábra. A keratinociták proliferációjával/differenciációjával és a pikkelysömör pathogenezisével kapcsolatos eredményeink összefoglalása. Részletes magyarázatot lásd a szövegben.

- orange arrow —> szérumfaktorok által indukált expressziós változások
- blue arrow —> alkohol és aceton által indukált expressziós változások
- black arrow —> dithranol által indukált expressziós változások
- green arrow —> az α5 integrin blokkolásával indukált expressziós változások
- red arrow —> A PRINS nem kódoló RNS által indukált expressziós változások

tünetmentes epidermisz keratinocitáinak magasabb szintű α5 integrin expressziója mögött, amely aztán hozzájárul ezen keratinociták citokin indukcióra mutatott emelkedett proliferatív válaszkészségéhez.

- A keratinocita proliferációs/differenciációs modellrendszer segítségével kimutattuk, hogy az FGFR2-IIIb receptor magas szintű kifejezése a proliferáló keratinociták sajátja. Ez a receptor molekula a keratinociták felszínén fejeződik ki és a fibroblasztok által termelt fibroblaszt növekedési faktorok receptora. Az FGFR2-IIIb mRNA mind a tünetmentes, mind a tünetes pikkelysömörös epidermiszben magasabb szinten fejeződik ki, mint az egészséges epidermiszben, feltételezzük tehát, hogy ez a receptor molekula is szerepet játszik a pikkelysömör pathomechanizmusában.
- Kimutattuk, hogy a D típusú ciklinek a sejtciklus különböző szakaszaiban töltenek be szabályozó szerepet és hogy a D1 ciklin fehérje magasabb szinten és eltérő

intracelluláris mintázattal fejeződik ki a tünetes epidermisz keratinocitáiban, mint az egészséges epidermiszben. Vizsgálataink szerint a fibronektin- $\alpha 5$ integrin ligand-receptor indukált jelátviteli folyamatok részt vesznek a D1 ciklin mRNA expressziójának szabályozásában, és hozzájárulnak a pikkelysömörben megfigyelhető keratinocita hiperproliferációhoz.

- Egy génexpressziós vizsgálat során azonosítottunk egy mRNA-szerű nem kódoló RNS-t, a PRINS-t, amely adataink szerint részt vesz a sejtek stresszválaszának és a pikkelysömörre való hajlam kialakításában. Előzetes eredményeink szerint a PRINS nem kódoló RNS szabályozza az anti-apoptotikus hatású G1P3 gén expresszióját, valamint a sejten belül fizikailag kölcsönhat a nukleofoszin fehérjével. Egy közelmúltban megjelent közlemény szerint a nukleofoszin szerepet játszik a D1 ciklin expressziójának szabályozásában. A komplex keratinocitákban betöltött szerepét a közeljövőben tervezzük vizsgálni.

Vénás eredetű lábszárfekély kapcsolatos kutatásaink során hajlamosító genetikai és molekuláris faktorokat vizsgáltunk.

- Azonosítottunk egy polimorfizmust az FGFR2 gén 3' nem transzlálódó régiójában, amelynek mutáns allélja szignifikánsan magasabb arányban van jelen a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek populációjában, mint az egészségesekben. Feltételezzük, hogy ez a polimorfizmus befolyásolja az elsődleges transzkript stabilitását, ezáltal az alternatív splicing révén keletkező fehérjetermék(ek), a KGFR és/vagy a BEK mennyisége megváltozik, ami hatással lehet a re-epitelizáció és/vagy a sebgyógyulással asszociált angiogenezis folyamataira.
- Kimutattuk, hogy a TNF- α -308 A allél feltehetően hajlamosító faktor a vénás eredetű lábszárfekély kialakulására. Eredményeink azonban arra utalnak, hogy hatása nem közvetlen, hanem másodlagos; az elsődleges összefüggés a polimorfizmus és az obezitás között áll fenn és a TNF- α -308 A polimorfizmus az obezitásra való hajlam kialakításán keresztül játszik szerepet a vénás eredetű lábszárfekély pathogenezisében.
- Vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek tünetmentes bőrének vizsgálata során arra a felismerésre jutottunk, hogy a szindekán-4 heparán szulfát proteoglikán az érintett betegek tünetmentes bőrének dermiszében alacsonyabb szinten fejeződik ki, mint az egészséges egyének epidermiszében. Feltételezzük, hogy a normál sebgyógyulásban bizonyítottan szerepet játszó szindekán-4 alacsonyabb szintű

expressziója a vénás lábszárfelekében szenvedő betegek tünetmentes bőrén a betegségre hajlamosító faktor.

Vitiligo betegségben genomikai vizsgálatokat végeztünk, melynek célja az volt, hogy a humán pigmentáció szabályozásában részt vevő géneken a betegségre hajlamosító faktorokat azonosítsunk.

- Azonosítottunk egy polimorfizmust az MC1R génen, amely feltehetően protektív genetikai faktor a vitiligo betegség kialakulása szempontjából és feltételezzük, hogy protektív szerepét a polimorfizmus által érintett epitóp antigenicitásának csökkentése révén fejt ki.

A *malignus melanomára* hajlamosító genetikai faktorok azonosítására néhány éve egy programot indítottunk Klinikánkon, melynek keretében a Klinika gondozásában álló familiáris melanomában szenvedő betegek és családtagjaik CDKN2A gén mutációit és MC1R polimorfizmusait vizsgáljuk. A dolgozatban kutatásaink mindeddig legérdekesebb eredményét ismerttettem.

- Egy primér multiplex melanomában szenvedő beteg és családtagjainak genetikai elemzése során egy rendkívül ritka, melanoma predisponáló CDKN2A mutációt azonosítottunk, elsőként homozigóta formában. Mivel a mutációról mindeddig csak négy olasz vagy Brazíliában élő olasz származású családban számoltak be, feltételezzük, hogy az alapító mutáció vagy Olaszországban keletkezett és vándorolt valahogyan Magyarországra, vagy hazánkból került az észak-olasz vidékekre, majd onnan tovább Brazíliába is.

8. Az eredmények gyakorlati hasznosításának lehetősége

A dolgozatban bemutatott munka elsősorban alapkutató jellegű, melynek célja multifaktoriális bőrbetegségek pathomechanizmusának minél mélyebb megértése, a rájuk hajlamosító genetikai és molekuláris faktorok azonosítása. Arról egyelőre nem számolhatok be, hogy a dolgozatban ismertetett eredmények bármelyike is közvetlen gyakorlati hasznosításra került volna, ellenben azt mindenféleképpen hangsúlyoznám, hogy munkánk révén egy olyan korszerűen felszerelt genomikai, molekuláris biológiai laboratóriumot állítottunk fel, amely megteremtette a tudományos-technikai feltételeket már jelenleg is folyó alkalmazott kutatási és fejlesztési tevékenységünkhöz.

