

**A keratinociták fiziológias és patológias változásai környezeti
hatásokra és ezek szerepe bőrtumorok kialakulásában**

Dr. Wikonkál Norbert



Semmelweis Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika

Budapest

2011

Preambulum	4
Bevezetés – a bőrdaganatok háttérében álló molekuláris történések, az UV-sugárzás szerepe és a keratinociták alkalmazkodásának elméleti háttere	5
A bőrdaganatok klinikai formái és főbb ismérvei	5
Mutációk tumorokban és az ultraibolya sugárzás szerepe	5
DNS károsodás	5
Naevoid basalsejtes carcinoma syndroma, Gorlin-Goltz szindróma, a PTCH gén szerepe	6
Környezeti ártalmak a bőrön: ultraibolya sugárzás	6
Apoptózis a bőrben: sunburn sejtek	7
A Trp53 tumor szuppresszor gén	7
A hypoxia útvonal szabályozása	8
Lipidek az epidermiszben és ezek szerepe a keratinocita differenciációban	8
Az értekezésben vizsgálni kívánt kutatási feladatok	9
Anyagok és módszerek	10
A kísérlet modellrendszerei:	10
Humán anyagok	10
Kísérleti állatok	10
Sejt- és szöveti minták	11
Primer humán keratinocita kultúra	11
HaCaT sejtkultúra	11
Molekuláris szintű minták	11
DNS szeparálás	11
RNS szeparálás	11
Polimeráz láncreakció (PCR)	12
Klón mikrodisszekció, DNS amplifikáció és szekvenálás	12
Epidermális lemezek készítése	12
A minták kezelésére használatos eszközök és reagensek:	12
Besugárzási fényforrás:	12
Dozimetria	12
Fixálás	12
Differenciációt indukáló szfingolipidek	13
Transzfekció	13
Citotoxicitási vizsgálat	13

Az értékelésben használt módszerek.....11	13
Szöveti és sejtszintű hisztológiai és immunhisztokémiai technikák	13
Áramlási citometria	13
Sunburn-sejtek – apoptotikus keratinociták kimutatása	13
Immunhisztokémia	14
Immunoblot analízis	14
Direkt szekvenálás.....	14
Pyroszekvenálás	14
A citotoxicitás értékelése	14
DNS microarray	14
Real-time RT-PCR (TaqMan™) analízis.....	15
Promoter extrakció	15
A transzkripció faktor kötőhelyek promoteren belüli számítógépes azonosítása.....	15
Kompozit promoter modellek (CPM) előállítása	15
Real-time PCR.....	16
Dokumentáció	16
Statisztikai módszerek.....	16
Eredmények.....	16
1. A DNS-károsodás szignálja, amely az Mdm2 szabályozását, Trp53 indukcióját és a sunburn-sejtek kialakulását eredményezi, az aktívan átíródó génekből származik in vivo	16
2. A Trp53 apoptózist indukáló hatásában résztvevő gének szerepe, újabb adatok az UVB-indukálta apoptózis reguláció komplex rendszerében.....	17
3. Trp53 mutáns klónok időbeli és térbeli dinamikájának vizsgálata krónikus UVB besugárzás mellett.....	19
4. Az antigén-specifikus immunitásnak nincs hatása az UVB-indukálta p53-mutáns klónok keletkezésére és akut regressziójára	20
5. A hypoxia válasz szerepének vizsgálata HaCaT keratinocitákon UVB besugárzást követően	22
6. A keratinocita differenciációt fokozó új szfingolipid derivátumok azonosítása.....	23
7. A teljes genom transzkripcionális profil analízis módszerével új keratinocita differenciációban résztvevő géneket azonosítottunk.....	24
8. A PTCH 1315-ös kodonjának polimorfizmusa és a non-melanoma bőrtumorok kockázatának összefüggése.....	26
Új tudományos eredmények összefoglalása.....	27
Az eredmények lehetséges gyakorlati alkalmazásai	28
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	29

Preambulum

A bőr a környezethez való alkalmazkodás első vonala. Fő feladata a szervezet védelme, az elhatárolódás, amely pusztán a hámsejtek sajátos fizikokémiai tulajdonságain alapuló passzív funkció. Emellett azonban a hám sejtjei a környezettel való kapcsolattartásban kifejezetten aktív feladatokat is ellátnak. A bőr külső rétegének, az epidermisznek, a domináns sejtje a keratinocita, ennek megfelelően egy sor komplex funkcióval bír. A keratinocita a védőfunkcióját elsődlegesen a terminális differenciáció révén látja el, saját maga alakul át egy élettelen köpennyé, ezáltal létrehozva a stratum corneumot. A terminális differenciáció egy sok lépéses folyamat, a keratinocita számos egyéb funkciót is el kell lásson, de eközben maga is sérülékeny. A legfontosabb ártalom a hámsejtek felé a környezetből érkezik, a bőrt érő ultraibolya sugárzás formájában. Az UV-sugárzás az élet létrejöttének feltétele és számos fiziológiás sejtfunkció, egyebek mellett a D-vitamin szintézisének kulcsfontosságú eleme, de a kedvező hatások csak mértékletes napfényexpozíció mellett vannak túlsúlyban. Túlzott expozíció esetén hamar az ártalmas hatások dominánssá válását észlelhetjük, ennek figyelmeztető rendszere a bőrön gyulladással és fájdalommal kísért napégés. Az excesszív UV hatás kivédésére a szervezetünk számos mechanizmussal rendelkezik, de a védő mechanizmusok esetenként genetikai vagy szerzett eltérések miatt nem funkcionálnak kellő hatékonysággal és DNS károsodás alakul ki. A genetikai faktorok lehetnek relatíve ritkán észlelhető genodermatózisek, pl. Xeroderma pigmentosum, Cockayne-szindróma, vagy Gorlin-Goltz szindróma. A szerzett védőmechanizmus károsodás legmarkánsabb képviselője a Trp53 tumor szuppresszor gén szerzett károsodása. A p53 a genetikai integritás legfontosabb elemei közé tartozik, feladatát számos egyéb funkció mellett a sejtciklus megállításán és apoptózis válasz regulációján keresztül valósítja meg. A DNS károsodás és annak következtében kialakuló hámsejt eredetű daganatok a bőrgyógyászati praxis mindennapjaiban jelentős részt képviselnek. Bőrgyógyásként, onkodermatológusként igen sok bőrdaganattal találkozunk a napi munkában, így a fent részletezett folyamatok megértése és az ezen felismeréseken alapozott terápiák nagyon nagy számú páciens számára jelentenek segítséget. Nem elhanyagolható továbbá az a tény sem, hogy a keratinocita eredetű bőrtumorsejtek molekuláris hátterének megismerése, az onkogenezis egyes lépésinek feltérképezése az általános onkológiai gyakorlat számára is nagy jelentőségű. Jó példa erre a p53 funkciójának bőrtumorsejtek kialakulásában játszott szerepének megértése, hiszen a p53 számos más malignus folyamatban is központi szereppel bír. Ezen tumor szuppresszor gén a daganatok kialakulásában és a kemoterápiás kezelés során kialakuló hatásvesztésben szerepet játszik, így ennek mára terápiás konzekvenciája is körvonalazódik. Az UV sugárzás bőrt érő hatásai egyéb celluláris funkciókon keresztül is jelentős hatással vannak a keratinociták működésére, ilyenek a szöveti hypoxia és az ezt szabályozó útvonalak aktivitás-, illetve a keratinocita differenciáció és ennek mesterséges befolyásolására kínálózkodó lehetőségek feltérképezése.

A dolgozatban tárgyalt és vizsgálatok tárgyát képező kórképek megértése az orvosi gyakorlatunkra is közvetlen, már napjainkra konkrét hatóanyagok formájában manifesztálódó hatással van. Az értekezés írásakor fázis III-as klinikai vizsgálati stádiumban voltak a PTCH gén eltéréseinek korrigálásán, az SMO gátlásán keresztül ható szisztémás és lokális készítmények a leggyakoribb emberi bőrtumor, a basalioma előrehaladott eseteinek kezelésére. Léteznek DNS károsodást kivédő, azt helyreállító T4 endonukleáz V hatóanyagú lokális készítmények pl. xeroderma pigmentosum betegek kezelésére, továbbá születtek ígéretes kísérleti eredmények a mutációt szenvedett p53 kísérleti körülmények közötti molekuláris helyreállításával kapcsolatban is, amely a jövő terápiás eszköze lehet.

Bevezetés – a bőrdaganatok háttérében álló molekuláris történések, az UV-sugárzás szerepe és a keratinociták alkalmazkodásának elméleti háttere

A bőrdaganatok klinikai formái és főbb ismérvei

A bőrből kiindulva három gyakori malignus tumor kialakulására lehet elsősorban számítani: basocellularis carcinoma, (basalioma), a spinocellularis carcinoma, (spinalioma), és a melanoma. A basaliomát és a spinaliomát együttesen, mint non-melanoma bőrrákokat is említjük főként mivel mindkettő a keratinocitából indul ki, és klinikai megjelenésük is hasonló: mindkettő relatíve lassan növekvő, bőrszínű plakk, majd tumor formájában észlelhető, szemben a melanoma az egyébként nem oszló melanociták malignus transzformációjaként jön létre, így általában sötétén pigmentált. A basalioma és a spinalioma egyaránt a keratinociták malignus proliferációjaként jön létre. Kiemelendő, hogy a basalioma első leírója Krompecher Ödön professzor volt, aki 1903-ban „Der Basalzellen Krebs” címen publikálta megfigyelését. Mindkét daganat általában az idősebb korban alakul ki, klasszikus esetben a daganatok első jelentkezése a 60 éves kor felett várható. Basaliomáknál azonban részben sporadikusan, részben a később vázolt Gorlin-Goltz szindróma részjelenségeként már egészen fiatal korban is számolhatunk tumorok kialakulására.

A non-melanoma típusú bőrrákok patogenezisének részleteit jobban ismerjük a melanomáénál. Ezekben a tumorokban ismerjük két meghatározó gén, a Trp53 és a PTCH oki szerepét, illetve igazolni tudjuk az UV-sugárzás okozta mutációk jelenlétét ezekben a génekben. A basalioma és spinalioma között fontos különbség, hogy a basaliomának nincsen előalakja, *de novo* jelenik meg ép bőrön. A spinalioma esetén viszont a tumorok kialakulásához vezető első stádiumnak a bőr krónikus napfény-károsodása tekinthető. Az évtizedeken át elszenvedett UV-fény hatására a bőr foltossá, durva tapintatúvá válik, helyenként hajszálerágulatok jelennek meg rajta. Az ilyen bőrben a szövettani vizsgálat celluláris szinten is enyhe fokú szöveti rendezetlenséget mutat, de jelentős fokú atípiát nem észlelhetők. További napfény expozíció keratotikus, jelentősebben beszűrt léziókat generál, amelyeket solaris keratosisoknak nevezünk. Ezek szöveti képében már felismerhetők a szöveti atípiák jelei, úgymint: szabálytalan sejtosztódások és atípusos sejtdifferenciáció. Bár ezek az elváltozások még képesek spontán visszafejlődni, amennyiben a napfény expozíció megszűnik, mégis egy az ezerhez arányban *in-situ* karcinómába mehetnek át. Ennek az átmenetnek jól nyomon követhető szöveti jelei vannak, amelyek magukba foglalják a sejtek aneuploidiáját és a malignus tumorok jellemző metasztázis készségét. A fenti folyamatos átmenet a reverzibilis pre-malignus formákból malignus tumorokba elsősorban a spinaliomákra jellemző, ehhez hasonló átmeneti alakok basaliomákban nem mutathatók ki. A spinaliomákkal ellentétben még a teljesen kiérett basaliomák is megtartják a sejtek diploiditását és pusztán lokális invázió révén terjednek. Metasztázisok megjelenése basaliomákban irodalmi ritkaság. Mégis, a non-melanoma bőrtumorok gyakorisága, amely a fehér bőrű lakossággal bíró országokban az emlő-, tüdő-, vastagbél-, és prosztatarák együttes gyakoriságát is meghaladja, fontos népegészségügyi problémává emeli őket.

Mutációk tumorokban és az ultraibolya sugárzás szerepe

DNS károsodás

A fent ismertetett bőrdaganatok háttérében álló néhány fontos gén mutációja a tumorok több mint 90 %-ában megtalálható. Ez a tény önmagában nem szolgálna teljes egészében evidenciaként arra nézve, hogy ezeknek a mutációknak a daganat kialakulása szempontjából valóban szerepe van. Az UV-sugárzás speciális DNS károsodásokat és következményes mutációkat idéz elő, amelyek egyéb karcinogén ágenstől nem tudnak létrejönni, így ezeket UV-kéjegy mutációkként említjük.

Bár fent relatíve hasonló klinikai megjelenésük alapján a basaliomát és a spinaliomát együtt, mint non-melanoma daganatot is emlegettük, fontos különbségek felismertetőek a patogenezisükben.

A spinalioma esetén a p53 szerepe elsődleges, és ez nem csak abban nyilvánul meg, hogy a klinikailag detektálható tumorok csaknem mindegyikében ennek mutációja megtalálható, hanem abban is, hogy a p53 mutációi már korai, még nem invazív klinikai jellemzőkkel bíró tumor-előalakban is kimutathatóak. A klinikummal fedésben, az élet során ismétlődően elszenvedett UV-károsodás vezet aztán tumor kialakulásához, jellemzően magasabb életkorban a napnak folyamatosan kitett bőrfelületeken alakulnak ki. Ezzel szemben – bár a p53 mutációk itt is a tumorok több mint felében megtalálhatóak - a basalioma esetén inkább a PTCH génnek van nagyobb szerepe, amely extrém esetekben már 30 éves kor alatt is basaliomák megjelenéséhez vezet. Bár az UV-re jellemző kézjegy mutációk ebben a génben is megtalálhatóak, mégis gyakran napnak ki nem tett bőrfelületen jelenik meg a tumor és inkább az epizodikusan elszenvedett napintenzitású UV-hatáshoz köthető, azaz a napégések számával korrelál inkább.

Az immunrendszer hatása is másként jelentkezik, a basaliomák esetén az immunszupprimált státusz kevésbé jelent rizikótényezőt, de a spinalioma esetén ez meghatározó tud lenni, amit a szervtranszplantáltak körében tapasztalt nagyszámú és gyors progressziót mutató spinalioma megjelenése jól alátámaszt. Természetesen az, hogy az immunszuppresszió primeren vezet-e a daganatok kialakulásához, vagy a virális tényezők szerepe az elsődleges, még ma is vizsgálatok tárgya.

Naevoid basalsejtes carcinoma syndroma, Gorlin-Goltz szindróma, a PTCH gén szerepe

A két tumor közötti különbséget az a klinikai megfigyelés is jelzi, hogy a basalioma köztes alak, precancerosus elváltozás nélkül jelenik meg a bőrön, míg a spinalioma esetén csaknem mindig megtalálhatóak az előlakként szereplő solaris keratosisok. A klinikai különbségeknek bizonyára magyarázata, hogy a basaliomák kialakulásáért a Trp53 mellett más tumorsuppresszor gének szerepe is ismertté vált. Genetikai analízis és kromoszóma térképezés igazolta Gorlin-Goltz szindrómás betegeknél, hogy a *Drosophila patched* gén humán homológja a PTCH1 a 9q kromoszómán allélvesztéssel vagy pontmutációval inaktiválódott, így a tumorok kialakulásáért felelős.

A Gorlin-Goltz, vagy nevoid basalsejtes carcinoma szindróma 1960-ban került leírásra, mint egy ritka genodermatózis, amely jól meghatározható kritériumrendszerrel diagnosztizálható. A diagnózis felállításához major és minor kritériumok meglétét vizsgáljuk, 2 major vagy 1 major és 2 minor kritérium megléte esetén a diagnózis felállítható. A major kritériumok közé tartozik a 20 éves életkor alatt jelentkező basalioma, odontogén keratociszta vagy több csontot érintő csontciszta, 3 vagy több tenyéri vagy talpi behúzottság, ektopikus calcifikáció vagy 20 év alatt falx cerebri calcifikáció, ill. a családban előforduló Gorlin-Goltz szindróma. A minor kritériumok közé tartoznak veleszületett csontrendellenességek: hasadt, összenőtt, kifordult vagy hiányzó borda, vagy összenőtt, hasadt, csigolya, szív vagy ovárium fibroma, medulloblastoma, lymphomesenterikus ciszta, kongenitális malformáció: nyúlajak, farkastorok, polidaktília, valamint szemészeti eltérések: (cataracta, colobma, microphthalmia, nystagmus). A PTCH gén és a Hedgehog útvonal fontosságát hűzza alá, hogy a közelmúltban jelentek meg közlemények, amelyben fázis III. klinikai vizsgálatok eredményeit írták le a vismodegib (korábbi néven: GDC-0449), egy szisztémásan adott Smo gátló kismolekula használatát előrehaladott basaliomák kezelésében. A dolgozat írása előtt néhány hónappal publikálták a klinikai vizsgálatok eredményeit lokális Smo inhibitor tartalmú készítmény alkalmazásával.