Kutatásaink egyik „célbetegsége” a pikkelysömör, amelyet joggal nevezhetünk az egyik legnagyobb gyakorisággal előforduló immunmediált multifaktoriális bőrgyógyászati kórképnek. A legkorszerűbb gyógyszerek, a biológiai szerek jelenleg is folyó fejlesztése azokon a 80-90-es években született kutatási eredményeken alapul, amelyek a tünetek kiváltásában szerepet játszó, immun mediáló hatással rendelkező molekulákat célozzák. Mi munkánk során elsősorban nem azokra a folyamatokra összpontosítunk, amelyek a tünetek kialakulása és fennállása közben jellemzik a pikkelysömörös bőrt, hanem azokat a molekuláris történéseket szeretnénk felfedni, amelyek a makroszkóposan egészségesnek látszó, de számos általunk és mások által szolgáltatott adat szerint molekuláris és sejtszinten már kóros folyamatokat mutató tünetmentes pikkelysömörös epidermiszben zajlanak. Meggyőződésünk, hogy ezeknek a sejtszintű és molekuláris szintű eltéréseknek az ismerete olyan pre-szimptomatikus terápiás eljárások kidolgozásához vezet, amelyek a pikkelysömörös keratinociták proliferációs ingerekre adott fokozott válaszkészségét módosítják. Ebből a szempontból talán a legígéretesebb eredményünk annak felismerése, hogy egy autokrin szabályozási rendszerrel, az EDA⁺ fibronectin termelésével, majd annak $\alpha 5$ integrinhez való visszacsatolásával feltehetően maguk a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták is felelősek saját maguk fokozott proliferatív válaszképességének kialakításáért és fenntartásáért. Egy közelmúltban megjelent közlemény szerint az EDA⁺ fibronectin specifikus ellenanyaggal történő blokkolása terápiás eljárás lehet tumoros betegségek gyógyításában (Villa és mtsai, 2008). Ennek analógiájára elképzelhető, hogy a pikkelysömör betegségben is terápiás célpont lehet ez a fibronectin izoforma.

A vénás eredetű lábszárfekélyben végzett kutatásaink eredményei szintén hasznosulhatnak terápiás fejlesztésekben. A rekombináns KGF-2-et (repifermin) már klinikai kísérletekben is kipróbálták krónikus sebek terápiájára, és gyorsabb sebzáródást tapasztaltak (Radek és mtsai, 2009; Robson és mtsai, 2001). A KGF ligand/KGFR receptor rendszer tehát ígéretes terápiás célpont a krónikus sebek kezelésében. Ugyanez elmondható a szindekán-4 heparán szulfát proteoglikánról is, amely eredményeink szerint a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek tünetmentes bőrének dermiszében alacsonyabb szinten fejeződik ki, és feltehetően hozzájárul a betegség pathogeneziséhez. Egy közelmúltban megjelent közlemény szerint ultrahang kezeléssel a szindekán-4 mediált Rac1 és RhoA jelátviteli folyamatok aktiválhatók és a szöveti regeneráció folyamatai ezzel felgyorsíthatók (Mahoney és mtsai, 2009).

A multifaktoriális bőrgyógyászati kórképekre hajlamosító vagy protektív genetikai faktorok további terápiás célpontok kijelölésében is szerepet játszhatnak a jövőben. Ennek jelentőségét azonban felülmúlja az a nagy társadalmi elvárás, hogy a betegségek hátterében álló genetikai faktorok azonosítása prediktív értékű legyen a nagy gyakorisággal kialakuló betegségek esetében. Erre való válaszként az Egyesült Államokban mára számos olyan magáncég alakult, amelyek elérhető áron határoznak meg multifaktoriális kórképekre hajlamosító genetikai faktorokat, majd az eredmények alapján körültekintő becslést adnak arra nézve, hogy egy adott polimorfizmus kombinációval mekkora esélye van az illetőnek bizonyos multifaktoriális betegségek kialakulására. A 23AndMe nevű egyesült államokbeli cég „kínálatában” például ott szerepel a pikkelysömörre való hajlam prediktálása. A cég honlapjának tanúsága szerint (<https://www.23andme.com/>) 3 SNP meghatározásának eredménye alapján tesznek arra nézve becslést, hogy az illetőnek élete során mekkora esélye van arra, hogy a pikkelysömör betegség tünetei jelentkezzenek nála.

A familiáris melanómában és atípusos anyajegy szindrómában szenvedő betegek és családjainak bőrgyógyászati gondozása, követése rendkívül fontos feladat, mivel a léziók időben történő eltávolítása a betegség kimenetelét alapvetően befolyásolja. Gyakorlati szempontból is nagy jelentőségűnek ítélem a familiáris melanómában szenvedő betegek és családtagjainak genetikai vizsgálatát, elsősorban annak kimutatását, hogy vajon az egyén és családja hordoznak-e nagy penetranciájú melanoma predisponáló CDKN2A mutációkat. A rizikófaktor azonosítása fokozott orvosi ellenőrzést eredményez, ami a beteg életkilátásait nagyfokban javítja, emellett a melanoma kialakulásában szerepet játszó tényezők megismerését is eredményezi, ami jelentős a betegség megelőzése szempontjából.

9. Irodalomjegyzék

- Abanmi A, Al Harthi F, Zouman A, Kudwah A, Jamal MA, Arfin M, Tariq M. (2008) Association of Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Saudi patients with vitiligo. *Dis Markers* 24:51-57
- Abdel-Malek ZA, Knittel J, Kadekaro AL, Swope VB, Starnes R. (2008) The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes--a shift in paradigm. *Photochem Photobiol* 84:501-508
- ABELE DC, Dobson RL, GRAHAM JB. (1963) HEREDITY AND PSORIASIS. STUDY OF A LARGE FAMILY *Arch Dermatol* 88:38-47
- Abts HF, Welss T, Mirmohammadsadeh A, Kohrer K, Michel G, Ruzicka T. (1999) Cloning and characterization of hurpin (protease inhibitor 13): A new skin-specific, UV-repressible serine proteinase inhibitor of the ovalbumin serpin family. *J Mol Biol* 293:29-39
- Akhtar S, Gavalas NG, Gawkrödger DJ, Watson PF, Weetman AP, Kemp EH. (2005) An insertion/deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin converting enzyme is not associated with generalised vitiligo in an English population. *Arch Dermatol Res* 297:94-98
- Amos CI. (2007) Successful design and conduct of genome-wide association studies. *Human Molecular Genetics* 16:R220-R225
- Asadullah K, Eskdale J, Wiese A, Gallagher G, Friedrich M, Sterry W. (2001) Interleukin-10 promoter polymorphism in psoriasis. *J Invest Dermatol* 116:975-978
- Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW. (1997) Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat Med* 3:1209-1215
- Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW. (1999) Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol* 155:1137-1146
- Ashworth JJ, Smyth JV, Pendleton N, Horan M, Payton A, Worthington J, Ollier WE, Ashcroft GS. (2005) The dinucleotide (CA) repeat polymorphism of estrogen receptor beta but not the dinucleotide (TA) repeat polymorphism of estrogen receptor alpha is associated with venous ulceration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97:266-270
- Auguste P, Gursel DB, Lemiere S, Reimers D, Cuevas P, Carceller F, Di Santo JP, Bikfalvi A. (2001) Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res* 61:1717-1726
- Babbar N, Hacker A, Huang Y, Casero RA, Jr. (2006) Tumor necrosis factor alpha induces spermidine/spermine N1-acetyltransferase through nuclear factor kappaB in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 281:24182-24192
- Balendran N, Clough RL, Arguello JR, Barber R, Veal C, Jones AB, Rosbotham JL, Little AM, Madrigal A, Barker JN, Powis SH, Trembath RC. (1999) Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol* 113:322-328
- Baraniak AP, Lasda EL, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA. (2003) A stem structure in fibroblast growth factor receptor 2 transcripts mediates cell-type-specific splicing by approximating intronic control elements.1. *Mol Cell Biol* 23:9327-9337

- Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. (1998) Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene* 17:1027-1037
- Bata-Csörgő, Z., Cooper, K. D., Kang, B. K., Voorhees, J. J., and Hammerberg, C. (1996) Differential expression suggesting differential functions of D-type cyclins in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106: 828.
- Bata-Csörgő Z, Cooper KD, Ting KM, Voorhees JJ, Hammerberg C. (1998) Fibronectin and alpha5 integrin regulate keratinocyte cell cycling. A mechanism for increased fibronectin potentiation of T cell lymphokine-driven keratinocyte hyperproliferation in psoriasis. *J Clin Invest* 101:1509-1518
- Bata-Csörgő Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. (1995) Intralesional T-lymphocyte activation as a mediator of psoriatic epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* 105:89S-94S
- Bata-Csörgő Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. (1995) Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. Cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes. *J Clin Invest* 95:317-327
- Belső N, Széll M, Pivarcsi A, Kis K, Kormos B, Kenderessy AS, Dobozy A, Kemény L, Bata-Csörgő Z. (2008) Differential expression of D-type cyclins in HaCaT keratinocytes and in psoriasis. *J Invest Dermatol* 128:634-642
- Berard A, Kahn SR, Abenhaim L. (2001) Is hormone replacement therapy protective for venous ulcer of the lower limbs? *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 10:245-251
- Biran H, Ariel I, Degroot N, Shani A, Hochberg A. (1994) Human Imprinted Genes As Oncodevelopmental Markers. *Tumor Biology* 15:123-134
- Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B, Chompret A, Ghiorzo P, Gruis N, Hansson J, Harland M, Hayward N, Holland EA, Mann GJ, Mantelli M, Nancarrow D, Platz A, Tucker MA. (2002) Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 94:894-903
- Blomhoff A, Helen KE, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Husebye ES, Akselsen HE, Lie BA, Undlien DE. (2005) CTLA4 polymorphisms are associated with vitiligo, in patients with concomitant autoimmune diseases. *Pigment Cell Res* 18:55-58
- Bos JD, De Rie MA. (1999) The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 20:40-46
- Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH. (1983) Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 275:181-189
- Boukamp P, Fusenig NE. (1993) "Trans-differentiation" from epidermal to mesenchymal/myogenic phenotype is associated with a drastic change in cell-cell and cell-matrix adhesion molecules. *J Cell Biol* 120:981-993
- Bowcock AM, Shannon W, Du F, Duncan J, Cao K, Aftergut K, Catier J, Fernandez-Vina MA, Menter A. (2001) Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genet* 10:1793-1805
- Box NF, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm RA, Hayward NK. (2001) MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet* 69:765-773
- Boyce DE, Jones WD, Ruge F, Harding KG, Moore K. (2000) The role of lymphocytes in human dermal wound healing. *Br J Dermatol* 143:59-65

- Brand E, Schorr U, Kunz I, Kertmen E, Ringel J, Distler A, Sharma AM. (2001) Tumor necrosis factor-alpha--308 G/A polymorphism in obese Caucasians. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:581-585
- Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. (1990) The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 10:28-36
- Brincat MP. (2000) Hormone replacement therapy and the skin. *Maturitas* 35:107-117
- Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE, . (1992) Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 258:1148-1152
- Canton I, Akhtar S, Gavalas NG, Gawkrödger DJ, Blomhoff A, Watson PF, Weetman AP, Kemp EH. (2005) A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. *Genes Immun* 6:584-587
- Canturk NZ, Esen N, Vural B, Canturk Z, Kirkali G, Oktay G, Solakoglu S. (2001) The relationship between neutrophils and incisional wound healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14:108-116
- Capone A, Visco V, Belleudi F, Marchese C, Cardinali G, Bellocchi M, Picardo M, Frati L, Torrisi MR. (2000) Up-modulation of the expression of functional keratinocyte growth factor receptors induced by high cell density in the human keratinocyte HaCaT cell line. *Cell Growth Differ* 11:607-14.
- Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, Leong DU, Panko JM, McAllister LB, Hansen CB, Papenfuss J, Prescott SM, White TJ, Leppert MF, Krueger GG, Begovich AB. (2007) A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 80:273-290
- Carroll JM, Romero MR, Watt FM. (1995) Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell* 83:957-968
- Casp CB, She JX, McCormack WT. (2002) Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res* 15:62-66
- Casp CB, She JX, McCormack WT. (2003) Genes of the LMP/TAP cluster are associated with the human autoimmune disease vitiligo. *Genes Immun* 4:492-499
- Chen JM, Ferec C, Cooper DN. (2006) A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Human Genetics* 120:1-21
- Chen JM, Ferec C, Cooper DN. (2006) A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes II: the importance of mRNA secondary structure in assessing the functionality of 3' UTR variants. *Human Genetics* 120:301-333
- Chen W, Bocker W, Brosius J, Tiedge H. (1997) Expression of neural BC200 RNA in human tumours. *J Pathol* 183:345-351
- Cheng JG, Tiedge H, Brosius J. (1997) Expression of dendritic BC200 RNA, component of a 11.4S ribonucleoprotein particle, is conserved in humans and simians. *Neurosci Lett* 224:206-210
- Chin L, Garraway LA, Fisher DE. (2006) Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 20:2149-2182

- Chow S, Rizzo C, Ravitskiy L, Sinha AA. (2005) The role of T cells in cutaneous autoimmune disease. *Autoimmunity* 38:303-317
- Chung JH, Ostrowski MC, Romigh T, Minaguchi T, Waite KA, Eng C. (2006) The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation. *Hum Mol Genet* 15:2553-2559
- Creamer D, Allen M, Jaggar R, Stevens R, Bicknell R, Barker J. (2002) Mediation of systemic vascular hyperpermeability in severe psoriasis by circulating vascular endothelial growth factor. *Arch Dermatol* 138:791-796
- Crist SA, Elzey BD, Ludwig AT, Griffith TS, Staack JB, Lentz SR, Ratliff TL. (2004) Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 32:1073-1081
- Delcomenne M, Streuli CH. (1995) Control of integrin expression by extracellular matrix. *J Biol Chem* 270:26794-26801
- Della TG, Pasini B, Frigerio S, Donghi R, Rovini D, Delia D, Peters G, Huot TJ, Bianchi-Scarra G, Lantieri F, Rodolfo M, Parmiani G, Pierotti MA. (2001) CDKN2A and CDK4 mutation analysis in Italian melanoma-prone families: functional characterization of a novel CDKN2A germ line mutation. *Br J Cancer* 85:836-844
- Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF. (1994) Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* 180:1141-1146
- Di Paola R, Frittitta L, Miscio G, Bozzali M, Baratta R, Centra M, Spampinato D, Santagati MG, Ercolino T, Cisternino C, Soccio T, Mastroianno S, Tassi V, Almgren P, Pizzuti A, Vigneri R, Trischitta V. (2002) A variation in 3' UTR of hPTP1B increases specific gene expression and associates with insulin resistance. *Am J Hum Genet* 70:806-812
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12:3499-3511
- Duning K, Buck F, Barnekow A, Kremerskothen J. (2008) SYNCRIP, a component of dendritically localized mRNPs, binds to the translation regulator BC200 RNA. *J Neurochem* 105:351-359
- Dwivedi M, Laddha NC, Shajil EM, Shah BJ, Begum R. (2008) The ACE gene I/ D polymorphism is not associated with generalized vitiligo susceptibility in Gujarat population. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:407-408
- Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, Goetinck P. (2001) Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* 107:R9-R14
- Eddy SR. (1999) Noncoding RNA genes. *Curr Opin Genet Dev* 9:695-699
- Em S, Laddha NC, Chatterjee S, Gani AR, Malek RA, Shah BJ, Begum R. (2007) Association of catalase T/C exon 9 and glutathione peroxidase codon 200 polymorphisms in relation to their activities and oxidative stress with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *Pigment Cell Res* 20:405-407
- Erson AE, Petty EM. (2008) MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Clinical Genetics* 74:296-306
- Farkas A, Kemény L, Széll M, Dobozy A, Bata-Csörgő Z. (2003) Ethanol and acetone stimulate the proliferation of HaCaT keratinocytes: the possible role of alcohol in exacerbating psoriasis. *Arch Dermatol Res* 295:56-62