Környezeti ártalmak a bőrön: ultraibolya sugárzás

A bőrt érő környezeti hatások közül onkológiai jelentősége elsődlegesen a napfény ultraibolya tartományának van. Az ultraibolya sugárzás a Napból származó elektromágneses sugárzási spektrum látható fénytől rövidebb hullámhosszú része. Az UV tartomány egyes elemeinek biológiai hatásai a hullámhossztól függően eltérőek. Ennek alapján megkülönböztetünk UVC 200-280 nm, UVB 280-320 nm, UVA2 320-360 nm és UVA1 360-400nm tartományokat. A Föld felszínét az UVC az ózonpajzsunk köszönhetően nem éri el, ami a Föld felszínén az élet kialakulásának a feltétele volt, hiszen ez a hullámhossztartomány a legmutagénabb. Napjainkban az ózonlyuk

időszakos kialakulása mellett nem kell számolnunk a Föld felszínét elérő UVC sugárzással, inkább az UVB alacsonyabb hullámhosszúságú komponenseinek az aránya növekszik. Az UVC igen kifejezett DNS károsító hatásának alapja az, hogy a DNS molekula abszorpciós maximuma 260 nm, amely ebbe a tartományba esik. Emellett azonban a DNS-abszorpciós görbéje átnyúlik az UVB tartományba is, így ennek a hullámhossz tartománynak a DNS károsító hatásával is számítanunk kell. Az UV-fotonok a DNS-ben jellemzően két egymás melletti pirimidin bázis esetén okoznak markáns elváltozást, két alapvető fototermék létrehozásával. Ezek közül gyakran jönnek létre a ciklobután-pirimidin-dimerek, (CPD), illetve kisebb valószínűséggel a pirimidin-(6-4)-pirimidon fotoproduktum ((6-4)-PD). Ha a bőrt UV-sugárzás éri, akkor a kialakuló fototermékek korrigálására a nukleotid excíziós repair mechanizmus aktivizálódik. Ennek két formája van, a globális genom repair (GGR) és a transzkripcióhoz-társuló repair. A 6-4-fototermék reparációja gyors, hatékony, nagyrészt a GGR révén megy végbe. A CPD-k észlelése és kijavítása lassabb, a kijavítás hatékonysága is alacsonyabb, ennek végrehajtója a transzkripcióhoz kapcsolt repair.

A klinikumban ezen két reparációs útvonal veleszületett zavarát két betegségecsoport képviseli, a xeroderma pigmentosum és a Cockayne-szindróma. Mindkét kórképcsoportban nagyon fokozott a fényérzékenység, de amíg xeroderma pigmentosumban ez korai daganatképzéssel és ennek következményeként bekövetkező halálozással jár, addig a Cockayne-szindróma esetén a tumorok iránti fogékonyság nem emelkedett jelentősen az egészséges populációhoz képest.

Ha a hibák olyan nagyságrendet érnek el, hogy a repair folyamatok által nem kerülnek kijavításra, akkor a DNS hibák a p53 szintjének stabilizálódásához és ennek következtében létrejövő két fontos sejtszintű történéshez vezetnek. Ezek közül elsőként a G1 arrest, a G1 fázisban való sejtciklus megállás valósul meg, ami által hosszabb idő áll a repair rendelkezésére a hibák kijavítására. Ha ez nem elégséges, akkor következik be a másik igen fontos sejtszintű történés, az apoptózis beindulása.

Apoptózis a bőrben: sunburn sejtek

Az apoptotikus keratinociták a bőrgyógyászati irodalomban elsőként „sunburn sejt” elnevezéssel kerültek leírásra, annak a megfigyelésnek az eredményeképpen, hogy létrejöttükhöz erőteljes napfény-károsodásra volt szükség. Hematoxin-eozin festéssel ezen sejtek morfológiája igen jellegzetes: a hámban a szuprabazális rétegben a normál bazofil festést mutató sejtmaggal bíró hámsejtek között, piknotikus, erősen bazofil magú, eozinofil citoplazmájú keratinociták láthatóak. Erős UV hatásra nem ritkán többen egy csoportban jelennek meg. Az első morfológiai elnevezést követően molekuláris módszerekkel is lehetett igazolni, hogy ezek a sejtek mindazon paraméterekkel rendelkeznek, amelyek egyébként az apoptózison átmentő sejtek ismérvei, ilyenek a DNS fragmentáció, a sejtmembrán külső felszínén előforduló foszfatidil-szerin és kaszpáz aktivitás. A sunburn sejtek szerepe, mint általában igaz az apoptózisra is, a szöveti integritás fenntartása. Ezen folyamat által lehetséges az elszennvedett UVB sugárzástól kijavíthatatlan mértékben károsodott DNS-sel bíró keratinociták eliminálása. A kontrollált elimináció megakadályozza a károsodott genetikai anyaggal bíró sejtek fennmaradását és továbbadását az utódsejtekbe, így megelőzi a karcinogén mutációk túlélését.

A Trp53 tumor szuppresszor gén

A Trp53 gén mind a basaliomák, mind a spinaliomák patogenezisében jelentős szerepet játszik. Ez a gén egy transzkripciós faktort kódol, amelynek targetje számos a sejtciklus szabályozásában résztvevő gén, továbbá a Trp53 protein termék stabilitásáért felelős mdm-2 gén is. A Trp53 jelentőségét emberi tumorokban hangsúlyozza az a tény, hogy az összes tumor több mint felében írtak le mutációkat ebben a génben. A non-melanoma tumorok közül legegységesebben a spinaliomák esetén észlelhetőek a Trp53 mutációi 90% feletti gyakorisággal.

A Trp53 gén a genetikai integritást hivatott fenntartani, így a „guardian of the genome, génállomány védelmezője”-ként működik. Ez a védelem két lépésben valósul meg, a sejtciklus feltartóztatása és az apoptózis iniciálása formájában. Első lépésként a DNS károsodás hatására a sejtciklus a G1 ellenőrzőpontnál megáll. Ennek oka, hogy a Trp53 fehérje stabilitása fokozódik, ami a ciklin-dependens kináz inhibitorok közreműködésével, a CKI-p16 aktivitásán keresztül vezet a DNS hibájának a kijavítására szánt idő meghosszabbodásához. A Trp53 a G1 fázisban az ún. R pont

dc. 274.11
(restrikciós pont) elérése előtt képes megállítani a sejtciklust, hiányában azonban ez nem következik be. Ennek a pontnak a kulcsmolekulája a retinoblasztoma gén és protein terméke, az Rb. Ennek a molekulának a foszforiláltsági állapotától függően szabadul fel az E2F transzkripció faktor család valamelyik tagja, hogy a DNS replikációt beindítsa. A folyamatot felülről szabályozó ciklin-dependens kinázok inhibitorok által szuppresszálódnak, ill. szabadulnak fel a gátlás alól. A ciklin-dependens kináz inhibitor gének ismert targetjei a Trp53-nak.

A hypoxia útvonal szabályozása

A DNS károsodás kialakulásának megelőzésére a repair mechanizmusokon kívül egyéb rendszerek is rendelkezésre állnak. Ezek közül kiemelt jelentőséggel bír a reaktív szabad gyökök (ROS) közömbösítésére szolgáló védelmi rendszer. A ROS képződésének folyamatában a szöveti oxigén homeosztázisnak is kiemelt jelentősége van, amely a hypoxia útvonalon keresztül, a HIF1 közreműködésével jön létre. A HIF-1 egy heterodimerekből felépülő transzkripció faktor, amely az oxigén homeosztázis központi regulátoraként működik. Két alegységből áll, HIF-1alfa és béta. Ezek közül a HIF-1 béta konstitutívan expresszált és dimerizációs partnerként szolgál egyéb transzkripció faktorok számára, más néven egyébként aryl-hidrokarbon receptorként is ismert. A HIF-1 alfa expressziója ezzel szemben a sejtben lévő oxigénkoncentráció kontrollja alatt áll, és mint ilyen, fontos szignáltranszdukciós útvonalakat regulál. A HIF-1 transzkripció faktor komplex aktivitása egyértelműen a HIF-1 alfa alegység kontrollja alatt áll, tehát kijelenthető, hogy a HIF-1 alfa az oxigén homeosztázis legfőbb regulátora. A hypoxia a HIF szintjét olyan módon szabályozza, hogy gátolja a HIF-1 alfa proteosomális degradációját. Ennek effektor mechanizmusa a HIF-1 alfa prolin-hidroxiláznak a hypoxiás környezetben észlelhető csökkent hidroxilizációs aktivitása.

Lipidek az epidermiszben és ezek szerepe a keratinocita differenciációban

Az epidermisz bazális rétege az a sejtréteg, amely direkt kontaktusban áll a bazálmembránnal és ez képes proliferációra is. A bazális keratinociták alapvetően két funkcionális csoportra oszthatók attól függően, hogy differenciáció szempontjából milyen potenciált mutatnak. A bazális réteg sejtjei között találhatóak az epidermális őssejtek és a tranzit amplifikáló sejtek.

A ceramidok a lipidek egy csoportjának összefoglaló neve. Közös jellemzőjük, hogy egy szfingozin és egy zsírsav építi fel őket. Elsődlegesen a membránokban található meg, azonban az utóbbi két évtizedben világossá vált, hogy funkciójuk lényegesebben összetettebb, semmint csak hogy egy hidrofób struktúrát hoznának létre. A ceramidok a szfingomielin létrehozásában játszanak szerepet, amely a kétrétegű lipid membránok fő alkotója. Ennek a membránnak mostanra világossá vált, hogy jelátviteli funkciója is van, mely jelátviteli mechanizmus számos alapvető celluláris funkció alapját képezi. A ceramidok egyik leginkább vizsgált tulajdonsága az apoptózis indukáló hatásuk. A ceramidok felszaporodása észlelhető olyan hatások eredményeképpen, amelyek ismertén apoptózist indukálnak. Ilyenek az ionizáló sugárzás, UV-sugárzás, TNF alfa, kemoterápiás szerek. Az apoptózis regulációjának folyamatában a mitokondrium upstream elemeként tekintünk a ceramidokra, azonban a folyamatban számos elem nem pontosan tisztázott. Mivel a daganatsejtekben ceramidok akkumulálódnak, így vélhetően szerepet játszanak a tumorok elleni védekezésben az apoptózis válasz során, ezért a ceramidok mint tumor szuppresszor lipidek is leírásra kerültek.

Az értekezésben vizsgálni kívánt kutatási feladatok

A 2000-ben védett PhD munkám folytatásaként tovább foglalkoztam azokkal a hatásokkal, amelyek Trp53 változásokhoz vezetnek, az apoptózis szerepét világítják meg és annak regulációjában résztvevő folyamatok további részleteit tárják fel. Jelen doktori értekezésemben természetesen ennek egy szélesebb kontextusba helyezett megközelítését ismertetem, ahol az UV-sugárzás DNS károsító hatásaira létrejövő komplex védekezés elemeit vizsgáltuk az apoptózisra gyakorolt tényezőkön keresztül, illetve a keratinociták olyan alapvető funkcióit, mint a hypoxia stresszre mutatott válasz, a terminális differenciáció folyamata. Mivel a fent részletezett adatok alapján a Trp53 szerepe a bőrben fiziológiai folyamatokban és a tumorok kialakulása szempontjából is egyértelmű, így kézenfekvő volt a p53 mutációinak kialakulásának egészen korai stádiumait is vizsgálnunk. A kísérletes munkában sikerrel állítottunk elő olyan „molekuláris szintű tumorokat”, p53 mutációt hordozó sejtszoptokat, amelyek esetén vizsgálni tudtuk azt is, hogy az adaptív immunitás részéről ezek a klónok mekkora figyelmet kapnak. A p53 központi szerepét megértve érdekessé vált az effektor mechanizmusok mélyebb analízise is, amely során az E2F-Rb komplex szerepét vizsgáltuk. A hámsejteket érő környezeti károsító tényezők közül a domináns szerepet betöltő UV-sugárzás másodlagos mechanizmusok által, pl. a szöveti hypoxia szintjén is vált ki reakciókat, így további vizsgálatainkban a hypoxia kiváltotta molekuláris mechanizmusokat tanulmányoztuk. Az UV-sugárzás a hámsejtek differenciációjára is hatással van a lipideken, elsősorban szfingolipideken keresztül, így joggal kínálkozott, hogy a keratinocita differenciációt tanulmányozzuk. Az ebben a kísérletes rendszerben beállított konfluencia-indukálta differenciációs modell esetén génexpressziós profil vizsgálatra is lehetőségünk volt. Fentiek mellett a bőrben másik meghatározó jelentőségű tumor szuppresszor génnel foglalkoztunk egy basaliomákban potenciálisan szerepet játszó PTCH polimorfizmus tanulmányozásával.

Vizsgálataink során az alábbi konkrét kérdésekre kerestük a válaszokat:

1. Az ultraibolya sugárzás milyen módon vezet sunburn sejtek kialakulásához, milyen szerepe van ebben a különböző reparációs mechanizmusoknak és az apoptózis kialakulásához szükséges szignál honnan indul ki?
2. A daganatképződés korai szakaszában felismerhetőek-e, és milyen dinamikával növekednek a később tumorrá váló Trp53 mutációt hordozó prekancerózus sejtszoptok egy olyan kísérletes rendszerben, ahol a hámban lapszerinti növekedésüket tudjuk vizsgálni?
3. A Trp3 pozitív sejtszoptok adaptív immunitás hiányában más dinamikával jelennek-e meg, azaz milyen érzékenységgel képes az adaptív immunrendszer korai prekancerózus képleteket felismerni?
4. A Trp53 válasz fontosságának ismeretében mely további tényezők bírnak jelentőséggel a Trp53 downstream elemei közül? Milyen speciális szerepet játszik az E2F1 géntermék, ill. annak hiánya az apoptózis szabályozásában és ennek milyen élettani következményei vannak?
5. Az UV-hatás molekuláris mechanizmusait vizsgálva kerestünk választ a hypoxia jelátviteli útvonal szerepére. Vizsgáltuk, hogy milyen UVB dózisok mellett, milyen dinamikával változik a HIF-1alfa szintje HaCaT sejteken és ennek milyen vonzatai vannak a HIF-1alfa által szabályozott gének expressziójára.
6. A keratinociták érési folyamatában kulcsfontosságú szfingolipidek egyes típusai milyen hatással vannak a kísérletes modellként beállított konfluencia-indukálta keratinocita differenciációra? Az egyes szfingolipid derivátumok milyen változásokat idéznek elő a teljes genom expresszióját DNS-microarray technikával vizsgálva.
7. A keratinocita differenciáció szempontjából fontos gének expressziójának változását tenyésztett primer humán keratinocitákon vizsgáltuk, arra keresve választ, hogy milyen eddig ismeretlen gének expressziója változik? A jelentős változásokat mutató gének közül a potenciális dermatológiai érdekességet mutatóak esetén kíváncsiak voltunk, hogy az észlelt változások kvantitatív reverz transzkriptáz PCR-rel és immunhisztokémiai reakcióval is relevánsnak mutatkoznak-e.

- dc_274_11
8. A basaliomák kialakulása szempontjából kiemelten fontos PTCH génben újonnan felismert polimorfizmus milyen szerepet játszik a tumorok iránti fogékonyságban különböző genetikai háttérrel bíró népcsoportok között?

Anyagok és módszerek

Az egyes vizsgálatokban számos módszer ismétlődik, így elsődlegesen a kísérletek kivitelezése szerinti logika szerinti csoportosítottuk őket. Tárgyaljuk a vizsgálatainkban használt humán és állati minták forrásait, bemutatjuk a kísérletek során végzett beavatkozásokat, kezeléseket, és végül az értékelésben használt makro-, mikro- és molekuláris morfológiai módszereket ismertetjük.