- Figl A, Scherer D, Nagore E, Bermejo JL, Dickes E, Thirumaran RK, Gast A, Hemminki K, Kumar R, Schadendorf D. (2008) Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes XRCC1 and APEX1 in progression and survival of primary cutaneous melanoma patients. *Mutat Res* Nov 27. [Epub ahead of print]
- Finch PW, Murphy F, Cardinale I, Krueger JG. (1997) Altered expression of keratinocyte growth factor and its receptor in psoriasis. *Am J Pathol* 151:1619-28.
- Fleischmajer R, Kuroda K, Hazan R, Gordon RE, Lebwohl MG, Sapadin AN, Unda F, Iehara N, Yamada Y. (2000) Basement membrane alterations in psoriasis are accompanied by epidermal overexpression of MMP-2 and its inhibitor TIMP-2. *J Invest Dermatol* 115:771-777
- Fung PA, Gaertig J, Gorovsky MA, Hallberg RL. (1995) Requirement of a small cytoplasmic RNA for the establishment of thermotolerance. *Science* 268:1036-1039
- Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, Miao HQ, Takashima S, Soker S, Klagsbrun M. (2000) Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2573-2578
- Gallucci RM, Sugawara T, Yucesoy B, Berryann K, Simeonova PP, Matheson JM, Luster MI. (2001) Interleukin-6 treatment augments cutaneous wound healing in immunosuppressed mice. *J Interferon Cytokine Res* 21:603-609
- Garcia-Borron JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C. (2005) Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 18:393-410
- Gavalas NG, Akhtar S, Gawkrödger DJ, Watson PF, Weetman AP, Kemp EH. (2006) Analysis of allelic variants in the catalase gene in patients with the skin depigmenting disorder vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun* 345:1586-1591
- Gemmati D, Tognazzo S, Serino ML, Fogato L, Carandina S, De Palma M, Izzo M, De Mattei M, Ongaro A, Scapoli GL, Caruso A, Liboni A, Zamboni P. (2004) Factor XIII V34L polymorphism modulates the risk of chronic venous leg ulcer progression and extension. *Wound Repair Regen* 12:512-517
- Green CD, Simons JF, Taillon BE, Lewin DA. (2001) Open systems: panoramic views of gene expression. *J Immunol Methods* 250:67-79
- Gruis NA, van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, Bergman W, Frants RR. (1995) Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat Genet* 10:351-353
- Guan CP, Zhou MN, Xu AE, Kang KF, Liu JF, Wei XD, Li YW, Zhao DK, Hong WS. (2008) The susceptibility to vitiligo is associated with NF-E2-related factor2 (Nrf2) gene polymorphisms: a study on Chinese Han population. *Exp Dermatol* 17:1059-1062
- Hankenson KD, Watkins BA, Schoenlein IA, Allen KG, Turek JJ. (2000) Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:88-95
- Hao B, Miao X, Li Y, Zhang X, Sun T, Liang G, Zhao Y, Zhou Y, Wang H, Chen X, Zhang L, Tan W, Wei Q, Lin D, He F. (2006) A novel T-77C polymorphism in DNA repair gene XRCC1 contributes to diminished promoter activity and increased risk of non-small cell lung cancer. *Oncogene* 25:3613-3620
- Harding RM, Healy E, Ray AJ, Ellis NS, Flanagan N, Todd C, Dixon C, Sajantila A, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL. (2000) Evidence for variable selective pressures at MC1R. *Am J Hum Genet* 66:1351-1361

- Hawn TR, Wu H, Grossman JM, Hahn BH, Tsao BP, Aderem A. (2005) A stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10593-10597
- Hayward NK. (2003) Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 22:3053-3062
- Heldin CH, Westermark B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:1283-1316
- High WA, Robinson WA. (2007) Genetic mutations involved in melanoma: a summary of our current understanding. *Adv Dermatol* 23:61-79
- Hoffstedt J, Eriksson P, Hellstrom L, Rossner S, Ryden M, Arner P. (2000) Excessive fat accumulation is associated with the TNF alpha-308 G/A promoter polymorphism in women but not in men. *Diabetologia* 43:117-120
- Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM. (2001) IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2:25-31
- Huang S, Varani J, Chakrabarty S. (1994) Control of AKR fibroblast phenotype by fibronectin: regulation of cell- surface fibronectin binding receptor by fibronectin. *J Cell Physiol* 161:470-482
- Huber J, Ramos ES. (2006) The P48T germline mutation and polymorphism in the CDKN2A gene of patients with melanoma. *Braz J Med Biol Res* 39:237-241
- Jebeleanu G, Procopciuc L. (2001) G20210A prothrombin gene mutation identified in patients with venous leg ulcers. *J Cell Mol Med* 5:397-401
- Jin SY, Park HH, Li GZ, Lee HJ, Hong MS, Hong SJ, Park HK, Chung JH, Lee MH. (2004a) Association of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism of vitiligo in Korean population. *Pigment Cell Res* 17:84-86
- Jin SY, Park HH, Li GZ, Lee HJ, Hong MS, Hong SJ, Park HK, Chung JH, Lee MH. (2004b) Association of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism of vitiligo in Korean population. *Pigment Cell Res* 17:84-86
- Jin SY, Park HH, Li GZ, Lee HJ, Hong MS, Park HJ, Park HK, Seo JC, Yim SV, Chung JH, Lee MH. (2004c) Association of estrogen receptor 1 intron 1 C/T polymorphism in Korean vitiligo patients. *J Dermatol Sci* 35:181-186
- Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. (2002) Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 21:165-170
- Kemény L, Kenderessy AS, Olasz E, Michel G, Ruzicka T, Farkas B, Dobozy A. (1994) The interleukin-8 receptor: a potential target for antipsoriatic therapy? *Eur J Pharmacol* 258:269-272
- Kemény L, Michel G, Arenberger P, Ruzicka T. (1993) Down-regulation of epidermal growth factor receptors by dithranol. *Acta Derm Venereol* 73:37-40
- Kennedy D. (2002) Breakthrough of the year. *Science* 298:2283
- Kobayashi S, Takashima A, Anzai K. (1998) The dendritic translocation of translin protein in the form of BC1 RNA protein particles in developing rat hippocampal neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 253:448-453
- Kovacs EJ, DiPietro LA. (1994) Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J* 8:854-861
- Kunz M. (2008) DNA microarray technology in dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 27:16-24
- Kurschat P, Bielenberg D, Rossignol-Tallandier M, Stahl A, Klagsbrun M. (2006) Neuron restrictive silencer factor NRSF/REST is a transcriptional repressor of neuropilin-1 and

- diminishes the ability of semaphorin 3A to inhibit keratinocyte migration. *J Biol Chem* 281:2721-2729
- Laberge GS, Birlea SA, Fain PR, Spritz RA. (2008) The PTPN22-1858C>T (R620W) functional polymorphism is associated with generalized vitiligo in the Romanian population. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:206-208
- Laddha NC, Dwivedi M, Shajil EM, Prajapati H, Marfatia YS, Begum R. (2008) Association of PTPN22 1858C/T polymorphism with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *J Dermatol Sci* 49:260-262
- LaFlamme SE, Akiyama SK, Yamada KM. (1992) Regulation of fibronectin receptor distribution. *J Cell Biol* 117:437-447
- Laing ME, Moloney FJ, Comber H, Conlon P, Murphy GM. (2006) Malignant melanoma in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 155:857
- LaRochelle WJ, Dirsch OR, Finch PW, Cheon HG, May M, Marchese C, Pierce JH, Aaronson SA. (1995) Specific receptor detection by a functional keratinocyte growth factor-immunoglobulin chimera. *J Cell Biol* 129:357-366
- Le Poole IC, Sarangarajan R, Zhao Y, Stennett LS, Brown TL, Sheth P, Miki T, Boissy RE. (2001) 'VIT1', a novel gene associated with vitiligo. *Pigment Cell Res* 14:475-484
- Leivo T, Leivo I, Kariniemi AL, Keski-Oja J, Virtanen I. (1998) Down-regulation of transforming growth factor-beta receptors I and II is seen in lesional but not non-lesional psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* 138:57-62
- Li J, Tripathi BJ, Tripathi RC. (2000) Modulation of pre-mRNA splicing and protein production of fibronectin by TGF-beta2 in porcine trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3437-3443
- Li T, Spearow J, Rubin CM, Schmid CW. (1999) Physiological stresses increase mouse short interspersed element (SINE) RNA expression in vivo. *Gene* 239:367-372
- Li TH, Schmid CW. (2001) Differential stress induction of individual Alu loci: implications for transcription and retrotransposition. *Gene* 276:135-141
- Liang P, Pardee AB. (1998) Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol* 10:261-267
- Liu H, Huang J, Wang J, Jiang S, Bailey AS, Goldman DC, Welcker M, Bedell V, Slovak ML, Clurman B, Thayer M, Fleming WH, Epner E. (2008) Transvection mediated by the translocated cyclin D1 locus in mantle cell lymphoma. *J Exp Med* 205:1843-1858
- Liu WM, Chu WM, Choudary PV, Schmid CW. (1995) Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts. *Nucleic Acids Res* 23:1758-1765
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
- Lukiw WJ, Handley P, Wong L, Crapper McLachlan DR. (1992) BC200 RNA in normal human neocortex, non-Alzheimer dementia (NAD), and senile dementia of the Alzheimer type (AD). *Neurochem Res* 17:591-597
- Lundqvist K, Schmidtchen A. (2001) Immunohistochemical studies on proteoglycan expression in normal skin and chronic ulcers. *Br J Dermatol* 144:254-259
- Maas-Szabowski N, Szabowski A, Stark HJ, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Angel P, Fusenig NE. (2001) Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J Invest Dermatol* 116:816-820

- Mahoney CM, Morgan MR, Harrison A, Humphries MJ, Bass MD. (2009) Therapeutic ultrasound bypasses canonical syndecan-4 signaling to activate Rac1. *J Biol Chem* Jan 15. [Epub ahead of print]
- Mantelli M, Pastorino L, Ghiorzo P, Barile M, Bruno W, Gargiulo S, Sormani MP, Gliori S, Vecchio S, Ciotti P, Sertoli MR, Queirolo P, Goldstein AM, Bianchi-Scarra G. (2004) Early onset may predict G101W CDKN2A founder mutation carrier status in Ligurian melanoma patients. *Melanoma Res* 14:443-448
- Marchese C, Sorice M, De Stefano C, Frati L, Torrasi MR. (1997) Modulation of keratinocyte growth factor receptor expression in human cultured keratinocytes. *Cell Growth Differ* 8:989-997
- Maresca V, Roccella M, Roccella F, Camera E, Del Porto G, Passi S, Grammatico P, Picardo M. (1997) Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. *J Invest Dermatol* 109:310-313
- Margolis DJ, Knauss J, Bilker W. (2002) Hormone replacement therapy and prevention of pressure ulcers and venous leg ulcers. *Lancet* 359:675-677
- Marshall A, Hodgson J. (1998) DNA chips: an array of possibilities. *Nat Biotechnol* 16:27-31
- Martignetti JA, Brosius J. (1993) BC200 RNA: a neural RNA polymerase III product encoded by a monomeric Alu element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11563-11567
- Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, Van Voorhees AS, Leonardi CL, Gordon KB, Lebwohl M, Koo JY, Elmets CA, Korman NJ, Beutner KR, Bhushan R. (2008) Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol* 58:826-850
- Mondello MR, Magaudda L, Pergolizzi S, Santoro A, Vaccaro M, Califano L, Cannavo SP, Guarneri B. (1996) Behaviour of laminin 1 and type IV collagen in uninvolved psoriatic skin. Immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy. *Arch Dermatol Res* 288:527-531
- Moore MJ. (1996) Gene expression. When the junk isn't junk. *Nature* 379:402-403
- Moore PS, Zamboni G, Falconi M, Bassi C, Scarpa A. (2000) A novel germline mutation, P48T, in the CDKN2A/p16 gene in a patient with pancreatic carcinoma. *Hum Mutat* 16:447-448
- Mundhenke C, Meyer K, Drew S, Friedl A. (2002) Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am J Pathol* 160:185-194
- Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Iaconcig A, Porro F, Stanta G, Baralle FE. (2003) Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol* 162:149-160
- Na GY, Lee KH, Kim MK, Lee SJ, Kim dW, Kim JC. (2003) Polymorphisms in the melanocortin-1 receptor (MC1R) and agouti signaling protein (ASIP) genes in Korean vitiligo patients. *Pigment Cell Res* 16:383-387
- Nagy N, Szolnok G, Szabad G, Bata-Csörgő Z, Balogh A, Klausz G, Mandi Y, Dobozy A, Kemény L, Széll M. (2007) Tumor Necrosis Factor-alpha -308 Polymorphism and Leg Ulceration - Possible Association with Obesity. *J Invest Dermatol* 127: 1768-1769
- Nagy N, Szolnok G, Szabad G, Bata-Csörgő Z, Dobozy A, Kemény L, Széll M. (2005) Single nucleotide polymorphisms of the fibroblast growth factor receptor 2 gene in patients with chronic venous insufficiency with leg ulcer. *J Invest Dermatol* 124:1085-1088

- Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S, Weichenthal M, Abecasis GR, Lim HW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT. (2006) Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet* 78:827-851
- Nath SK, Kelly JA, Namjou B, Lam T, Bruner GR, Scofield RH, Aston CE, Harley JB. (2001) Evidence for a susceptibility gene, SLEV1, on chromosome 17p13 in families with vitiligo-related systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 69:1401-1406
- Nelson AA, Tsao H. (2009) Melanoma and genetics. *Clin Dermatol* 27:46-52
- Nickoloff BJ, Qin JZ, Nestle FO. (2007) Immunopathogenesis of psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol* 33:45-56
- Nikolova PN, Ivanova MI, Mihailova SM, Myhailova AP, Baltadjieva DN, Simeonov PL, Paskalev EK, Naumova EJ. (2008) Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation-impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl Immunol* 18:344-348
- Nomura I, Gao B, Boguniewicz M, Darst MA, Travers JB, Leung DY. (2003) Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *J Allergy Clin Immunol* 112:1195-1202
- Norris DA, Horikawa T, Morelli JG. (1994) Melanocyte destruction and repopulation in vitiligo. *Pigment Cell Res* 7:193-203
- Oestreicher JL, Walters IB, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Surette J, Schwertschlag U, Dorner AJ, Krueger JG, Trepicchio WL. (2001) Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. *Pharmacogenomics J* 1:272-287
- Okabe H, Lee SH, Phuchareon J, Albertson DG, McCormick F, Tetsu O. (2006) A Critical Role for FBXW8 and MAPK in Cyclin D1 Degradation and Cancer Cell Proliferation. *PLoS ONE* 1:e128..e128
- Ongenaes K, Van Geel N, Naeyaert JM. (2003) Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res* 16:90-100
- Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O'Gorman LE, Green AC, Hayward NK, Martin NG, Sturm RA. (2000) Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: Is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 66:176-186
- Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mittnacht S, Lane EB, Jorcano JL. (1999) Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* 19:3086-3094
- Park HH, Ha E, Uhm YK, Jin SY, Kim YJ, Chung JH, Lee MH. (2006) Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. *Exp Dermatol* 15:377-380
- Park JE, Barbul A. (2004) Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 187:11S-16S
- Pehlivan S, Ozkinay F, Alper S, Onay H, Yuksel E, Pehlivan M, Ozkinay C. (2009) Association between IL4 (-590), ACE (I)/(D), CCR5 (Delta32), CTLA4 (+49) and IL1-RN (VNTR in intron 2) gene polymorphisms and vitiligo. *Eur J Dermatol* 2009 Jan 7. [Epub ahead of print]
- Pellegrini G, De Luca M, Orecchia G, Balzac F, Cremona O, Savoia P, Cancedda R, Marchisio PC. (1992) Expression, topography, and function of integrin receptors are severely altered in keratinocytes from involved and uninvolved psoriatic skin. *J Clin Invest* 89:1783-1795
- Penn I. (1984) Cancer in immunosuppressed patients. *Transplant Proc* 16:492-494