A kísérlet modellrendszerei:

Humán anyagok

A tenyésztett normál humán keratinociták alapjául szolgáló sejtek emberi szövetekből származtak olyan mintákból, amelyek sebészi ellátások hulladékaként keletkeztek (circumcisio, emlőplasztikai beavatkozások, esztétikai sebészeti beavatkozások).

A daganatmintákat az archívumban lévő blokkokból szereztük be. A rutin hisztológiai diagnózis felállítása után a blokkokból további metszeteket készítettünk és ezeken végeztük vizsgálatainkat.

A populációgenetikai vizsgálatokra a DNS-t limfocitákból nyertük 96 random szelektált egészséges páciensből. Emellett 356 normál bőr és 180 non-melanoma bőrtumor került felhasználásra. A diagnózist patológus szakorvos állította fel a tumorok esetén. A mikrodisszekcióhoz 1,0 mg/ml proteináz K-val emésztettük a mintákat 56 °C-on egy éjszakán át. Az enzimet ezt követően 95 °C-on inaktiváltuk és a mintákat -20 °C-on tároltuk. A kontroll csoport DNS-e perifériás vérből származott, elsőként a mintákat lízis pufferben inkubáltuk (115 mmol/l NH₄Cl, 10 mmol/L KHCO₃ és 0,1 mmol/ EDTA) majd 1% SDS és 0,1mg/ml proteináz K hozzáadásával emésztettük tovább. Centrifugálás után a DNS-t telített NaCl-dal csaptuk ki, majd 95% etanolt és Na-acetátot adtunk hozzá. Végül a DNS-t 70%-os etanollal öblítettük.

Kísérleti állatok

Az Xpa, az Xpc és a Csb knock-out egerek az eredeti közleményekben található leírás szerint kerültek megalkotásra, és kollaboráció keretében kerültek laboratóriumunkba.

A Trp53-/- és RAG-1 egereket kereskedelmi forrásból, a Jackson Laboratory és Taconic Farms cégektől vásároltuk, illetve az Erf1-/- egereket Dr. S. Fieldtől ajándékba kaptuk. A transzgén K5 *E2F1* közepes overexpresszálo 1.1 vonal SENCAR beltenyésztett alapon került előállításra borjú 5-ös keratin promoterral, nyúl β -globin intron 2-vel, humán *E2F1* cDNA és SV40 polyadenilációs szignállal.

Az állatokat a fülükbe helyezett számokkal azonosítottuk és a tenyésztésükről kísérleti naplót vezettünk.

Az egerek genotípusát PCR-ral ellenőriztük a kísérletek előtt, részben a neomycin kazetta, részben a vad típusú allél kimutatásával. Az állatok szőrrel fedettek voltak, így a kísérletekre az első szőrváltási hullám után, 6-9 hetes életkorban kerítettünk sort. Az állatok szőrét a hátbőrükön a kísérlet előtti nap leborotvtuk, a minimális hámsérülések így regenerálódni tudtak. Az állatok megnyírását általános érzéstelenítésben végeztük, amihez ketamine –rompun – atropin, ill. isofluorane anesztéziát használtunk. A kísérleteket a szőr eltávolítását követő nap délelőttjén végeztük 9 és 10 óra között. A besugárzás alatt az állatok a nyitott tetejű ketrecben szabadon mozoghattak, de a felállást egy ritka szövésű (1x1 cm-es) rács akadályozta meg, hogy a fókusz-bőr távolság végig egyenletes maradjon a besugárzás időtartama alatt. A dozimetria természetesen ennek a rácsnak a figyelembevételével történt. Az állatok 24 óra elteltével teljes anesztéziában cervikális diszlokációval eutanázián estek át, és a hátbőrüket dolgoztuk fel szövettani technikákkal.

Primer humán keratinocita kultúra

A fent részletezett forrásból származó mintákkal dolgoztunk. A dermiszt az epidermisztől diszpáz II enzim segítségével választottuk szét 4 °C-on, egy éjszakán át történő inkubálással, steril körülmények között. A keratinocita tenyésztés első időszakában mitomicin C-vel kezelt 3T3 egér fibroblasztra volt szükség, amihez Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) és Ham'sF-12 médiumok 3:1 arányú elegyét használtuk. Kiegészítésként 10% főtális borjú szérum (FBS), továbbá 400 ng/ml hidrokortizon, 10 mM koleratoxin, 10 ng/ml epidermális növekedési faktor, 0,089 mM adenin, 292 mg/ml glutamin, 0,105 IU/ml inzulin, transzferrin, 1% Fungibact hozzáadása volt szükséges. A tápfolyadékot háromnaponta cseréltük, a tenyésztés 5% CO₂ atmoszférán 37 °C-on történt. Szubkonfluens állapot elérése után a keratinocitákat tripszin+EDTA (tripszin: 0,025%, EDTA: 0,01%) segítségével szedtük felt, majd KGM médiumban 3T3 sejtek nélkül tenyésztettük tovább.

A diszpáz emésztés után a keratinocitákat tripszines-EDTA segítségével lehetett kinyerni a hámból. Az így kapott sejtszuspenziót KGM médiumban vagy Epilife szérummentes médiumban tenyésztettük.

A tápfolyadék cseréjekor a primer humán keratinocitákhoz vagy a tesztvegyületet, vagy oldószerét, etanolt adtunk, aminek a végső koncentrációja 0,05% volt. A sejteket minden esetben teljesen konfluenciáig hagytuk növekedni. A leszüretelésük különböző időpontokban történt, a kontrollokat azonnal, az aktív hatóanyaggal kezelt mintákat az első és negyedik napon arattuk le. Minden alkalommal három darab 60 cm²-es tenyésztőedényt használtunk és minden donortól három flaskára volt szükség a megfelelő RNS mennyiség előállítására.

HaCaT sejt kultúra

A primer keratinocita kultúra mellett HaCaT humán spontán immortalizált keratinocita vonalat használtunk, amelyet Norbert E. Fusenig-től szereztünk be. A tenyésztéshez 10% FBSt-t tartalmazó DMEM tápfolyadékot használtunk, amelyet hetente háromszor cseréltünk. A sejteket 37 °C-on normoxiás körülmények között növesztettük, 10% széndioxid, 90% levegő elegye mellett. A DMEM a szérum mellett AB-AM kevert antibiotikus-antimikotikus elegyet tartalmazott 10 cm átmérőjű Petri csészében. A sejteket 70 - 90 %-os konfluenciáig növesztettük, hogy egyenletes sűrűséggel tudjunk dolgozni. Friss tápfolyadékot egy nappal a kísérlet előtt kaptak pozitív kontrollként. A HIF1 alfa stabilizációját olyan módon indítottuk be, hogy a Petri csészéket négy óráig hypoxia kamrában tartottuk, ahol a keverék összetétele 1% O₂, 5%CO₂ és 94% N₂ volt.

Molekuláris szintű minták

DNS szeparálás

Általában a DNS-t vérből, illetve a mikrodisszekcióval végzett PCR vizsgálatnál 20 µm vastagságú szövettani metszetek deparaffinálása után nyertük ki.

Többféle módszert alkalmaztunk: a genomiális DNS izolálására a TRIzol reagens protokolljában leírtak szerint az RNS szeparálás után maradt fenolos fázisból fenol- klorofom módszer segítségével (fenol:kloroform:izo-amilalkohol (PCI, 26:25:1)) is extraháltunk DNS-t. A kisózásos eljárás során a vérben a vörösvérsejtek hipoozmotikus lízisét követően a fehérvérsejteket proteináz K-val emésztettük. A DNS-t etanol kicsapás után archiváltuk, vagy TE pufferben oldottuk és használtuk. A klasszikus módszer után hamar áttértünk a Quiagen blood mini vagy midi kitre, illetve automata DNS szeparáló automatával is végeztünk izolálást.

RNS szeparálás

A totál RNS szeparálása a perifériás vér limfocitáiból és a sejtenyészetből RNAesy kittel vagy Chomczynsky és Sacchi módszerével TRIzol reagens felhasználásával történt a gyári előírásoknak

do-274-11
megfelelően. Az izolátumokat DNS-mentes DNáz emésztésnek tettük ki gyári kitet használva. A koncentráció mérése után az RNS minták integritását egy denaturáló 1,5%-os agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük. Az RNS mennyiségét fotometriai méréssel határoztuk meg. A mintákat -80°C-on tároltuk.

Polimeráz láncreakció (PCR)

Az állatkísérletekben az egerek farkának végéből extrahált DNS szolgált a genotípus meghatározására a KO génre specifikus PCR-ek segítségével.

A PTCH PCR-hez a genomikus DNS-t 1–3 ng mennyiségben használtuk a reakcióban templátként. A PCR paraméterei így alakultak: első denaturálás 95 °C, 10 min, majd 95 °C 1 min, 61 °C 2 min és 72 °C 1 min 35 ciklusban. Az utolsó extenziós lépés 72 °C 10 min volt. A reakció térfogata 50 µL volt. Az amplifikáló keverék összetétele: 10 mmol/l Tris-HCl pH 8,3, 1,75 mmol/l MgCl₂, 50 mmol/l KCl, 0,1% Tween 20, 0,1 mmol/l dNTP, 5 pmol primer (biotin-5'-GT GGT GAT GGG CTG GCA GTA-3' és 5'-CCC CAG AGA AGG CTT GTG GC-3') és 1,25U AmpliTaqGold DNA polimeráz.

Klón mikrodiszekció, DNS amplifikáció és szekvenálás

A kísérlet során előállított klónok p53 mutációinak igazolásához a DNS-t oly módon nyertük ki, hogy egy vékony, G30-gauge injekciós tűvel - immunhisztokémiai reakció után - a pozitív reakciót adó sejtsortot mechanikusan szeparáltuk el a környező szövetektől. A sejtsort mérete 15–500 sejt volt 100 és 2000 közötti sejtet tartalmazó klónból. A DNS izolálására InstaGene Matrix került felhasználásra. A teljes DNS amplifikálására elsőként semirandom nonamer primert használtunk az alábbi szekvenciával: 5'-NNNNNN(G/C)(G/C)(G/C)-3' 2,5 µl 10 X Expand High Fidelity pufferben (15 mM MgCl₂/7,8 µl H₂O/2,5 µl 2 mM dNTPs/1,2 µl primer (2,5 µg) 1 µl (3,5 unit) Taq DNS polimeráz és hibajavító polimeráz 10 µl templát DNS (2 ng). A PCR egy PTC-100 PCR készülékkel történt. A paraméterek az alábbiak voltak: 1 ciklus (60°C 3min, 94°C 5 min); 40 ciklus (2,9 min rámpa 94°C/94°C 10sec/1,95 min rámpa 24°C/24°C 10 sec). A p53-as gén 8-as exonjának amplifikálására használt primerek: 5'-CTAGTTTACACACAGTCAGGATGG-3' és 5'-AAGAGGTGACTTTGGGGTGA-AGCTC-3', a reakcióhoz használt enzim: HotStartTaq DNS polimeráz. A reakció paraméterei 40 ciklusra: 94°C 45 sec, 58°C 45sec, 72°C 1 min, majd végső extenzió 72°C 10 min. Negatív kontrollokat a kontamináció kivédésére minden esetben alkalmaztunk. A DNS szekvencia fluoreszcens forward és reverz primerekkel került meghatározásra.

Epidermális lemezek készítése

Egér hátbőrét először a szubkután zsírszövettől mechanikusan tisztítottuk meg, majd a dermiszt és epidermiszt tartalmazó bőrt 20mmol EDTA-t tartalmazó PBS-ben 37 °C-on inkubáltuk 30 percig, majd a hámot egy spatula és egy csipesz segítségével távolítottuk el. Az epidermiszt azonnal acetonnal fixáltuk és nátrium-aziddal kezelt PBS-ben 4°C-on felhasználásig tároltuk.

A minták kezelésére használatos eszközök és reagensek:

Besugárzási fényforrás:

A vizsgálataink során Philips, ill. Westinghouse FS20 fénycsőveket használtunk, a 290 nm alatti tartományt Kodacell filterrel szűrtük ki.

Dozimetria

A lámpák emisszióját a besugárzások előtt minden alkalommal egy UVX-méter ill. másik kísérletsorozatban egy VLX-3W radiométer segítségével mértük, ami CX-312 szenzorral volt felszerelve.

Fixálás

dc-274-11
Minden humán forrásból származó szöveti mintát 10% pufferolt formalinban fixáltunk, majd paraffinba ágyztuk és poli-L lizinnel vagy xilánnal bevont tárgylemezre 4-6 μ -os metszeteket készítettünk. A friss minták egy részét OCT-be ágyztuk, a folyékony nitrogén gyors-fagyasztás kriosztátban történt, majd a blokkot bevont tárgylemezre metszettük, acetonnal fixáltuk. Egér bőrök fixálására Telly-féle fixálót használtunk (100ml 70% etanol, 5ml ecetsav, 10ml 40% formalin).

Differenciációt indukáló szfingolipidek

A retinol és a calciferol a Sigma-tól kerültek beszerzésre. A szfingolipid vegyületek az alábbiak voltak: fitoszfingozin, szfingozin, szfinganin, hexanoil-fitoszfingozin, hexanoil.szfingozin, hexanoil-szfinganin, sztearoil-fitoszfingozin, sztearoil-szfingozin, sztearoil-szfinganin, szfingozin-szalicilát, szfinganin-szalicilát, fitoszfingozin-szalicilát, C12-alkilamin, C12-alkilamin-szalicilát és szalicilsav, ezek beszerzési forrása az Evonik-Goldschmidt GmbH volt. Az anyagokat nem toxikus koncentrációig etanollal hígítottuk.

Transzfekció

Primer egér fibroblasztok transzfektálását végeztük egy pcDNA3.1-E2F1 konstrukcióval, amely CMV promotor kontrollja alatt állt. A transzfekcióhoz Lipofectamine 2000 kitet használtunk.

Citotoxicitási vizsgálat

A szfingolipidek különböző vegyületeit alkoholos oldatban vittük be a sejt kultúrába. Pozitív kontrollként hidrogén peroxid és Na-laurilszulfát szolgált. A sejtekből felszabaduló LDH, adenilát kináz és celluláris ATP koncentrációt mértük.

Az értékelésben használt módszerek

Szöveti és sejtszintű hisztológiai és immunhisztokémiai technikák

TUNEL esszé

Az apoptózis igazolására a DNS törések kimutatásán alapuló „Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling” (TUNEL) módszert használtuk, amelyhez ApoBrdU Red DNA Fragmentation Kitet használtunk. A módszer lényege a DNS-ben képződő törések felismerése, ahová a terminal deoxynucleotidil transzferáz enzim dUTP-t épít be, ami aztán számos módszerrel vizualizálható.

Áramlási citometria

Azért, hogy az UV fény biológiai hatékonyságát igazoljuk és az apoptikus sejteket százalékosan mérni tudjuk, áramlási citometriás vizsgálatot végeztünk.

A HaCaT sejtek tápfolyadékra került, majd a sejteket PBS-sel mostuk. A PBS-mosás után, a PBS-t és a tápfolyadékot 50 ml-es Falcon csövekbe gyűjtöttük és jégre tettük. A letapadó sejteket 0,05% tripszin-EDTA oldattal választottuk föl és ehhez a gyűjtött mintához adtuk. A tripszin inaktiválására 1 ml FCS-t adtunk a Falcon csövekhez, majd a csöveket lecentrifugáltuk 270 G / 8 perc / 8°C, majd az üledék 5 ml-ben lett szuszpendálva 1 % FCS-t tartalmazó PBS-ben. Ennek az oldatnak 500 mikroliteres frakcióit vittük át az áramlási citometriás csövekbe. Az áramlási citometriai analízis az apoptózis irányába az Annexin V, illetve a propidium jodid módszerrel történt. A festéshez használt kitet a Roche cégtől szereztük be és a gyári eljárások szerint jártunk el. Magát az áramlási citometriás mérést egy Becton-Dickinson FACScan készüléken végeztük.

Sunburn-sejtek – apoptotikus keratinociták kimutatása

Az egerek hátbőrének középső részéből egy kb. 1,5 cm² darab került minden kísérlet állatból eltávolításra, majd az egérbőrök fixálására Telly-féle fixáló anyagot használtuk. A fixált mintákat

dc_274_11
paraffinba ágyaztuk, metszettük és hematoxilín-eozin festést végeztünk. A metszet hosszát 160-as nagyítás mellett, a sunburn-sejteket 400-as nagyítás mellett értékeltük. A sunburn-sejtek kritériumai az alábbiak voltak: intenzív eozinofílen festődő citoplazma, hiperkromatikus, zsugorodott sejtmag, a sejtet körülvevő udvar, a „halo” és az eozinofil magnélküli test. Egerenként 3–4 metszetet értékeltünk, a sunburn-sejtek számát cm-re vetítve adtuk meg, állatonként átlagoltuk és statisztikailag értékeltük.