- Pivarcsi A, Széll M, Kemény L, Dobozy A, Bata-Csörgő Z. (2001) Serum factors regulate the expression of the proliferation- related genes alpha5 integrin and keratin 1, but not keratin 10, in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 293:206-213
- Platz A, Hansson J, Mansson-Brahme E, Lagerlof B, Linder S, Lundqvist E, Sevigny P, Inganas M, Ringborg U. (1997) Screening of germline mutations in the CDKN2A and CDKN2B genes in Swedish families with hereditary cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 89:697-702
- Pollice AA, McCoy JP, Jr., Shackney SE, Smith CA, Agarwal J, Burholt DR, Janocko LE, Hornicek FJ, Singh SG, Hartsock RJ. (1992) Sequential paraformaldehyde and methanol fixation for simultaneous flow cytometric analysis of DNA, cell surface proteins, and intracellular proteins. *Cytometry* 13:432-444
- Quekenborn-Trinquet V, Fogel P, Aldana-Jammayrac O, Ancian P, Demarchez M, Rossio P, Richards HL, Kirby B, Nguyen C, Voegel JJ, Griffiths CE. (2005) Gene expression profiles in psoriasis: analysis of impact of body site location and clinical severity. *Br J Dermatol* 152:489-504
- Radek KA, Taylor KR, Gallo RL. (2009) FGF-10 and specific structural elements of dermatan sulfate size and sulfation promote maximal keratinocyte migration and cellular proliferation. *Wound Repair Regen* 17:118-126
- Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, Fagnoli MC. (2008) MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer* 122:2753-2760
- Reich K, Mossner R, Konig IR, Westphal G, Ziegler A, Neumann C. (2002) Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *J Invest Dermatol* 118:155-163
- Rio-Tsonis K, Jung JC, Chiu IM, Tsonis PA. (1997) Conservation of fibroblast growth factor function in lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13701-13706
- Robson MC, Phillips TJ, Falanga V, Odenheimer DJ, Parish LC, Jensen JL, Steed DL. (2001) Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. *Wound Repair Regen* 9:347-352
- Roesel JF, Nanney LB. (1995) Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair. *J Surg Res* 58:449-459
- Rothaupt, D. B., McCormick, S. A., Stevens, S. R., and Cooper, K. D. (2000) EDA-Fibronectin is Co-Localized with CD11c+ Cells at the Dermal-Epidermal Junction in Psoriatic Tissue. *J Invest Dermatol* 114: 864..
- Rubin CM, Kimura RH, Schmid CW. (2002) Selective stimulation of translational expression by Alu RNA. *Nucleic Acids Res* 30:3253-3261
- Ruiz-Arguelles A, Brito GJ, Reyes-Izquierdo P, Perez-Romano B, Sanchez-Sosa S. (2007) Apoptosis of melanocytes in vitiligo results from antibody penetration. *J Autoimmun* 29:281-286
- Russell TJ, Schultes LM, Kuban DJ. (1972) Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *N Engl J Med* 287:738-740
- Ryle CM, Breikreutz D, Stark HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D, Fusenig NE. (1989) Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation* 40:42-54

- Schioth HB, Phillips SR, Rudzish R, Birch-Machin MA, Wikberg JE, Rees JL. (1999) Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem Biophys Res Commun* 260:488-491
- Shan S, Robson ND, Cao Y, Qiao T, Li CY, Kontos CD, Garcia-Blanco M, Dewhirst MW. (2004) Responses of vascular endothelial cells to angiogenic signaling are important for tumor cell survival. *FASEB J* 18:326-328
- Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. (2008) MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation. *Clin Exp Dermatol* 33:312-315
- Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombled J, Spatz A, Stoppa-Lyonnet D, Benard J, Bressac-de Paillerets B. (1998) Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 7:209-216
- Srikantan V, Zou Z, Petrovics G, Xu L, Augustus M, Davis L, Livezey JR, Connell T, Sesterhenn IA, Yoshino K, Buzard GS, Mostofi FK, McLeod DG, Moul JW, Srivastava S. (2000) PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12216-12221
- Széll M, Bata-Csörgő Z, Kemény L. (2008) The enigmatic world of mRNA-like ncRNAs: Their role in human evolution and in human diseases. *Semin Cancer Biol* 18:141-148
- Széll M, Bata-Csörgő Z, Koreck A, Pivarcsi A, Polyanka H, Szeg C, Gaal M, Dobozy A, Kemény L. (2004) Proliferating Keratinocytes Are Putative Sources of the Psoriasis Susceptibility-Related EDA (Extra Domain A of Fibronectin) Oncofetal Fibronectin. *J Invest Dermatol* 123:537-546
- Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. (2007) The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays* 29:288-299
- Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F, Niwa H, Miyazaki JJ, Hirota S, Kitamura Y, Kitsukawa T, Fujisawa H, Klagsbrun M, Hori M. (2002) Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3657-3662
- Takeda K, Ichijo H, Fujii M, Mochida Y, Saitoh M, Nishitoh H, Sampath TK, Miyazono K. (1998) Identification of a novel bone morphogenetic protein-responsive gene that may function as a noncoding RNA. *J Biol Chem* 273:17079-17085
- Tiedge H, Chen W, Brosius J. (1993) Primary structure, neural-specific expression, and dendritic location of human BC200 RNA. *J Neurosci* 13:2382-2390
- Ting KM, Rothaupt D, McCormick TS, Hammerberg C, Chen G, Gilliam AC, Stevens S, Culp L, Cooper KD. (2000) Overexpression of the oncofetal Fn variant containing the EDA splice-in segment in the dermal-epidermal junction of psoriatic uninvolved skin. *J Invest Dermatol* 114:706-711
- Tursen U, Kaya TI, Erdal ME, Derici E, Gunduz O, Ikizoglu G. (2002) Association between catechol-O-methyltransferase polymorphism and vitiligo. *Arch Dermatol Res* 294:143-146
- Uhm YK, Yoon SH, Kang IJ, Chung JH, Yim SV, Lee MH. (2007) Association of glutathione S-transferase gene polymorphisms (GSTM1 and GSTT1) of vitiligo in Korean population. *Life Sci* 81:223-227
- Vaccaro M, Magaudda L, Cutroneo G, Trimarchi F, Barbuza O, Guarneri F, Guarneri B. (2002) Changes in the distribution of laminin alpha1 chain in psoriatic skin: immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy. *Br J Dermatol* 146:392-398

- Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Fry L. (1986) Psoriasis: a disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today* 7:257-259
- Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11:328-330
- van den WR, Wankowicz-Kalinska A, Pals S, Weening J, Das P. (2001) Autoimmune melanocyte destruction in vitiligo. *Lab Invest* 81:1061-1067
- Vasilopoulos Y, Cork MJ, Murphy R, Williams HC, Robinson DA, Duff GW, Ward SJ, Tazi-Ahnini R. (2004) Genetic association between an AACC insertion in the 3'UTR of the stratum corneum chymotryptic enzyme gene and atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 123:62-66
- Villa A, Trachsel E, Kaspar M, Schliemann C, Somavilla R, Rybak JN, Rosli C, Borsi L, Neri D. (2008) A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature in vivo. *Int J Cancer* 122:2405-2413
- Visco V, Belleudi F, Marchese C, Leone L, Aimati L, Cardinali G, Kovacs D, Frati L, Torrisi MR. (2004) Differential response to keratinocyte growth factor receptor and epidermal growth factor receptor ligands of proliferating and differentiating intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 200:31-44
- Wallace HJ, Stacey MC. (1998) Levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF receptors in chronic venous leg ulcers--correlations to healing status. *J Invest Dermatol* 110:292-296
- Wallace HJ, Vandongen YK, Stacey MC. (2006) Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism associated with increased susceptibility to venous leg ulceration. *J Invest Dermatol* 126:921-925
- Walston J, Seibert M, Yen CJ, Cheskin LJ, Andersen RE. (1999) Tumor necrosis factor-alpha-238 and -308 polymorphisms do not associated with traits related to obesity and insulin resistance. *Diabetes* 48:2096-2098
- Wang X, Sun P, Al Qamari A, Tai T, Kawashima I, Paller AS. (2001) Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin alpha(5) modulates alpha(5)beta(1) function. *J Biol Chem* 276:8436-8444
- Wataya-Kaneda M, Hashimoto K, Kato M, Miyazono K, Yoshikawa K. (1996) Differential localization of TGF-beta-precursor isoforms in psoriatic human skin. *J Dermatol Sci* 11:183-188
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Cheng WF, Cheng SP, Hsieh FJ, Hsieh CY. (2001) Interleukin-6 in cervical cancer: the relationship with vascular endothelial growth factor. *Gynecol Oncol* 82:49-56
- Wipff J, Allanore Y, Kahan A, Meyer O, Mouthon L, Guillevin L, Pierlot C, Glikmans E, Bardin T, Boileau C, Cornelis F, Dieude P. (2006) Lack of association between the protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 (PTPN22)*620W allele and systemic sclerosis in the French Caucasian population. *Ann Rheum Dis* 65:1230-1232
- Wolf R, Mirmohammadsadegh A, Walz M, Lysa B, Tartler U, Remus R, Hengge U, Michel G, Ruzicka T. (2003) Molecular cloning and characterization of alternatively spliced mRNA isoforms from psoriatic skin encoding a novel member of the S100 family. *FASEB J* 17:1969-1971
- Xia P, Culp LA. (1995) Adhesion activity in fibronectin's alternatively spliced domain EDa (EIIIA): complementarity to plasma fibronectin functions. *Exp Cell Res* 217:517-527

- Xie W, Brown WT, Denman RB. (2008) Translational regulation by non-protein-coding RNAs: Different targets, common themes. *Biochem Biophys Res Comm* 373:462-466
- Xu X, Lyle S, Liu Y, Solky B, Cotsarelis G. (2003) Differential expression of cyclin D1 in the human hair follicle. *Am J Pathol* 163:969-978
- Yamamoto H, Ochiya T, Takeshita F, Toriyama-Baba H, Hirai K, Sasaki H, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Saito I, Terada M. (2002) Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Res* 62:1641-1647
- Yang W, Zhang Y, Li Y, Wu Z, Zhu D. (2007) Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *J Biol Chem* 282:3799-3808
- Zhang YF, Li JY, Partovian C, Sellke FW, Simons M. (2003) Syndecan-4 modulates basic fibroblast growth factor 2 signaling in vivo. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 284:H2078-H2082
- Zhou Y, Lee HS, Kooshesh F, Fujisawa H, Sauder DN, Kondo S. (1996) Effects of UVB irradiation on keratinocyte growth factor (KGF) and receptor (KGFR) expression in cultured human keratinocytes. *Exp Dermatol* 5:138-44.
- Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. (1996) Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 12:97-99

10. A dolgozat elkészítéséhez felhasznált közlemények jegyzéke

1. Pivarcsi A, **Széll M**, Kemény L, Dobozy A, Bata-Csörgő Zs: Serum factors regulate the expression of the proliferation related genes $\alpha 5$ integrin and keratin 1 but not keratin 10 in HaCaT keratinocytes. Arch. Dermatol. Res. 293: 206-213, 2001
IF: 1.425, citációk száma: 11 (ebből függő idézet:6)
2. Farkas A, **Széll M**, Bata-Csörgő Zs, Kemény L, Dobozy A: Ethanol and acetone stimulate the proliferation of HaCaT cells. Arch. Dermatol. Res. 295 :56-62, 2003
IF: 1.415, citációk száma: 2
3. **Széll M**, Bata-Csörgő Zs, , Koreck A, Pivarcsi A, Polyánka H, Szeg Cs, Gaál M, Kemény L, Dobozy A: Proliferating keratinocytes are putative sources of the psoriasis susceptibility related EDA+ oncofoetal fibronectin. J. Invest. Dermatol. 123:537-46, 2004
IF: 4.238, citációk száma: 10 (ebből függő idézet: 4)
4. Bata Zs, Farkas Á, Garaczi E, Gyulai R, Kemény L, Kenderessy Szabó A, Koreck I, **Széll M**: A pikkelysömör betegség: gyógyítás és kutatómunka a Szegedi Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán Dobozy Attila Professzor úr tanszékvezetése alatt. Bőrgyógy. Vener. Szle. 80: 251-254, 2004
5. **Széll M**, Sonkoly E, Bata-Csörgő Zs, Pivarcsi A, Polyánka H, Kenderessy Szabó A, Szentpáli K, Molnár G, Kemény L: PRINS: egy új nem kódoló RNS gén azonosítása, expressziójának vizsgálata pikkelysömörben, valamint különböző humán szervezetben és szövetekben. Bőrgyógy. Vener. Szle. 80: 255-260, 2004
6. Nagy N, , Szolnoky Gy, Szabad G, Dobozy A, Kemény L, **Széll M**: Examination of Single Nucleotide Polymorphisms of the Fibroblast Growth Factor Receptor 2 gene in patients with leg ulcer. J. Invest. Dermatol. 124: 1085-88, 2005
IF: 4.406, citációk száma: 6 (ebből függő idézet: 2)
7. Sonkoly E, Bata-Csörgő Zs, Pivarcsi A, Polyánka H, Kenderessy-Szabó A, Molnár G, Szentpáli K, Megyeri K, Mándi Y, Dobozy A, Kemény L, **Széll M**. Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS. J. Biol. Chem. 280: 24159-67, 2005
IF: 5.854, citációk száma: 9 (ebből függő idézet: 1)
8. **Széll M**, Bata-Csörgő Zs, Sonkoly E, Dobozy A, Kemény L: Genomikai kutatások a bőrgyógyászatban. Magyar Tud. 166: 688-699, 2005.
9. Nagy N, Bata-Csörgő Zs, Kopasz N, Szeg Cs, Pivarcsi A, Koreck A, Dobozy A, Kemény L, **Széll M**: The expression of keratinocyte growth factor receptor (FGFR2-IIIb) correlates with the high proliferative rate of HaCaT keratinocytes. Exp. Dermatol. 15: 596-605, 2006
IF: 2.449, citációk száma 4
10. Nagy N, Szolnoky Gy, Szabad G, Bata-Csörgő Zs, Balogh A, Klausz G, Mándi Y, Dobozy A, Kemény L, **Széll M**: Tumor Necrosis Factor- α -308 polymorphism and

leg ulceration — possible association with obesity. J. Invest. Dermatol. 127: 1768-9, 2007

IF: 4.829, citációk száma 2

11. Széll M, Balogh K, Dobozy A, Kemény L, Oláh J: First Detection of the Melanoma-Predisposing Proline-48-Threonine Mutation of p16 in Hungarians – Was There a Common Founder Either in Italy or in Hungary? Melanoma Res. 17: 251-4, 2007