Immunhisztokémia

A p53 immunhisztokémiához az epitóp feltárására 8 perc 10 mM citrát pufferes (pH 6,0) előkezelés történt mikrohullámú sütőben, majd PBS-ben öblítettük metszetet. Az endogén peroxidázt 0,15%-os H₂O₂-val blokkoltuk, majd a nem-specifikus kötődéseket normál kecske szérum 3% BSA-PBS oldattal védtük ki. Az elsődleges antitest CM-5 nyúl poliklonális antitest volt, amely mutáns és vad típusú p53-at is felismer. Egy éjszakás inkubációt követően 1:2500 hígításban inkubáltuk 4 °C-on, majd PBS-sel öblítettük. Másodlagos antitestként biotinilált kecskében termelt nyúl-ellenes antitestet használtunk, amit 3% BSA-PBS-ben hígítottunk, majd PBS-ben mostunk. A reakció vizualizálására diaminobenzamid ABC reagens kitet használtunk DAB reagenssel 14 percen át.

Immunoblot analízis

A mintákat Laemmli-féle felviteli pufferben tartottuk 5 percig, majd azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó mérési anyagot vittünk fel 7,5% SDS poliakrilamid gélre. A fehérjéket azután nitrocellulóz, vagy PVDF membránra vittük át és a HIF-1alfa jelenlétét immunkémiai módszerrel detektáltuk. Az elsődleges anti-HIF-1alfa antitesttel való inkubálás után másodlagos antitestként torma peroxidáz jelölt anti-egér antitesteket használtunk. Az antitesteket aztán kemilumineszcens reagenssel tudtuk láthatóvá tenni Rtg filmen. A megfelelő protein felvitel Ponceau-red festéssel került igazolásra.

Anti-foszfó-AKT (Ser 473) és anti-AKT antitesteket a Cell Signaling Technology cégtől szereztük be.

Direkt szekvenálás

A PCR termék dideoxinukleotid lánc-terminációs szekvenálás Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit S dATP (Amersham) segítségével történt.

Pyroszekvenálás

A betegek tumorából, vérből és a kontrollcsoport vérmintáiból minták pyroszekvenálás módszerrel kerültek feldolgozásra. Az ehhez szükséges templátot egy MBS automatával gyártottuk le. A biotinilált PCR termék streptavidinnel bevont super paramagnetikus gyöngyökre került lekötésre B/W pufferben (10 mmol/l, Tris-HCl pH 7,6, 2,7 mol/l NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0,1% Tween 20). Egyszálú DNS-t a megkötött PCR termékek 0,2 mmol/l NaOH jelenlétében történő inkubálással állítottunk elő. A megkötött egyszálú DNS-t aztán mostuk és annealing pufferben reszuspendáltuk (20 mmol/l Tris acetát, 2 mmol/l magnézium acetát pH 7,6) 1 pmol/l szekvenáló primer (5'-GCT TGT GGC CAC CCC-3'). Real-time pyroszekvenálást egy automata 96-lyukú PyroSequencer készülékkel végeztük az enzimeket és szubsztrátokat LucKit SNP 96 felhasználásával kaptuk.

A citotoxicitás értékelése

A citotoxicitási vizsgálatot az LDH, az adenilát kináz, és a sejtek ATP koncentrációjának mérésére alapoztuk. Az LDH aktivitását a sejtkultúra felülúszójából és a letapadt sejtekből is NADH konverzió alapuló spektrometriával határoztuk meg, az LDH felszabadulást a két mérés aránya alapján számoltuk ki. Az adenilát kináz esszéhez és a sejtek ATP tartalmának meghatározására ToxLight and ViaLight plus kitet használtunk. Minden fenti eljárást a gyártó utasításai alapján végeztünk. A sejtek fehérjetartalmát Bradford módszerével határoztuk meg.

DNS microarray

dc_274_11
A génexpressziós profilokat az Affymetrix HG-U133+2.0 gén chip rendszerrel határoztuk meg, 2 mikrogramm teljes RNS-t használva. Pontosan 0,66 mikrogramm RNS-t használtunk a cDNS előállítására a 3 különböző, de ugyanolyan kezelést kapott donor keratinocitáiból. Egy chip-et hibridizáltunk minden időpont és minden kezelési mód esetén, kivéve a nem kezelt kontrollokat az első és a negyedik napon, amikor is 2 chipet hibridizáltunk ugyanabból a donorból származó, egymástól teljesen különválasztott sejtcsoportból. A microarray eredmények validálására kvantitatív PCR-t végeztünk 20 gén esetén, a két független mérés esetén nagyfokú hasonlóságot észleltünk.

Real-time RT-PCR (TaqManTM) analízis

Real-time reverz transzkriptáz (RT)-PCR analízist optimalizált Assays on Demands használatával végeztünk a korábban leírt módon. Az alábbi esszéket használtuk: filaggrin (Hs00863478_g1), involukrin (Hs00846307_s1), transzglutamináz 1 (Hs00165929_m1) és korneodezmozin (Hs00169911_m1).

Promoter extrakció

Minden vegyülethez különböző fokban expresszált (up- vagy downregulált) gének csoportjait készítettük el két kategóriába: „növekedett” és „kissé növekedett”. Csoportonként 150 gént szelektálunk, a legmagasabb változást mutató gének közül minimálisan 1,3-szoros változást feltételként szabva. Ettől függetlenül a változást nem mutató gének csoportját is létrehoztunk, mely 200 random módon szelektált, változást nem mutató (no change: NC) gént tartalmazott, és ezek expressziója nem mutatott nagyobb, mint 1,05-szörös változást up vagy downreguláció irányában a hat kísérleti vegyülettel való kezelést követően. A 6 vegyület a fitoszfingozin, hexanoil-fitoszfingozin, fitoszfingozin-szalicilát, szfingozin, hexanoil-szfingozin, szfingozin-szalicilát voltak. A promotereket a különbözőképpen expresszált és nem változó a TRANSPro[®] adatbázis 2.1-es változatából nyertük ki, amely az ismert és várható transzkripció start helyek (transcription start sites, TSS) feltérképezésén alapul. Alapjául olyan adatbázisok szolgálnak, mint az EPD, DBTSS, Fantom and Ensembl. Promoterekként azokat fogadtuk el, amely szekvenciák a transzkripció starthely -1000 - +100 bázispár tartományba estek. Amennyiben egy gén esetében többszörös TSS volt megtalálható, ‘best supported’ TSS-t választottuk, amelyet a legtöbb expresszált szekvencia tag és 5’ mRNS szekvencia támasztott alá.

A transzkripció faktor kötőhelyek promoteren belüli számítógépes azonosítása

A transzkripció faktor (TF) lehetséges kötőhelyeinek promoteren belüli számítógépes azonosítása a Match[®] program segítségével történt, amely a teljes TRANSFAC[®] könyvtárat használja (Library of Positional Weight Matrices (PWM) a TRANSFAC[®] adatbázisból). A TRANSFAC adatbázis a TF-ok kötőhelyeik adatait tartalmazza promoterekben és enhancerekben eukariota gének esetén, továbbá a PWM-ek könyvtárat, mely különféle transzkripció faktorok kötőhelyeinek komputerek által értelmezhető modelljeit tárolja. A Match[®] program végigfuttatja a PWM-et szekvenciákon, minden pozícióban értékeli a kötődést, és megpróbálja megjósolni a TF-kötőhelyet, ha a kötődés egy beállított érték felé megy. A jelen vizsgálatunkban a matrix score határok (cut-offs) minimális fals-negatív értékre (minFN) voltak beállítva, amely minden PWM-re más értéket jelent, de 90%-os szenzitivitást (fals negatív ráta: 10%) biztosít az adott kötőhely megjósolására.

A CPM, azaz az egymáshoz közel elhelyezkedő promoterbeli TF-kötő helyek kombinációinak a meghatározása a Composite Module Analyst (CMA) szoftver segítségével történt a különféle szfingolipid vegyületek indukciója által változó fokban expresszált gének promotereiben. A vegyület-specifikus promoterek általános modelljének felállítása az upregulált gének promotereinek esetében is a CMA segítségével történt. A CMA analizálja különféle módon expresszált gének promotereinek szekvenciáit, összehasonlítja azokat a változás nélküli gének promotereivel és azonosítja a CPM-et több PWM pár formájában adott távolság és irány megkötéssel a megfelelő TF-kötő hely párokban.

Kompozit promoter modellek (CPM) előállítása

do-274-11.
Korábban közölt számos publikációban a promoterek összetett struktúráinak analizésére tett próbálkozások meggyőző kísérletes megerősítést kaptak. A kompozit modulok használatával társuló kötőhelyeket lehetett találni a sejtciklusban fontos E2F transzkripciós faktornak, amely aztán CHIP kísérletben megerősítésre került.

Real-time PCR

A reverz transzkripciója az 1 gramm RNS mintának minden mintából Ambion Kit-et használva történt a gyári leírásnak megfelelően. A kvantitatív PCR, optikai tetővel bíró PCR lemezeken történt egy E-cycler real-time PCR géppel. A TaqMan univerzális PCR master mix-szel, vagy Cybr zöld PCR master mix-szel. Pontosan 1,25 nanogram RNS-ből előállított cDNS-t használtunk minden reakcióhoz. A génspecifikus TaqMan próba és primer keveréket az ABI-től szereztük be. Minden mérés 25 mikroliteres térfogatban történt 3 minta felhasználásával. Normalizáláshoz humán béta aktin mRNS-t használtunk. Az adatfeldolgozás DDCT metódus szerint történt az ABI ajánlása alapján.

Dokumentáció

A mintákat fény-, esetenként fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és fotóztuk. Az egérbőr metszet hosszát makroszkóposan és mikroszkóposan mértük. A felvételeken történő számításokhoz NIH Image szoftver 1.62-es verzióját alkalmaztuk.

Statisztikai módszerek

DNS microarray kísérletek: A mértani közép meghatározása az egyes gének expressziós értékeiből történt. A minták normalitását Shapiro–Wilks W-tesztel ellenőriztük a StatsDirect szoftver segítségével. A Wilcoxon matched-pair signed-ranks tesztet használtuk a kontroll és kezelt minták összehasonlítására.

A grafikonokhoz Microsoft Office Excel szoftvert használtunk, ami szintén alkalmas egyszerű statisztikai számításokhoz, ábrák elkészítésére is. Komplexebb analízisekhez alkalmanként a PC SAS v6.12 rendszert és a SPSS 7.5 for Windows-t is használtuk.

A paraméterek időbeli változását ANOVA tesztel, ill. kétmintás t-próbával vizsgáltuk. Szignifikánsnak az általában elfogadott $P < 0,05$ szintet tekintettük. Az egyes vizsgálatokban a paraméterek között korrelációs számítás is végeztünk.

A DNS szekvencia megállapítása Chromas program 2.31-et használtunk. A DNS bázissorrendeket az NCBI adatbázisban ellenőriztük.

Eredmények

1. A DNS-károsodás szignálja, amely az Mdm2 szabályozását, Trp53 indukcióját és a sunburn-sejtek kialakulását eredményezi, az aktívan átíródó génekből származik in vivo vizsgálatok szerint

Vizsgálataink során arra kívántunk adatokat szerezni, hogy az ultraibolya sugárzás milyen módon vezet sunburn-sejtek kialakulásához, milyen szerepe van ebben a különböző DNS-reparációs mechanizmusoknak és az apoptózis kialakulásához szükséges szignál honnan indul ki?

Munkánkban ehhez kísérleti rendszerként a DNS excíziós reparációs útvonal reprezentatív génjeire nézve knockout egereket vizsgáltuk. A kísérletekben egy alkalommal sugaraztuk be az állatokat, és 24 óra elteltével vizsgáltuk, hogy milyen mennyiségben képződtek apoptotikus keratinociták, sunburn-sejtek.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az Xpa és Csb génre knockout egerek apoptózis-készsége jelentősen fokozott a vad típussal összevetve. Azt tapasztaltuk, hogy jóval kisebb UVB besugárzás eredményeképpen is hasonló mennyiségben voltunk képesek sunburn-sejtet generálni, a különbség 6-9-szeres fogékonyságnövekedés volt a vad típushoz képest.

dc_274_11

Xpc egerek esetén ez a fokozott UVB-érzékenység nem volt észlelhető, a kísérletekben közel ugyanannyi sunburn-sejt képződött adott UVB dózis esetén.

A kétfajta kísérleti rendszer fő különbsége, hogy az Xpa és Csb gén a transzkripcióhoz-társuló repair (TCR) része, azaz az aktívan transzkripció alatt álló gének károsodásainak a felügyeletét látja el. Az Xpc gén ezzel szemben a globális genom repair (GGR) része, azaz a transzkripció aktivitást nem mutató géneket felügyelő reparációs gén hibás működés nem járul érdemben hozzá a SBC képződéshez. Ha a GGR nem működik megfelelően és emiatt UVB-károsodott DNS perzisztál, attól még a SBC képződés kinetikája a vad típuséhoz nagyon hasonló. Hiába jön létre több károsodás a GGR által javítható DNS szakaszokon, ez nem befolyásolja a képződő sunburn-sejtek számát, tehát a DNS ezen szakaszain létrejövő károsodások nem eredményeznek fokozott apoptózist, nem alakulnak ki nagyobb számban sunburn-sejtek.

Ebben a kísérletes rendszerben vizsgáltuk a p53 indukcióját is mindhárom knockout törzsön és a vad típusú kontrollokon. Ezen vizsgálatok azt mutatták, hogy a p53 indukciója az Xpa és Csb knockout egereknél jelentősen fokozottabb, mint az Xpc és a vad típusú egereknél. Alacsony és magas dózisok esetén a vad típusúhoz hasonló dinamikával észlelhető sunburn-sejtek kialakulása, míg a közepes UVB dózis (800 mJ/m^2) esetén szignifikánsan emelkedett Trp53 expressziót észlelhetünk. Észlelésünk szerint az Xpa^{-/-} és Csb^{-/-} egereket a vad típusúakkal összehasonlítva ugyanakkor Trp53 fehérje expressziójához 10-25-ször alacsonyabb UVB dózis is elegendő volt. Ebből következtethető, hogy az UVB hatására észlelhető Trp53 expresszió 90-96%-ban olyan DNS szakaszokról származik, amelyek excíziós repair által korrigálhatóak és a károsodás aktív transzkripció alatt álló DNS szálakon alakult ki.

Az Mdm2 és a p53 szorosan egymásra vannak utalva, mivel az Mdm2 a p53 lebomlását idézi elő, de önmaga a p53 vezérlése alatt áll, így ennek vizsgálata is kézenfekvőnek tűnt. Eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy alacsony UVB dózisoknál az Mdm2 expressziója fokozódott a keratinocitákban. 200 J/m^2 dózis felett azonban a görbe lefelé indult, a fehérjeszint ennél nagyobb dózisoknál már csökkent. Ez a jelenség mind az vad típus, mind az XPC knockout egerek esetén megfigyelhető volt. Az Xpa^{-/-} és a Csb^{-/-} egerekben ezzel szemben emelkedés nem volt észlelhető, már igen alacsony dózisonál Mdm2 expresszió csökkenés jelentkezett. A kísérleteinkből arra következtettünk, hogy a sejtszintű történések sorrendje a sunburn-sejt képződés során a következő: transzkripció gátlás → Mdm2 → Trp53 → apoptózis.

Összegezve a vizsgálatok eredményét, arra a következtetésre jutottunk, hogy az aktívan átíródó génszakaszokon létrejövő DNS-károsodások közel egy nagyságrenddel hatékonyabban indukálják sunburn-sejtek keletkezését, mint az XPC. Ennek az észlelésünknek megfelel az a klinikai tapasztalat, hogy az XPC pácienseknél még az XPA betegekhez képest is nagyobb számban alakulnak ki bőrdaganatok, és ebben az játszik szerepet, hogy a nem aktív génszakaszok reparációjának elégtelensége csak normál mértékű apoptózist eredményez, ami a hibák relatív túlélését jelenti. Az XPA és CSB esetén viszont a nagyobb fokú apoptózis egyfajta tisztító hatást eredményez, a sérült DNS-sel bíró sejtek nagyobb hányada kerül eliminációra.

2. A Trp53 apoptózist indukáló hatásában résztvevő gének szerepe, újabb adatok az UVB-indukálta apoptózis reguláció komplex rendszerében

A Trp53 sejtciklus szabályozó funkciójában az effektor útvonal számos eleme jól ismert, de az apoptózis regulációjára gyakorolt hatásuk nem egyértelmű. Vizsgálatsorozatunkban arra kerestünk választ, hogy a fent ismertetett *in vivo* végpont, a sunburn-sejtek kialakulása szempontjából mely faktorok játszanak meghatározó szerepet. A sejtciklus regulációjában aktívan résztvevő ciklin-dependens kináz inhibitor esetén észleltük, hogy a Trp53-mediálta apoptózis szempontjából elvesztésük nem meghatározó, egyes adatok nem is kerültek közlésre, pl. a p21^{Cip1/Waf1} és a p27^{Kip1} esetén. A negatív eredmény is hozzájárult azonban, hogy a sejtciklus leállítása és az apoptózis indukció valamelyest disszociáltan működik, de számos meghatározó közös elem is felismerésre került. Ezek közül talán a legfontosabbak egyike az E2F1 transzkripció faktor. Hasonlóan a korábbi vizsgálatokhoz az egerek apoptózis-készségét olyan módon vizsgáltuk, hogy egyszeri UVB dózissal sugaraztuk be őket, majd 24 óra elteltével eutanázián estek át az állatok.

A sunburn-sejt képződést vizsgálva észleltük, hogy az E2F1 knockout állatok az apoptózis-készség tekintetében a vad típusnál is kifejezettebb reakciót mutatnak, azaz nagyobb számban voltak sunburn-sejtek megtalálhatóak a hámokban.

A kísérlet eredménye valamelyest meglepetést hozott, hiszen az E2F1 apoptózis-indukáló képességére voltak irodalmi adatok, elvesztése tehát inkább a p53 elvesztéséhez hasonló módon viselkedett volna, azaz kisebb számban vártuk sunburn-sejtek képződését. Az eredményt olyan módon is sikerült reprodukálni, hogy az epidermiszben E2F1-et fokozottan expresszáló egérmodellt vizsgáltunk. Itt egy K5 promoterral hajtva az állatok hámja az E2F1-et nagyobb mennyiségben fejezi ki, így a knockout állatok inverzének tekinthetők. UVB-sugárzás után ezen állatok hámjában szignifikánsan csökkent apoptózis-választ észleltünk a vad típussal összevetve.

Ennek az észlelésnek a birtokában a fokozott apoptózis-készség hátterének a vizsgálatára egy olyan kettős knockout törzs létrehozását céloztuk meg, amely mind az E2F1, mind a Trp53 génre nézve homozigóta null genotípusú. Ennek a kísérletnek már azt is egy hozadékanak tekintettük, hogy két fontos, a sejtek működésében alapvetően meghatározó transzkripciós faktor elvesztése egyáltalán összeegyeztethető-e az élettel, azaz életképes állatok születnek-e? A két törzs keresztezésénél fontos szempont volt, hogy alapvetően azonos, C57/Bl6 egértörzset használjunk, mivel az egyes beltenyésztett egértörzsek között markáns különbségek lehetnek. A kísérlet egyértelműen megmutatta, hogy ilyen állatok létrehozása lehetséges, sőt a tenyésztés egyszerűsége pozitív meglepetésként ért minket, ismerve a Trp53 egerek pároztatásának nehézségeit, amelyeket alább részletesen ismertetek. A knockout állatok születéskor egészségesnek tűntek, fenotípusukban nem mutattak különbséget a vad típusú újszülött egerekhez képest, az egereket megvizsgálva nem lehetett megkülönböztetni a vad típust a homozigóta knockout egerektől. A genotípus PCR alapú többszörös kontrollja után a korábbival teljesen megegyező módon, 6-8 hetes egereken végeztük el az UVB besugárzást minden körülmény teljesen identikus reprodukciója mellett.

Az eredmények azt mutatták, hogy az E2F1/Trp53 dupla knockout egerek apoptózis-készsége lényegében megegyezik az egyszeres E2F1 knockout egerekével, hasonlóan emelkedett jellegzet mutat. Ez mindenképpen figyelemreméltó eredmény, hiszen a Trp53 apoptózisra gyakorolt meghatározó szerepének mondott ellen.

Elmondható tehát, hogy dupla knockout egereken (Trp53^{-/-}E2F1^{-/-}) nem érvényesül a Trp53 hiánya a sunburn-sejt képződésben, sokkal inkább az E2F1 KO egerekre jellemző jellegzetes dózis – sunburn-sejtszám görbét látjuk. Úgy tűnik, hogy a molekuláris mechanizmusok aláfölrendeltségi viszonyában a E2F1 inaktiválása felülírja a Trp53 elvesztése után észlelhető apoptózis rezisztenciáját. Hipotézisünk szerint az apoptózis indukció folyamatában a Trp53 funkcionálisan az E2F1 fölött áll. Fibroblasztokon végzett kísérletek során azt észleltük, hogy kettős KO fibroblasztokban az E2F1-et visszatranszfektálva gátolni tudjuk az UV-indukálta apoptózist. Az *in vivo* eredményeket munkacsoportunk további kísérletekkel is megerősítette *in vitro* transzfekciós vizsgálatokkal. Az eredmények azt mutatták, hogy az E2F1 transzkripciós faktor, a Trp53 tumorsuppresszor gén és utóbbi szabályozójaként az Mdm2-Arf egymással komplex viszonyrendszerben állnak. Egyik legfontosabb megállapításként észlelhető volt, hogy az E2F1 apoptózis szuppresszor funkciója jelen van a sejtciklus-regulatorikus szerepe mellett.

A fent leírt folyamatok mélyebb megértésének fontos eleme, hogy az *in vivo* kísérletes eredményeinket alátámasztják-e az egerek tumorképződésének és egyéb fiziológiás funkcióinak az alakulása. E célból az állatokat hosszú távú megfigyelés alatt tartottuk, majd az észlelt elhullást rögzítettük. Az egerek túlélését vizsgálva igazolást nyer, hogy az E2F1 hiányában a p53^{-/-} egerekre jellemző korai tumorképződés szintén eltűnik. A Trp53 knockout egereken az esetek több mint háromnegyedében lymphomák, ill. lágyrész sarcomák kialakulására lehet számítani, ami miatt az átlagos túlélésük 6-8 hónap. Ezzel szemben látható, hogy ezen időpillanatban a Trp53^{-/-};E2F1^{-/-} egerek többsége még életben van. Ez mindenképpen azt mutatja, hogy a Trp53 elvesztésével járó apoptózis-készség deficiencia az E2F1 egyidejű kiiktatásával felülírható. Az egerek hosszú távú életben tartásának másik fontos hozadéka is volt, mivel alkalmunk volt megfigyelni a tenyésztés során a született utódok ivararányát. A Trp53 knockout egerekre jellemző ugyanis, hogy a hím:nőstény arány jelentősen eltolódott az előbbieik javára. A Trp53^{-/-};E2f1^{-/-} dupla knockout

egereknél az utódok a vad típushoz hasonló kiegyensúlyozott, 1:1 hím:nőstény arányban jöttek a világra.

Összegezve tehát levonható az a következtetés, hogy a Trp53 elvesztésével együtt járó, egyéb – nem pontosan ismert mechanizmusú – funkcióváltozásai is jelentős fokban visszafordíthatóak az E2F1 egyidejű kiiktatásával. Ez tehát annak bizonyítéka, hogy az általunk leírt jelenség szélesebb biológiai értelemben is változást hoz a kísérleti állatok szervezetében.

A Trp53 elvesztésével járó változásoknak a visszafordítása az E2F1 egyidejű kiiktatásával onkológiai szempontból jelentős eredménynek tekinthető. A tumorok jelentős része rendelkezik p53 mutációval, amely immunhisztokémiával is kimutatható, és a tumor prognózisa szempontjából komoly jelentőséggel bír. Az apoptózist indukáló terápiás ágensek hatástalanságáért vagy terápia során fellépő hatásvesztéséért a tumorsejtekben kialakuló mutáns p53 is felelős. Ha egy másik fehérje, mint jelen esetben az E2F1 transzkripciós faktor inaktiválása a sejteket ismételten képessé teszi az apoptózisra, akkor ez terápiás konzekvenciájú is lehet. Jelenleg is folynak terápiás célú vizsgálatok a p53 funkciójának visszaállítására a többszörös gyógyszer-rezisztencia (multi drug resistance) kivédésére hasonló logika szerint.

3. Trp53 mutáns klónok időbeli és térbeli dinamikájának vizsgálata krónikus UVB besugárzás mellett

A daganatok kialakulása szempontjából a klonális expanzió kritikus lépés. A mutációk általában a szervezetben 10^{-5} – 10^{-3} gén/sejt gyakorisággal képződnek, azaz a mindennapokban is folyamatosan számíthatunk mutációk kialakulására. Ahhoz, hogy ezekből az egyes sejtekből makroszkopikusan is látható, klinikailag detektálható méretű tumorok alakuljanak ki, egy sor lépésnek kell történni, amelyek közül ma csak relatíve keveset ismerünk. A korábbi vizsgálatokkal igazolni lehetett, hogy az emberi bőr napnak kitett bőrfelületei olyan p53 pozitív sejtcsoportokkal, klónokkal vannak teleszórva, amelyek potenciálisan később daganatok kiindulási forrásai lehetnek. Ezeket a klónokat egérbőrben is meg lehet találni UVB besugárzás után. Ezzel együtt az a dinamika, amellyel ezek a sejtcsoportok aztán nagyobbá válnak, teljességgel ismeretlenek voltak. Munkánk során célul tűztük ki, hogy heteken át krónikusan UVB sugárzással kezelt egerekben tanulmányozzuk a klónképződésnek a dinamikáját. Ehhez C57/BL6-os egértörzset használtunk, amelyet rendszeresen borotváltunk és hetente 5 alkalommal besugarasztunk.

Munkánk első lépéseként egérbőrre is kidolgoztunk egy olyan módszert, hogy úgynevezett epidermális lemezeket (epidermal sheet) tudtunk leválasztani az egerek egyben eltávolított hátbőréről. Ezzel a módszerrel azonban nem keresztmetszeti képen tudtuk vizsgálni ezeket a sejtcsoportokat, hanem az egér hátbőrét mintegy felülnézetből szemlélve volt alkalmunk a sejtcsoportok horizontális terjedését is vizsgálni. A p53 pozitivitást immunhisztokémiai módszerrel tudtuk igazolni, majd az immunhisztokémiai reakció után készült preparátumokat fénymikroszkóppal lehetett vizsgálni. A kialakult sejtcsoportokat fénymikroszkóp alatt lehetett számolni, majd a számolás eredményeit az egér hátbőrén 10 négyzetcentiméterre vetítve adtuk meg. A naponkénti UV besugárzás eredményeképpen 3–5 hét elteltével megjelentek azok a p53 pozitívan festődő, mutáns p53-at tartalmazó keratinocita csoportok, amelyek később aztán mind méretükben, mind számosságukban növekedést mutattak. Kezdetben a p53 pozitív sejtcsoportok néhány sejt méretűek voltak, majd méretük akár a több ezer sejt méretig is megnőtt. Észleltük, hogy a besugárzás 3., 5., 8. majd 10. hetében a kialakult sejtcsoportoknak, klónoknak a mérete is növekszik, illetve észlelhető egy arányeltolódás a nagyobb számú sejtől álló klónok irányába. A vizsgálatok során nem csak a 10 négyzetcentiméterenként észlelhető klónok számát, hanem az általuk elfoglalt területet is mérhetővé tudtuk tenni.

Azt is igazoltuk, hogy az így kialakuló sejtcsoportok, amelyek p53 immunhisztokémiával pozitív reakciót mutatnak, valójában tartalmazzák a p53 mutációt. Ennek igazolására egyes epidermális lemezekben a p53 immunhisztokémiai reakció után az azonosított klón sejtjeiből mikrodisszekciós technikával DNS-t nyertünk, majd ezeket a DNS mintákat PCR-rel amplifikáltuk. A PCR után a mintákat szekvenáltuk keresve a p53-ra jellemző típusos UV-indukált „hotspot” mutációkat. Az

alábbi táblázatban mutatjuk be az igazított mutációkat, amelyek dominálón C-T mutációk voltak, azaz az UV-hatásra jellemző típust mutatták.

A klónok négyzetcentiméterenkénti száma és az egyes klónok mérete a besugárzás időtartamával arányosan növekedett, azonban kíváncsiak voltunk a besugárzás befejezése után történetekre is. Így aztán az UV-sugárzást felfüggesztettük az állatok egy csoportjánál az ötödik kezelési hét után, míg egy másik csoportnál folytattuk a kezeléseket. Az ábrán jelölt időpontokban terminálva az egyes állatokat, vizsgáltuk a kialakult viszonyokat, ami a klónok méretét és a klónok számát illeti. Érdekességgént tapasztaltuk, hogy a klónok gyakorisága, 10 cm^2 -i száma csökkent, de a klónok által elfoglalt terület átlagos mérete nem változott. A klónok időbeli változását követve észlelhető volt, hogy számos klón eltűnt, de amelyek megmaradtak, azok mérete nem változott. A fennmaradt klónokat közelről megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a sejtsűrűség ezekben a sejtcsoportokban a korábbihoz képest nagyobb lett, azaz a sejtek szaporodása észlelhető volt, de mintha nem tudtak volna kitörni egy adott területű „börtönből”. Innen származtattuk az elnevezést: bebörtönzött (imprisoned) klónok. Fenti megfigyelés mellett az egy klónt alkotó sejteket is megszámloltuk, így az adatok statisztikai analízisét is el tudtuk végezni. A számokat átnézve világossá vált, hogy a klónokat alkotó sejtek száma egyfajta periodicitást mutat.

Az első pillanatra feltűnő periodicitást statisztikailag is verifikálni lehetett, oly módon, hogy a 12-16 közötti sejtszám és annak többszöröse fordult elő leggyakrabban. Ez, annak az elfogadott ténynek az ismeretében, hogy az egérbőr epidermális proliferációs egységekből (EPU) áll, amelyeket 12-14 sejtmaggal rendelkező sejt alkot, értelmet nyer.

Igazolható volt tehát, hogy az UVB hatására a klónok egy-egy ilyen epidermális proliferációs egységnyi mérettel, azaz 12-16 sejttel tudnak leginkább növekedni. A folyamatos UVB szükséges volt ahhoz, hogy a klónok növekedjenek, az UV kikapcsolása után azonban a klónok jelentős része regrediál. A megmaradó klónok viselkedése is megváltozik, mert ilyenkor a terület nem növekszik, csak az egy adott területre zsúfolt keratinociták szaporodnak, ezáltal nagy sejtsűrűségű klónok jönnek létre.

Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a folyamatos UV besugárzás alatt a klónok folyamatosan növekednek. Mind az egy klónt alkotó sejtek száma gyarapszik, mind az általuk elfoglalt terület növekszik. A növekedés azonban nem lineáris, hanem 12-16 sejt közötti ugrásokkal történik, mivel a növekvő klón egy szomszédos EPU inváziója révén tud terjeszkedni. Ehhez a környező EPU-k inváziójához az UVB folyamatos jelenléte szükséges, ennek hatásaként képes egy mutációt tartalmazó sejtcsoport „elfoglalni” egy újabb EPU-t. Ehhez természetesen a környező keratinociták permisszív jellege is szükségeltetik. Mivel nem létezik fizikai barrier az egyes EPU-k között, így Trp53 mutáns KC klónok növekedésében a környező sejteknek is meghatározó a szerepe. Ez a felismerés jelentősen hozzátesz a többlépcsős karcinogenitásról alkotott modellhez, hiszen az UV-sugárzás nem csak a mutáció iniciációjával, ill. promóciójával járul hozzá a daganatok kialakulásához, hanem az egyes epidermális proliferációs egységek tumorsejtek általi elfoglalásában is kiemelt szereppel bír. Nyilvánvalóan a Trp53 mutáció nem egyedüli elemként játszik szerepet egy daganat kialakulásában, de ezek a mutáns Trp53-at tartalmazó keratinociták csökkent apoptózis-készségük révén pozitív szelekció alatt állnak, növekedésükben előnnyel bírnak az ép sejtekhez képest, így nagyobb eséllyel akvirálnak további mutációkat is. A növekedés dinamikája nem lineáris, hanem egy-egy EPU elfoglalása gyorsan történik, majd egy újabb EPU-ba történő expanzió ismét hosszabb időt vesz igénybe. A prekancerózus sejtcsoport nem egyszerűen egyenként, sejtenként halad, hanem a környező sejtek kiszorításával, egy-egy epidermális egység annektálásával ugrásszerűen történik.