IF: 2.225, citációk száma 1

12. Belső N, Széll M, Pivarcsi A, Kis K, Kormos B, Kenderessy SzA, Dobozy A, Kemény L, Bata-Csörgő Zs: Differential expression of D-type cyclins in HaCaT keratinocytes and psoriasis. J. Invest. Dermatol. 128:634-42, 2008

IF: 4.829

13. Széll M, Bata-Csörgő Zs, Kemény L: The enigmatic world of mRNA-like ncRNAs: their role in human evolution and in human diseases. Semin. Cancer Biol. 18 :141-8, 2008

IF: 7.51

14. Széll M, Baltás E, Bodai L, Bata-Csörgő Zs, Nagy N, Dallos A, Pourfarzi, R, Simics E, Kondorosi I, Szalai Zs, K. Tóth G, Hunyadi J, Dobozy A, Kemény L: The Arg160Trp allele of melanocortin-1 receptor gene might protect against vitiligo. Photochem. Photobiol. 84:565-71, 2008

IF: 2.172 citációk száma 1

15. Nagy N, Németh IB, Szabad G, Szolnok G, Belső N, Bata-Csörgő Z, Dobozy A, Kemény L, Széll M.: The altered expression of syndecan 4 in the uninvolved skin of venous leg ulcer patients may predispose to venous leg ulcer. Wound Repair. Regen. 16: 495-502. 2008

IF: 2.445

Ezek összesített impakt faktora: 43.807

11. A bőr immunfunkcióival kapcsolatos, a dolgozatba be nem épített társszerzős

közlemények jegyzéke

1. Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, Széll M, Beer Z, Bata-Csörgő Z, Magocsi M, Rajnavolgyi E, Dobozy A, Kemény L: Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. Int. Immunol. 15:721-30, 2003

IF: 3.690, citációk száma: 92 (ebből függő idézet: 5)

2. Pivarcsi A, Koreck A, Bodai L, Széll M, Szeg C, Belső N, Kenderessy-Szabo A, Bata-Csörgő Z, Dobozy A, Kemény L: Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. Arch. Dermatol. Res. 296:120-4, 2004

IF: 1.217, citációk száma: 14 (ebből függő idézet: 2)

3. Garaczi E, **Széll M**, Jánossy T, Koreck A, Pivarsci A, Buzás E, Pos Z, Falus A, Dobozy A, Kemény L: Negative regulatory effect of histamine in DNFB induced contact hypersensitivity. Int. Immunol. 16:1781-1782, 2004
IF: 3.540, citációk száma:5 (ebből függő idézet: 1)
4. Nagy I, Pivarsci A, Koreck A, **Széll M.**, Urbán E, Kemény L: Distinct strains of Propionibacterium acnes induces selective human β -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through Toll-like receptors. J. Invest. Dermatol. 124: 931-38, 2005
IF: 4.406, citációk száma: 31 (ebből függő idézet: 2)
5. Pivarsci A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabó A, **Széll M**, Dobozy A, Kemény L. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. Microbes Infect. 7:1117-27, 2005
IF: 3.154, citációk száma: 29 (ebből függő idézet: 1)
6. Koreck A, Kis K, Szegedi K, Panescu V, Cioaca R, Olariu R, Kemény L, Dobozy A, **Széll M**: TLR2 and TLR4 polymorphisms are not associated with acne vulgaris. Dermatology, 213: 267-9, 2006
IF: 1.854, citációk száma 1
7. Szabad G, Kormos B, Pivarsci A, **Széll M**, Kis K, Kenderessy Sz A, Dobozy A, Bata-Csörgő Zs: Human adult epidermal melanocytes cultured without chemical mitogens express the EGF receptor and respond EGF. Arch. Dermatol. Res. 299: 191-200, 2007
IF: 1.596, citációk száma 1

Ezek összesített impakt faktora: 19.457

12. Köszönetnyilvánítás

Sok köszönettel és hálával tartozom minden kollégának, akivel eddigi kutatásaim során együtt dolgoztam. A kutatómunka alapvetően „csapatjáték”, az előrehaladás és a siker elképzelhetetlen a jó és baráti légkörű laboratóriumi közösség nélkül.

Pályakezdésemhez nagy lendületet adott, hogy a Szegedi Biológiai Központban Prof. Dr. Dudits Dénes és Dr. Bögre László irányításával dolgozhattam diákkörösként a Genetikai Intézetben, majd ezt követően a Növénybiológiai Intézetben Dr. Nagy Ferenc vezetésével elkészíthettem egyetemi doktori és Ph.D. értekezésemet. Felejthetetlen és meghatározó éveket töltöttem ott, és máig hálás vagyok azért a segítő és baráti légkörért, amiben részem volt a Dr. Fejes Erzsébettel, Dr. Páy Anikóval és Dr. Ádám Évával töltött dolgozó évek alatt.

Japánban végzett kutatómunkámat Dr. Richard E. Kendrick vezetésével végeztem, a nemzetközi laboratóriumban töltött kétéves időszaknak máig tartó szoros barátságot köszönhetek Dr. Shannon Francis-szal és Dr. Janny Peters-szel.

Nagy hálával tartozom Prof. Dr. Dobozy Attilának, hogy 1999-ben indult Kutatócsoportjának tagja lehettem, és ezzel lehetőséget, és sok-sok támogatást kaptam ahhoz, hogy a kísérletes bőrgyógyászat mindig új kihívásokat rejtő témájában kutathassak. Prof. Dr. Kemény Lajos szakértelme, folyamatos támogatása meghatározó jelentőségű kutatómunkám során, sok köszönettel tartozom érte.

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsannától nagyon sokat tanultam és rengeteg segítséget kaptam tőle. Nagyon köszönöm eddigi segítségét és remélem, hogy még sok jó cikket és pályázatot fogunk együtt sikerre vinni. Hálás vagyok Dr. Oláh Juditnak, mert kezdeményezése révén egy nagyon érdekes, új kutatási irány, a melanoma genomikai vizsgálata indult meg laboratóriumunkban, köszönöm a segítségét és jótanácsait.

Köszönettel tartozom kollegáimnak, Dr. Kenderessy-Szabó Annának, Dr. Kiss Máriaának, Dr. Szabó Kornéliának, Dr. Garaczi Edinának, Dr. Baltás Eszternek, Dr. Koreck Ildikónak, Dr. Pivarcsi Andornak, Dr. Kiss Kornéliának, Dr. Belső Nórának, Kormos Bernadettnek, Polyánka Hildának, és Dr. Viharosné Dósa-Rácz Évának a Klinika kutatólaboratóriumában végzett sok közös munkáért. Mindig nagy örömet okoz a tehetséges fiatalokkal együtt végzett munka, ezért hálás vagyok, hogy együtt dolgozhattam és dolgozhatok Dr. Sonkoly Enikővel, Dr. Nagy Nikolettával, Dr. Szegedi Krisztinával, Dr. Balogh Klárával és Bebes Attilával.

Köszönöm a laboratóriumban dolgozó asszisztens kolléganők, Kohajda Mónika, Tanácsné Bajkán Andrea, Hudákné Bánki Katalin és László Józsefné lelkiismeretes, gondos munkáját.

Gyimesi Andrea, Szekeresné Zahorán Anikó és Nagy Annamária a pályázatok, írásában és pénzügyeinek intézésében vannak mindig nagy segítségemre, sok köszönettel tartozom nekik is.

Köszönöm szüleimnek, hogy támogatták tanulmányaimat és mindent biztosítottak ahhoz, hogy elindulhassak a kutatói pályán.

Hálásan köszönöm férjem és fiaim szeretetteljes, folyamatos támogatását, munkám sikereihez nagyon hozzájárul, hogy mindig mellettem állnak.