4. Az antigén-specifikus immunitásnak nincs hatása az UVB-indukálta p53-mutáns klónok keletkezésére és akut regressziójára

Az immunrendszer és a daganatok között egy igen komplex kapcsolat áll fenn, amelynek számos klinikai aspektusa ismert egyebek mellett a transzplantációkhoz társuló fokozott daganatképzési hajlam, konkrétan a spinalioma incidenciájának az emelkedésében. Az ultraibolya sugárzás immunrendszerre gátló hatással van, tehát önmagában is immunszuppresszív. A klinikai

gyakorlatban ezt a hatást jól ismerjük és a különböző fototerápiás beavatkozásaink során ki is használjuk a páciensek kezelésére. A UV-sugárzás immunrendszere gyakorolt negatív hatásairól már a '70-es években születtek közlemények, felismerték, hogy az UVB hatására keletkező daganatok önmagukban immunogének, és az UVB besugárzás immunszuppresszív. Az immunszuppresszió elsődlegesen az adaptív immunitást érinti.

Ezen felismerések alapján kézenfekvőnek látszott, hogy az általunk kidolgozott korai, néhány száz- néhány ezer-sejtes állapotban észlelhető klónok kialakulásának a dinamikájában is vizsgáljuk az immunrendszer szerepét. Ehhez az előző vizsgálat sorozatban alkalmazott besugárzási eljárást követtük, a kísérleteket azonban kombinált immundeficiens egereken (RAG1-/-) és a megfelelő vad típusú kontrollokon végeztük. Ezen egerek esetén a V(D)J rekombinációs aktivitási gén RAG-1 kerül inaktiválásra, aminek eredményeképpen az egerek szervezete nem tartalmaz érett B és T-sejteket.

Állatainkat a korábbi kísérletes rendszerben beállított paraméterek szerint kezeltük heti 5 alkalommal besugározva őket 750J/m² UVB-vel. A kísérlet 7-ik, 9-ik és 11-ik hete után választottuk le az eutanázia után az egerek hátbőrét epidermális lemez formájában, majd p53 immunhisztokémiai reakcióval tettük láthatóvá a p53 mutációt tartalmazó sejtcsoportokat, a klónokat. Hasonlóan a C57/Bl6 egereken végzett kísérletben tapasztaltakhoz, az UV-kezelésben eltöltött idő függvényében több-kevesebb mikroszkopikus p53 mutáns klón volt kimutatható. A klónok mindkét genotípusban, a RAG-1 knockout és a vad típusban is hasonló megjelentést mutattak. A bennük kialakult p53 mutációt mikrodisszekciót követően elvégzett PCR és direkt szekvenálással mutattuk ki. A klónok 92 százalékában az UV-hatásra jellegzetes (C→T) kézjegy mutációt találtuk és a hot-spotként ismert 270-es kodont halmozottan érintette.

A hosszabb besugárzási idő nagyobb klónokat eredményezett mind a két törzsben. Statisztikailag szignifikáns különbség nem volt észlelhető a veleszületetten immunhiányos és a vad típusú egerek esetén. Ennek alapján arra következtettünk, hogy az adaptív immunitásnak elhanyagolható szerepe van a klónok növekedésének dinamikájára. Ha feltételezzük, hogy az adaptív immunitás észleli a preklinikai állapotú p53 pozitív klónokat, akkor annak elvesztésekor gyorsabban megjelenő, nagyobb gyakoriságú és nagyobb méretű klónt kellene látnunk adott egér hátbőr felszínre vetítve.

Az adaptív immunitásnak esetleg a klónok képződésében nincsen jelentős gátló szerepe, de felmerül a lehetősége annak, hogy esetleg a klónok regresszióján keresztül mégis hatást gyakorol a klónok létrejöttében. Ennek eldöntésére azt a kísérletet reprodukáltuk, amikor a klónokat heti ötszöri UVB besugárzással előállítottuk, majd az UVB kezeléseket felfüggesztettük és az állatoknál a regresszió dinamikáját vizsgáltuk. Az UV besugárzás felfüggesztését követően a klónok száma mind a vad, mind a RAG-1 knock-out egerek esetén hasonló dinamikával csökkent, a két genotípus között nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni.

Az UV ártalmas hatásai elleni védekezés az epidermisz megvastagodása, a hámphiperplázia. A dinamikájára az jellemző, hogy már 48 órával az egyszeri UV-hatás után megindul a hiperplázia, 96h-nál eléri a maximumot és lassan regressziónak indul. Ismétlődő UV-hatás mellett a hiperplázia fennmarad és csak az UV-hatás elhagyása után alakul vissza a hám normál vastagságúvá. Emiatt kellett kizárni a lehetőségét, hogy a RAG-1 és a vad típusú egerek epidermiszében létrejövő hiperplázia véd a mikroszkopikus tumorok képződése ellen. Az epidermisz krónikus UV hatásra mindkét állattípusban megvastagodott, és a különbség köztük nem volt statisztikailag szignifikáns. A hámphiperplázia a 7. héten elérte maximumát, majd az UV-sugárzás befejezése után 2 héttel a hám vastagsága csaknem teljesen visszatért a besugárzás előtti szintre vad típusú és a RAG1-/- állatban egyaránt.

Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a tumorok keletkezésének korai szakaszában, amikor a potenciális daganatok még csak néhány száz, néhány ezer sejtből állnak, az adaptív immunitásnak nincsen protektív hatása a daganat-előalakok kialakulása szempontjából.

5. A hypoxia válasz szerepének vizsgálata HaCaT keratinocitákon UVB besugárzást követően

A szervezetben a sejtek és szövetek homeosztázisának fenntartásában nagy jelentőséggel bír az alacsony oxigénkoncentrációhoz való alkalmazkodás. A bőrben a hypoxia számos patológiás történés kapcsán bír jelentőséggel. A teljesség igénye nélkül ezek a folyamatok kiterjednek a dermisz és az epidermisz és epidermális degeneratív folyamataira, a gyulladás, a fotoaging, illetve a daganatok kialakulásának folyamatára is. A tumorok oxigénigényesek, a növekedésükben, de kialakulásukban is szerepet játszanak azok a válaszútvonalak, amelyek a hypoxiás állapothoz való alkalmazkodásnak is kulcselemei. Ezek közül legfontosabb a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF). Fenti folyamatokban a VEGF központi szerepet játszik és egyben jól ismert a VEGF UV-fény által való indukálhatósága. A hypoxia indukálható faktor-1 (HIF1) szorosan felügyeli a VEGF expresszióját különböző kísérleti körülmények között. Munkánk során azt a célt tűztük ki, hogy vizsgáljuk az UVB hatását a HIF1 két alegysége közül a transzkripcionális reguláció alatt álló HIF1alfa szintjére, mint a hypoxia által indukált gének központi regulátorára. A HIF1 alfa expressziója vizsgálatához HaCaT sejteket használtunk, amelyeket adott dózisú UV-val besugározva kezeltünk, majd a sejteket leszüreteltük és Western-blottal határoztuk meg a HIF-1alfa protein szintű változását.

Azt figyeltük meg, hogy az UVB hatására kezdetben egy markáns HIF1 alfa szint csökkenés jelentkezett, ami azután egy gyors emelkedési fázisban folytatódott. Az UVB kezelés után 5 perccel még jelentős fehérjeszint gyors csökkenésnek indul, 1, 3 és 6 órával a besugárzást követően a HIF-1alfa protein szintje a kezdeti értékhez képest jelentősen lecsökkent, egy csaknem alig detektálható szintet ért el a 6 órás minimumnál. Ezután azonban egy jelentős emelkedés volt észlelhető, 12 órával a kezdeti besugárzást követően már a kiindulási szinthez képest is markánsan emelkedett fehérjeszintet észleltünk. A HIF-1alfa szintje ezt követően magas maradt, bár a 24 órás időpontban már valamelyest a 12 órás érték alá esett.

A HIF-1alfa hatás dóziszfüggését 6,7 – 50 mJ/cm² közötti UVB dózisok használatával vizsgáltuk. A legmarkánsabb szintcsökkenés az 50 mJ/cm²-es besugárzás után volt észlelhető, azonban a második lépésként észlelt emelkedés nem következett be, ami vélhetően a túlságosan magas besugárzás dózisa miatt és a következményeképpen kialakuló sejtelhalásnak volt köszönhető. Legjobb kompromisszumnak végül 20 mJ/cm² dózis alkalmazását találtuk. Ez az UV-dózis más mérések tanúsága szerint megegyezik a bazális keratinociták napfény expozíció során elszenvedett dóziséval *in vivo*.

Ha a sejteket egy ismételt UVB besugárzással kezeltük, akkor a kezdeti HIF 1 alfa csökkenés újra előidézhető volt, hasonlóan az első besugárzáshoz.

A HIF1 alfa protein szintű változásával párhuzamban real-time kvantitatív PCR-rel tanulmányoztuk a VEGF és a HO-1 mRNS szintű expressziójának változását. Mindkét tanulmányozott gén jól ismert targetje a HIF1alfának, és mindkettő érzékenyen reagál a környezeti hypoxia kialakulására. Ezzel párhuzamban tanulmányoztuk a HIF-1alfa mRNS szintű változásait is béta-aktinra normalizálva a mért értékeket. Az UVB kezelés hatására VEGF a 3 órás időpontnál szignifikáns csökkentést mutatott, míg a HO-1 mRNS szintje már ezen időpillanatban is emelkedni kezdett. A 12 és 24 órás értékek mindkét gén esetén szignifikáns emelkedést mutattak valamelyest eltérő dinamikával. A fentebb leírt HIF-1alfa proteinszintű csökkenése 3 – 6 órával a besugárzást követően mRNS szinten is észlelhető volt, de a 12 és 24h-s mérések is szignifikánsan csökkent szintet mutattak.

Korábbi vizsgálatokkal igazolták, hogy a PI3K szabályozása egy fontos pozitív regulátora a HIF-1 alfának különböző modellekben, illetve az UV besugárzásról leírták, hogy PI3K szintjének emelkedésével jár együtt. Emiatt aztán kísérleteinkben wortmannin alkalmazását kezdtük el, amely egy ismert specifikus PI3K enzim inhibitor. A kísérletekben a sejtszuspenzióhoz közvetlen az UV besugárzás után wortmannint adtunk, majd a korábban leírt módon a sejteket 3, 12 és 24 óra elteltével leszüreteltük. Western-blottal vizsgáltuk a wortmannin gátló hatását a HIF-1alfa protein szintjére. A wortmannin hozzáadása felemás eredményt mutatott, mivel nem védte ki a 3 óránál észlelt szintcsökkenést, de az utána jelentkező 12 óránál várható szintemelkedés nem következett be.

de 274.11
Vizsgálataink szerint a PI3K, AKT útvonala játszik ebben a történésben központi szerepet. Az AKT teljes szintjében nem volt érdemi változás észrevehető, azonban a foszforiláció szintje változott. Ezekkel a megfigyelésünkkel összhangban a wortmannin, a PI3 kináz inhibitora hatékonyan gátolta az UVB kiváltotta HIF1 alfa emelkedését.

Következtetésül levonhatjuk, hogy a HIF-1 alfa expresszió központi szerepet játszik a VEGF szabályozásában UVB hatására. Emellett az AKT útvonala szerepét is igazoljuk ebben a folyamatban.

6. A keratinocita differenciációt fokozó új szfingolipid derivátumok azonosítása

A bevezetésben részleteztük a szfingolipidek szerepét a sejtek homeosztázisában és keratinociták differenciációjának a szabályozásában. A szfingolipidek adják a stratum corneum lipidjeinek felét, és ezek döntő többsége ceramid. A nem-korneocitához kötött ceramidoknak 9 fő osztálya ismert, míg a kovalensen kötött ceramidokat négy osztályba soroljuk. Főként ez utóbbiak azok, amelyek nemcsak építőelemként működnek, hanem sejtfunkciók szabályozásában is részt vesznek. A ceramidok és az apoptózis összefüggésének további érdekessége, hogy ebben a folyamatban a p53 is meghatározó szerepet játszik.

Munkánk során egy konfluencia-indukálta differenciációs modellben vizsgáltuk normál humán keratinociták viselkedését pro- és anti-differenciációs anyagok hozzáadása után.

A kísérletekben szfingozin, szfinganin, és ezek hexanoil, sztearoil, és szalicil derivatívumait vizsgáltuk C12-alkilamin-szalicilát, szalicilát, D3-vitamin, és retinol társaságában.

Elsőként citotoxicitási vizsgálatokat végeztünk ezekkel az anyagokkal az optimális tenyésztési körülmények meghatározására, majd teljes genom expressziós változásokat vizsgáltunk DNS mikromatrix segítségével a nulladik, első és negyedik napon.

A kísérleti anyagok közül öt volt kifejezetten hatékony indukálója a keratinocita differenciációnak, míg a C12-alkilamin-szalicilát igen erőteljes differenciáció gátlásra volt képes. ExPlain szoftverrel történő analízissel eltérő szabályozási profilt találtunk a számított transzkripcionális hálózatban a szfingoid bázisok, és azok -C6 és szalicilát derivátumai között, ami arra utal, hogy vegyületek hatékonyság-változása a kovalensen kötődő szaliciláthoz köthető.

Vizsgáltuk az mRNS expressziót a négy beállított keratinocita differenciációs markerrel (transzsglutamináz 1, filaggrin, keratin 10, és korneodezmozin), amiket négy nap után erőteljesen upreguláltak találtuk. Retinol, lévén ismert keratinocita differenciációt gátló ágens, megakadályozta a transzsglutamináz 1, filaggrin, keratin 10, és korneodezmozin indukcióját. Míg a kalciferol, egy ismert differenciációt indukáló ágens, fokozta az ezeknek a differenciációs markerek géneknek az expresszióját a kontrollokhoz képest. Az irodalom átnézésekor 150 keratinocita-differenciáció függő gént azonosítottunk, ezeket vizsgálva 53 esetén találtunk legalább 1,9-szeres változást 4 nappal a differenciáció indukciója után. Ebből az 53 génből mindösszesen kettőt találtunk leszabályozva és 51-et felszabályozva a konfluencia-indukálta keratinocita differenciáció kapcsán. Ennek az 53 génnek az expressziós szintje aztán további vizsgálatra került, vagy kontroll-, vagy szfingolipid-vegyület kezeléssel.

A retinol és a D3-vitamin egyértelműen a tőlük elvárható módon csökkentette, ill. fokozta a differenciáció-függő gének expresszióját. A génexpressziós változások mértani közepe az első és negyedik napon a retinol hatására 29,38%-os ($P=0,0995$) és 59,04% ($P<0,0001$) csökkentést mutatott. Ezzel szemben a D-vitamin kezelés emelkedett differenciációs változásokban nyilvánult meg, az első napnál 13,76% ($P=0,015$), a negyedik napnál 19,77% ($P<0,001$) értékekkel.

Ha a keratinocita differenciáció folyamatát különböző anyagokkal befolyásolni tudjuk, annak egyértelmű bőrgyógyászati és kozmetológiai jelentősége van. Abból a célból, hogy hatékonyan vizsgálhassuk különböző anyagok differenciációra kifejtett hatását, egy megfelelő tesztrendszerre volt és van szükség. Ehhez alkalmas modell a keratinociták kontakt gátlásakor beinduló konfluencia-indukálta differenciáció, mint általános értékű experimentális modell. A szfingolipidek - ismereteink szerint - a keratinocita differenciáció szabályozásának első fázisában bírnak jelentőséggel. Az első fázis körülbelül négy napig tart, ezáltal tehát a konfluencia-indukálta keratinocita differenciáció modellt választottuk ezeknek az anyagoknak a differenciációra kifejtett hatását tanulmányozni. Számos publikációban vizsgálták a keratinocita differenciációban résztvevő

dc_274_11
géneket, tanulmányozva, hogy azok pro-, vagy anti-differenciációs hatással bírnak-e, esetenként azonban nem lehetett kvantitatív módon összevetni különböző vizsgálati anyagok hatását. A microarray kísérleteink azonban egyértelműen igazolták a modell használhatóságát az expressziós szintek megítélésében különböző gének esetén nagy pontossággal, s emellett egy kombinált analízis is rendelkezésre állhat a különböző differenciációs gének között.

7. A teljes genom transzkripcionális profil analízis módszerével új keratinocita differenciációban résztvevő géneket azonosítottunk

Az epidermális barrier kialakulása szempontjából a keratinocita differenciáció kritikus szerepet játszik. Ez a folyamat elengedhetetlen a bőr fizikai barrierjének kiépüléséhez, azonban ez egy nagyon komplex folyamat, sok eltérő elem, fehérjék, lipidek összehangolt szintézise és mozgatása szükséges hozzá. Emiatt ennek a folyamatnak a zavara számos gyakori bőrbetegség esetén jelent patogenetikai tényezőt. A lakosság 2-3%-át érintő psoriasis és a közel ilyen gyakori atópiás dermatitis is ezen betegségek közé tartozik, de ritka genetikai betegségek, mint az ichthyosis csoport tagjai, is emiatt alakulnak ki.

A keratinocita differenciációban résztvevő gének ismerete ezen betegségek jövőbeli kezelése szempontjából elengedhetetlenül fontos. Bár egyes betegségekben, pl. a psoriasisban a keratinocita differenciációs géneket már vizsgálták, azonban számos alkotóeleme ennek az útvonalnak még ismeretlen. Mi egy szélesebb merítést alkalmaztunk, teljes genom génexpressziós profil analízis módszert használtunk, microarray technikával tenyésztett normál humán keratinocitákon vizsgáltuk a konfluencia indukálta differenciációt a célból, hogy új, a differenciációhoz társuló géneket találjunk.

A génexpresszió analízis a konfluencia indukált differenciációban normál humán keratinociták esetén 932 fel- és 629 leszabályozott gént talált. BiNGO analízis alá vonva a legalább 2,5-szeres változást mutató géneket, azt találtunk, hogy az epidermális differenciációhoz társuló gének jelentősen felülreprezentálva voltak. Ezzel gyakorlatilag belső kontrollként igazolva láttuk a rendszer alkalmasságát keratinocita gének expressziójának vizsgálatára.

További megerősítésként szolgált az az összehasonlítás, mikor psoriasisban észlelt génexpressziós változásokkal hasonlítottuk össze a mi listánkat, hiszen a psoriasis ismerten a keratinocita differenciáció zavarával járó folyamat. Az ott közölt adatokat tekintettük át újra és hasonlítottuk össze keratinocita differenciáció génlistával. Mivel általában a pozitív választ hozó kísérletek kerülnek közlésre, az ontológiai fogalmak direkt módon nem tudnak elegendő bizonyítékot szolgáltatni a leszabályozott génváltozások validitásáról, hasonlóképpen a housekeeping gének listája sem feltétlenül tartalmazza őket. A psoriasisban ismerten a keratinocita differenciáció zavarával jár együtt, így a psoriasis vizsgálata során észlelt génexpresszió változások adatai jól használhatóak voltak. Az adatok a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisból származtak. A GDS2518 számú kísérlet adatai voltak ismételten feldolgozva a microarray szignifikancia analízis (SAM) szoftverrel. Ha kétszeres változást és 0% hamis azonosítás paramétereket használtunk, 477 fel és 732 leszabályozott gén volt azonosítható a lezionális és psoriasis által nem érintett bőrminták között. Ezeket a génlistákat a konfluencia-indukálta keratinocita differenciációs gének listájával tudtuk egybevetni. Mindkét listán felülreprezentálva szerepeltek a keratinocita differenciációs gének ontológiai csoportjai. Nem volt meglepetés, hogy az upregulálódott keratinocita konfluencia-indukálta differenciációs génlista elemi szintén túlnyomó többségben jelen voltak a psoriasisban változó gének listáján is ($p < 0,0001$).

Emellett szignifikánsan felülreprezentáltak voltak a ($p < 0,001$) a downregulált keratinocita probe-ok, a psoriasis listán szereplőkkel összevetve. Ezzel a kontroll rendszerrel a keratinocita downregulált génlista is validálhatóvá vált.

Annak megállapítására, hogy a konfluencia-indukálta differenciációs modell valójában képes volt új keratinocita génexpressziókat megtalálni, 12 újonnan azonosított gén elemzését végeztük egy hosszabb kísérletben. Ekkor 10 napig kalcium hozzáadásával indukáltunk a hámsejtek differenciációt és 12 potenciálisan jelentős gént valamint 3 kontroll gént (peptidáz inhibitor-3, transzglutamináz-1 és dermokin) vizsgáltunk. Első lépésként Normfinder analízissel megkerestük a

normalizáláshoz legalkalmasabb housekeeping géneket. A real-time kvantitatív PCR mérések szerint ezek a béta-glükoronidáz, és a szukcinát dehidrogenáz komplex A alegysége voltak.

Ezután a 12 teszt és 3 kontroll gént vizsgáltunk Ca^{2+} -indukálta differenciációs modellben, a vizsgált 12-ből nyolcat, a szerin-peptidáz inhibitor, Kazal type 7, RNF39, Plakophilin 3 (PKP3), hemoxigenáz-1 (HMOX1), ICEBERG, forkhead box Q1 (FOXQ1), Glutaredoxin (GLRX), ELMO / CED-12 domain containing 1 géneket jelentősen upreguláltak találtuk.

Kereskedelmi forgalomban a 8 gén terméke közül 4 ellen volt antitest elérhető (plakophilin 3, hemoxigenáz 1 (HMOX1), forkhead box Q1, glutaredoxin (GLRX)), így ezekkel végeztük el az immunhisztokémiai vizsgálatot. Az eredmények azt igazolták, hogy mind a négy antitesttel kimutatható volt a differenciációhoz köthető gének fokozott expressziója protein szinten. Az egyes festődések között jelentős eltéréseket lehetett észlelni, de a kvantitatív PCR és az immunhisztokémia együtt nagy biztonsággal megerősítette a teljes genom transzkripció profilanalízis kísérletünk élettani jelentőségét.

Az újonnan azonosított gének közül néhányat regulációs útvonalakat feltérképezésére próbáltunk felhasználni. A HMOX1 meghatározó enzim a hem-degradáció folyamatának sebességében, segítségével a biliverdin gyorsan bilirubinná redukálódik a szövetekben. A biliverdin reduktáz mellett a flavin reduktáz az a másik alternatív enzim, amely képes a biliverdin átalakulását katalizálni. A hámban mindkettőt downreguláltak találtuk a differenciáció során, amely arra utalt, hogy a hámban alacsony a biliverdin redukciója bilirubinná.

Ezt megmagyarázza a biliverdin UV-fogékonysága, amely miatt lehet szükséges az epidermiszben alternatív expressziót kialakítani a szervezetnek.

A másik példa a glutaredoxin (GLRX), amely ismereteink szerint kettős szereppel bír. Mivel kofaktora a glutation, így egyrészt katalizálja a diszulfidhidak redukcióját fehérjében cserébe a glutation – glutation-diszulfiddá konvertálásáért. Az enzim szintén felelős a fehérje thiolok deglutationizációért, amelyben egy cisztein aminosav jelenlétére van szükség.

Keratinocita differenciáció során a glutaredoxin downregulált, amit úgy magyarázunk, hogy a bőrben kedvezőbb az alacsony glutation/glutathiondiszulfid arány, amely a bőr szulfhidril-oxidáz működését segíti.

Az ICEBERG jelentős upregulációja, amely a kaszpáz-1 (IL-1 béta konvertáló enzim) inhibitora, felhívta a figyelmet az IL-1 jelátvitel downregulációjának jelenlétére a differenciáció során, amelyre korábban nem volt adat.

Az IL-1 szignálgének között szereplő további elemeket is vizsgáltunk, az IL-1F7 76-szorosan, az IL-1F5 és IL-1F10 10-szeresen, az IL1RII közel 27-szeresen, míg az IL1Ra háromszorosan volt upregulálva. Ezekben a génekben közös, hogy mind ismert gátlószerei az IL-1 jelátvitelnek. Ezzel szemben csak egyetlen agonista, az IL-1Rrp2 receptort találtuk 13-szorosan upreguláltak, így az egyensúly a szuppresszió felé billent. Az IL-1 jelátvitel inhibitorainak a keratinocita differenciáció alatti meglepő upregulációja kiemeli a normál keratinocita differenciáció szerepét a helyes citokin balansz fenntartásában. További validálás és a hálózatok pontosabb feltérképezése vezethet az epidermális homeosztázis mélyebb megértéséhez.

Összegezve, a vizsgálatainkkal egy részletes listát közöltünk azon génekről, amelyek a keratinocita differenciáció során indukálódnak és potenciálisan részt vesznek azon sejtfolyamatokban, amelyek a differenciáció alatt zajlanak. Egyértelműen igazolni tudtuk a méréseink validitását és élettani értékét kvantitatív PCR méréssel és egyes fehérjék immunhisztokémiai kimutatásával.

Néhány ezen felismerések közül olyan regulációs mechanizmusok felismeréséhez vezetett, mint a hemoxigenáz-1 (HMOX1) és a glutaredoxin (GLRX), amelyek egy potenciális új redox jelátviteli útvonalat jeleznek a differenciáció alatt álló hámsejtekben. Egyéb gének expresszióváltozásai azt mutatják, hogy egy egyértelmű interleukin-1 szignálút vonal downreguláció is megfigyelhető a hámsejtekben. Azt reméljük, hogy ezek az újonnan azonosított gének egy rendszerezett áttekintéshez képeznek alapot, egy olyan adatbázis hozható létre, amelynek az analízise összetett differenciációs folyamatok, ezáltal bőrgyógyászati kórképek megértésében segít.

A génexpressziós vizsgálatokkal ilyen módon létrehozott adatbázisok eszközként szolgálhatnak a homeosztázis azon folyamatainak jobb megértéséhez, amelyek az epidermális barrier kialakulásáért

felelnek. Az adatok molekuláris terápiás célpontok azonosításában segíthetnek a bőrbetegségek kezelésének további fejlesztésére.

8. A PTCH 1315-ös kodonjának polimorfizmusa és a non-melanoma bőrtumorok kockázatának összefüggése

A hedgehog szignáltranszdukciós útvonal szerepét a basaliomák kialakulásában a bevezetésben részletesen ismertettük. Ennek a jelátviteli útnak a szerepét az is jól illusztrálja, hogy jelen értekezés írásakor klinikai vizsgálatok folynak szisztémás és lokális Smo inhibitor molekulákkal a basaliomák kezelésére. Vizsgálataink során a PTCH1 gén 27-es (korábban 23-as) exonjában a 1315 kodonban egy potenciálisan releváns polimorfizmusra figyeltük fel szokatlan klinikai jellemzőkkel bíró basaliomás páciensek vizsgálatakor.

A polimorfizmus eredményeként egyes esetekben a Prolint kódoló (CCC) szekvencia második pozíciójában a citozin helyett timin található, mely Leucin (CTC) beépülését kódolja. Mivel a két aminosav szerkezete jelentősen eltér egymástól, így feltételezhető, hogy ennek a cserének a hatására változik a PTCH gén tumorsuppresszor aktivitása. Erre vonatkozóan közölték, hogy a polimorfizmus dukális emlő carcinoma kifejlődésével is összefüggésbe hozható, a Leu allél hordozásához kapcsolták emlő carcinoma kialakulását, orális antikoncipienst szedő páciensek esetében.

Fenti adatok alapján tűztük ki célul, hogy földrajzilag diverz populációkban vizsgáljuk a kodon státusza és az illető embercsoportban kialakuló non-melanoma bőrtumorok, valamint az erre hajlamosító kockázati tényezők, leginkább a bőrszín összefüggését. 6 különböző humán populációt vizsgálva, akkor Pro/Pro genotípus gyakoriságának a tekintetében jelentősen eltérő értékeket találunk 30- 65% közötti értékekkel. A vizsgált populációkban a bőr- és hajszín egyre világosabbá válásával egyértelmű trend mutatkozott a Pro/Pro allélreprezentáció arányának csökkenésével, amely trend statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a nyugat-afrikai yoruba bőrtípustól az ír felé haladva. A bőrszín világosabbá válása az eumelanin csökkenésével és a pheomelanin arányának emelkedésével jár együtt. A Leu allél gyakoriságának emelkedése szintén megfigyelhető volt, de nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. A két allél arányának változása nem magyarázható egyszerűen a gének szélességi kör alapján változó jellegével. Érdekesnek találtuk, hogy az ír populáció kivételt jelentett a nyilvánvaló trend alól, ami különösen annak fényében figyelemre méltó, hogy az írek között is magas a non-melanoma bőrtumorok incidenciája.

Ahhoz, hogy a 1315-ös kodon Prolin allélváltozatának a bőrtumorok kialakulásában játszott szerepét tisztázzuk, vizsgáltuk a polimorfizmus allélgyakoriságát 180 non-melanoma bőrtumoros beteg és egészséges véradók összehasonlításával. A vizsgálat azt mutatta, hogy nem lehetett statisztikailag szignifikáns eltérést találni a bőrdaganattal bíró és az egészséges populáció között a Pro/Pro, Pro/Leu vagy Leu/Leu allél reprezentáltsága alapján.

Emellett nem lehetett megtalálni a PTCH prolin allél felülreprezentáltságát sem a NMSC csoportban. Továbbá nem volt statisztikailag szignifikáns összefüggés a PTCH kodon 1315 prolin Pro/Pro genotípus és a basalioma ($P=0,286$), spinalioma ($P=0,228$), vagy a solaris keratosis ($P=0,305$) szempontjából, mikor ezeket egyenként analizáltuk. A Pro/Pro genotípus sokkal gyakoribb volt a svéd páciensekben többszörös, vagy korán megjelenő basaliomák esetén, de ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns ($P=0,336$).

Korábban az amerikai páciensek között genotipizáltuk 7 páciens mintáit, akiknek a kórtörténetében nagyon nagy számú, egymástól függetlenül, de egy testtájon jelentkező basalioma volt észlelhető. Öten ezen páciensek közül prolint kódoló genotípussal bírtak. Egy olyan nagyon diverz populációban, mint az amerikai, nincsen ideális normál kontroll, amelyet össze tudnánk vetni ennek az allélnek a 5/7 (71%) reprezentáltságnak, és el tudnánk dönteni, hogy a prolin genotípus vajon valóban a non-melanoma bőrdaganatok szempontjából kockázatot jelent-e. Például az észlelés időpontjában nem többszörös bőrdaganat esetén később a páciensek még érintettek lehetnek egy további daganattal is. Egy válogatatlan populáció-keresztmetszet megint csak nem képes megfelelő kontrollként szolgálni, hiszen ismert, hogy a non-melanoma bőrtumoros páciensek általában fehér bőrűek, és ebben a csoportban is sokan inkább kelta genetikai háttérrel bírnak. Az

allél gyakoriság szignifikáns változása az európai populációkon belül jól demonstrálja, hogy mennyire nehéz a kontroll csoportot meghatározni Európából származó amerikaiak között a populáció nagyfokú heterogenitása miatt. Ennek megfelelően a prolin – prolin frekvenciát olyan módon hasonlítottuk össze, hogy a svéd páciens populáció frekvenciáját a 6 korábban bőrszín és allél összefüggését vizsgáló populáció adataival vetettük össze. A Pro/Pro allél gyakorisága pozitívan korrelált a létrejövő tumorok súlyosságának fokozódásával a svéd normál, a svéd többszörös és az amerikai multiplex basaliomák irányába ($P=0,027$, χ^2 teszt). Ez az eredmény arra utal, hogy a különbségek az egyes páciensek kategóriák között nagyobb betegszám esetén bírhatnak jelentőséggel. Ahhoz, hogy a $P<0,05$ szignifikancia szintet elérjük, a svéd basaliomás kontrollok esetén körülbelül 400 mintára lenne szükség minden kategóriából.

A PTCH egy klasszikus tumor szuppresszor génként viselkedik, ezekre általában jellemző, hogy a daganatokban mind a két allél inaktiválódik. Tipikusan azonban az első inaktivációs lépés egy allél elvesztése formájában jelenik meg, az úgynevezett heterozigótaság elvesztése (Loss of Heterozygosity, LOH). Ha feltételezzük, hogy a prolin allél ritkábban fordul elő a világos bőrű populációban, hiszen ez daganatra hajlamosít, a létrejövő daganatok esetén azt várnánk, hogy preferenciálisan elvesz a Leu allél. A svéd tumor mintákban az LOH a PTCH génnek gyakran fordult elő, az esetek 67%-ban, de nem láttuk a leucin allél preferenciális elvesztését. A spinaliomák esetén az LOH a PTCH gén szempontjából nem volt gyakori, csak 18%-ban volt észlelhető és nem volt preferenciális Leu allélvesztés sem. A spinalioma prekursor elváltozása, a solaris keratosis esetén nem volt PTCH allélvesztés megfigyelhető.

Mindössze egy a hét eredeti amerikai páciensből volt heterozigóta, így volt LOH vizsgálatra alkalmas. Ennek a páciensnek 20 különböző tumorát vizsgáltuk heterozigótaság elvesztése szempontjából. a húsz tumorból 11 esetén lehetett LOH-et detektálni, ám ezen tumorok közül 10 esetben a leucin allél veszett el és csak 1 esetben a prolin. A különbség statisztikailag szignifikáns χ^2 illesztési teszttel ($P=0,0308$, feltételezve, hogy 45% heterozigóta, ill. $P=0,0067$ 11 ismert LOH esetén).

Vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy létezik összefüggés az eumelanin:pheomelanin arány, azaz a sötétebbé váló bőrszín és a Pro/Pro genotípus arányának csökkenése között különböző populációkat tanulmányozva. A prolin kicserélése a bőrükben több pheomelanint tartalmazó populációkban, úgy tűnik, hogy fokozott kockázatot jelent a basaliomára, és az egyén fogékonyságát fokozza többszörös basalioma kialakulására. A vizsgált páciensek közül az amerikaiak esetén elmondható, hogy a leucin elvesztése a prolin megtartásával szintén magasabb kockázatot jelent a tumor progressziója szempontjából. Vélhetően a polimorfizmus jelentőségét több tényező együttes megléte teszi érdekessé.

Új tudományos eredmények összefoglalása

- Humán kórképek egérmodelljét vizsgálva igazoltuk, hogy a különböző DNS szakaszokon létrejövő károsodások közül azoknak az apoptózis-indukáló képessége a legkifejezettebb, amikor a DNS károsodás az aktív transzkripcióban lévő géneken alakulnak ki. Az apoptózis egyidejű p53 és mdm2 indukcióval jár együtt, ami azt igazolja, hogy az így létrejövő apoptózist a p53 mediálja.
- A krónikus UV-besugárzást modellező kísérletünkben igazoltuk, hogy a legkorábbi, mikroszkopikus méretű daganatok előállíthatóak az epidermiszben rendszeres UVB expozíció által. Igazoltuk, hogy 1.) ezek az incipiens tumor-előalakok p53 mutációkat hordoznak, 2.) növekedésük dinamikája az UV-sugárzás nemcsak a tumorok iniciációjában és promóciójában játszik szerepet, de az epidermális őssejt kompartmentek közötti átjárhatóság biztosítása révén a tumorok progressziójában is.

- Az adaptív immunrendszerrel nevezve deficiens állatokban elvégezve a fenti kísérletsorozatot igazoltuk, hogy az adaptív immunitás nem játszik érdemi szerepet a néhány száz sejtből álló tumor-előalakok elleni védekezésben.
- Az E2F1 transzkripció faktor új funkcióját írtuk le az UVB-indukálta keratinocita apoptózis folyamatában. Igazoltuk, hogy a p53 és az E2F1 együttes hiányában - egy dupla knockout egértörzsön – markánsan fokozott apoptózis-készség észlelhető UVB-sugárzás hatására. Megfigyelésünk a p53-regulált apoptózis útvonal alternatív lehetőségeinek fontosságát támasztja alá. Ezzel összefüggésben a kettős knockout modellben észleltük, hogy a p53 elvesztésének spontán tumorokra hajlamosító hatása és az utódok ivararányában észlelt eltolódás felülírható az E2F1 inaktiválásával. Ezek az észlelések kísérletünk igen jelentős *in vivo* jelentőségét támasztják alá.
- A hypoxia útvonal tanulmányozása kapcsán írtuk le a HIF-1alfa két fázisból álló indukálhatóságának jelenségét. Észleltük ezen válasz dóziszfüggését, vizsgáltuk időbeli dinamikáját és bizonyítottuk mRNS szinten a VEGF és HMOX-1 célgének ennek relevanciáját. Bizonyítékot szolgáltatunk a HIF-1alfa indukciójának AKT útvonal általi kontrolljára is.
- Munkánk során új rendszert állítottunk be különböző szfingolipid származékok keratinocita differenciációra kifejtett hatásának vizsgálatára, amivel sikerült egyes vegyületekről igazolni, hogy hatékonyak a konfluencia-indukált keratinocita differenciációban számos gén expressziójának változtatására. Igazoltuk, hogy a fitoszfingozin-szalicilát, és a szfingozin-szalicilát hatékony új keratinocita differenciációt elősegítő ágensek.
- Teljes genom transzkripcionális profil analízissel újdonságként írtuk le – egyebek mellett - a RNF39, PKP3, HMOX1, ICEBERG, FOXQ1, ELMOD gének szerepét konfluencia-indukált keratinocita differenciációs modellünkben. Ezen gének szerepét verifikálni is sikerült kalcium-indukált differenciált tenyészetekben TaqMan® gén expressziós analízissel. A gének expressziójának a változása a keratinocita differenciáció során meglévő szerepükre utal, és ez előrevetíti eddig fel nem ismert epidermális útvonalak meglétének lehetőségét.
- A PTCH gén 1315-ös kodonjában előforduló polimorfizmus allél eloszlását vizsgáltuk bőrszín szerint diverz populációkban és igazoltuk a Prolin allél gyakoriságának csökkenését a bőrszín világosabbá válásával párhuzamosan. A Prolin allél jelenléte ugyanakkor nem hajlamosít statisztikailag igazolható módon basalioma kialakulására.

Az eredmények lehetséges gyakorlati alkalmazásai

- Az UV hatásra jelentkező hámsejt apoptózishoz vezető DNS károsodás szignál útvonalának megértése egyes ritka genodermatózisokban a páciensek célzott kezelésének további lehetőségét vetíti elő terápiás targetként. A már használatos reparáció-fokozó készítmények mellett ezen adatok alapján további terápiákra nyílhat lehetőség. Ezen elérhető és esetleges jövőbeli reparációt elősegítő készítmények az egészséges populációban is széles körben kerülhetnek alkalmazásra a túlzásba vitt napozás, napon tartózkodás akut és hosszú távú hatásainak kivédésére.
- Az epidermális lemezekon kimutatott p53 mutációt tartalmazó mikroszkopikus tumorok igen kiváló modellrendszerként használhatóak akár kozmetikai, akár gyógyászati célú készítmények vizsgálatára. Felmerül az ősi immunitásra ható anyagok, akár kismolekulák, akár tradicionális medicinális készítmények tesztelésének a lehetősége is rendszerünkben.

- A p53 mutációt kezdettől hordozó, vagy a kezelés alatt akviráló tumorsejtek apoptózis-készségét az E2F1 transzkripciós faktor egyidejű gátlásával lehetne adataink alapján helyreállítani, amely a daganatterápiában közvetlen haszonnal járna.
- A hypoxia rendszer UVB hatásra fellépő változásai a lipidek magas energiájú és oxigén dependens celluláris metabolizmusának a szabályozásában is szerepet játszhatnak, így magyarázzák a napozás után észlelt epidermális lipid barrier változások egy részét is. A HIF-1alfa akár terápiás célmolekula lehet az UV-sugárzás utáni hatások minimalizálására, ill. VEGF-re gyakorolt hatásán keresztül bőrdaganatok prevenciójában is potenciális szerepet játszhat.
- A teljes genom transzkripcionális expresszióváltozás feltérképezésével hatékonyan használható módszert mutattunk be a keratinocita differenciációt moduláló anyagok tesztelésére. A vizsgált anyagok közül az is felmerül lehetőségként, hogy a fitoszfingozin--szalicilát, és a szfingozin-szalicilát, mint hatékony új keratinocita differenciációt elősegítő ágensek, terápiás haszonnal bírjanak.
- A keratinocita differenciációban érintett gének a korábban fel nem ismert epidermális útvonalak identifikálásával terápiás célpontokként szolgálhatnak további gyógyszerfejlesztések számára.
- A PTCH gén polimorfizmusa jelentőséggel bírhat a jelenleg fázis III-as klinikai vizsgálati stádiumban fejlesztés alatt álló Smo inhibitorok terápiás effektusa szempontjából, ami direkt klinikai hasznot jelenthet.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Az értekezésben szereplő közlemények

Brash DE, **Wikonkal N**, Remenyik E, van der Horst GTJ, Friedberg EC, Cheo DL, van Steeg H, Westerman A, van Kranen HJ
The DNA damage signal for Mdm2 regulation, Trp53 induction, and sunburn cell formation in vivo originates from actively transcribed genes.
Journal of Investigative Dermatology 117:1234-1240. (2001)
Független idéző: 22 Függő idéző: 7 Összesen: 29
IF: 4.645

Zhang WG, Remenyik E, Zeltermann D, Brash DE, **Wikonkal N**
Escaping the stem cell compartment: Sustained UVB exposure allows p53-mutant keratinocytes to colonize adjacent epidermal proliferating units without incurring additional mutations.
Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America 98:13948-13953. (2001)
Független idéző: 70 Függő idéző: 9 Összesen: 79
IF: 10.896

Remenyik E, **Wikonkal N**, Zhang WG, Paliwal V, Brash DE
Antigen-specific immunity does not mediate acute regression of UVB-induced p53-mutant clones.
Oncogene 22:6369-6376. (2003)
Független idéző: 15 Függő idéző: 3 Összesen: 18
IF: 6.495

Wikonkal N, Remenyik E, Knezevic D, Zhang W, Liu M, Zhao H, Berton TR, Johnson DG
Inactivating E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice.

doi: 10.1038/27411
Nature Cell Biology 5:653-660. (2003)
Független idéző: 37 Függő idéző: 10 Összesen: 47
IF: 20.268

Asplund A*, Gustafsson AC*, **Wikonkal N***, Sela A, Leffell DJ, Kidd K, Lundeberg J, Brash DE, Ponten F
PTCH codon 1315 polymorphism and risk for nonmelanoma skin cancer.
British Journal of Dermatology 152:868-873. (2005)
Független idéző: 13 Összesen: 13
IF: 2.978 (*= megosztott első szerzők)

Paragh G, Schling P, Ugocsai P, Kel AE, Liebisch G, Heimerl S, Moehle C, Schiemann Y, Wegmann M, Farwick M, **Wikonkal N**, Mandl J, Langmann T, Schmitz G
Novel sphingolipid derivatives promote keratinocyte differentiation.
Experimental Dermatology 17:1004-1016. (2008)
Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3
IF: 3.259

Wunderlich L, Paragh Gy, **Wikonkál N**, Banhegyi G, Karpai S, Mandl J
UVB induces a biphasic response of HIF-1 α in cultured human keratinocytes.
Experimental Dermatology 17:335-342. (2008)
Független idéző: 8 Függő idéző: 1 Összesen: 9
IF: 3.259

Paragh G, Ugocsai P, Vogt T, Schling P, Kel A, Tarabin V, Liebisch G, Orsó E, Marko L, Balogh A, Remenyik E, **Wikonkál N**, Mandl J, Farwick M, Schmitz G
Whole genome transcriptional profiling identifies novel differentiation regulated genes in keratinocytes.
Experimental Dermatology 19:297-301. (2010)
Független idéző: 8 Függő idéző: 1 Összesen: 9
IF: 3.259

Az értekezés témájában megjelent további közlemények

Wikonkal N, Berg RJW, vanHaselen CW, Horkay I, Remenyik E, Begany A, Hunyadi J, vanVloten WA, deGruijl FR
Bcl-2 vs p53 protein expression and apoptotic rate in human nonmelanoma skin cancers.
Archives Of Dermatology 133:599-602. (1997)
Független idéző: 49 Függő idéző: 4 Összesen: 53
IF: 2.358

Wikonkal N, Brash DE
Squamous Cell Carcinoma.
Science & Medicine 5:18-27. (1998)

Liu M, **Wikonkal N**, Brash DE
Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G (1) prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine.
Carcinogenesis 20:1869-1872. (1999)
Független idéző: 35 Összesen: 35
IF: 4.118

Wikonkal N, Brash DE.

Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis.

Journal of Investigative Dermatology Symp. Proc. 4:6-10. (1999)

Független idéző: 89 Függő idéző: 1 Összesen: 90

Liu M, **Wikonkal N**, Brash DE

UV induces p21 (WAF1/CIP1) protein in keratinocytes without p53.

Journal of Investigative Dermatology 113:283-284. (1999)

Független idéző: 11 Összesen: 11

Az értekezésben nem szereplő egyéb közlemények

Szabo G, Boldog F, **Wikonkal N**

Disassembly of chromatin into approximately-50 kb units by detergent. Biochemical and Biophysical Research Communications 169:706-712. (1990),

Független idéző: 19 Függő idéző: 5 Összesen: 24

IF: 3.606

Horkay I, **Wikonkal N**, Patkó J, Bazsa G, Beck M, Ferenczi A, Nagy Z, Rácz M, Szalay T

Suntest: A Chemical UVB Radiation Dosimeter. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology 31:79-82. (1995)

Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5

IF: 1.668

Remenyik E, Lanyon GW, Horkay I, Paragh G, **Wikonkal N**, Kosa A, Moore MR

Erythropoietic protoporphyria: A new mutation responsible for exon skipping in the human ferrochelatase gene.

Journal of Investigative Dermatology 111:540-541. (1998)

Független idéző: 3 Függő idéző: 3 Összesen: 6

Pónyai K, **Wikonkal N**, Bottlik G, Hársing J, Kucsera I, Horváth A, Kárpáti S
Dirofilaria repens infection case in Hungary: A case report. Ein Dirofilaria repens fallbericht aus Ungarn.

Journal of the German Society of Dermatology 4:1051-1053. (2006).

Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5

Könyvfejezetek

Dobozy A, Fodor J, Gödény M, Kásler M, Köves I, Liskay G, Marschalkó M, Oláh J, Orosz Zs, **Wikonkal N**

A bőr rosszindulatú daganatainak ellátása.

In: Kásler M (szerk.) A komplex onkodiagnosztika és onkoterápia irányelvei.

Budapest: Semmelweis Kiadó, 2008. pp. 293-304.

Dobozy A, Fodor J, Gödény M, Liskay G, Marschalkó M, Rosta A, Orosz Zs, **Wikonkal N**

A cután lymphomák ellátása.

In: Kásler M (szerk.) A komplex onkodiagnosztika és onkoterápia irányelvei.

Budapest: Semmelweis Kiadó, 2008. pp. 323-328.

Temesvári E, **Wikonkál N** dc_274_11
Fotokontakt/toxikus és fotoallergiás bőrreakciók.
In: Temesvári E, Kárpáti S (szerk.) Gyakorlati allergológia.
Budapest: Semmelweis Kiadó, 2009. pp. 78-85.

Wikonkál N

A fény kiváltotta tumorok

In: Tulassay Zsolt, Matolcsy András (szerk.) Az Onkológia tankönyve
Budapest: Semmelweis Kiadó 2011. pp. 509 – 515

Szabo Jr. G, **Wikonkal N**, Damjanovich S, Boldog F.
Regular fragmentation of chromatin upon treatment with detergent
In: Takis S. Papas (editor) Advances in Applied Biotechnology, vol. 6,
Gulf Publ., Houston, TX, USA, 1990.

Young A, **Wikonkal N**

Photocarcinogenesis.

In: Henry W. Lim, Herbert Hönigsmann, John L. M. Hawk (editors), Photodermatology
Informa Healthcare USA, New York, NY, USA, 2007. pp. 107-118.

Szcientometriai adatok

Közlemények száma: 69

Angol nyelvű közlemények száma: 33

Magyar nyelvű közlemények száma: 36

Elsőszerzős közlemények száma: 17

Utolsószerzős közlemények száma: 6

Egyetlen szerzőként: 7

Impakt faktor a MTA számítása szerint: 63,550

Össz impakt faktor: 77,434

IF.: a PhD fokozat megszerzése előtt: 11,75

IF.: a PhD fokozat megszerzése után: 51,8

Idézettség összesen:

Összesen: 427, önidézettség nélkül: 381

Függő idézetek száma: 46

Könyvfejezet: 4 magyar, 2 angol

Citálható absztrakt: 40

Hirsch index: 10/10