

dc_274_11

MTA Doktori Értekezés

**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

Tartalom

1. Preambulum.....	6
2. Bevezetés.....	8
Az értekezés klinikai relevanciája: Non-melanoma bőrtumorok klinikuma.....	8
Non-melanoma bőrtumorok: spinalioma és basalioma.....	9
DNS károsodást javító mechanizmusok defektusai nyomán kialakuló betegségek.....	12
Cockayne-szindróma.....	12
Xeroderma pigmentosum.....	13
Naevoid basalsejtes carcinoma syndroma, Gorlin-Goltz szindróma, a PTCH gén szerepe.....	16
Környezeti ártalmak a bőrön: ultraibolya sugárzás.....	22
Az UVA szerepe.....	24
Akut UV besugárzás hatása a bőrre.....	25
Apoptózis a bőrben: sunburn-sejtek.....	26
A Trp53 tumor szuppresszor gén.....	27
Mutációk bőrdaganatokban.....	28
Hosszú időn át elszenvedett UV sugárzás hatásai a bőrre.....	31
Intinzik és extrinzik bőröregedés - photoaging.....	32
A hypoxia válaszvonal szerepe a bőrben.....	33
D-vitamin szerepe.....	34
A keratinociták terminális differenciációja.....	37
A bőr lipidjei.....	38
Fehérjék és lipidek a terminális differenciációban.....	40
3. Célkitűzések.....	41
4. Anyagok és Módszerek.....	43
A kísérlet modellrendszerei:.....	44
Humán anyagok.....	44
Kísérleti állatok.....	44
Sejt- és szöveti minták.....	45
Molekuláris szintű minták.....	46
A minták kezelésére használatos eszközök és reagensek:.....	48
Besugárzási fényforrás:.....	48
Dozimetria.....	49
Fixálás, anyagok:.....	49

Differenciációt indukáló szfingolipidek	50
Transzfekció.....	50
Citotoxicitási vizsgálat	50
Az értékelésben használt technológiák:	51
Szöveti és sejtszintű hisztológiai és immunhisztokémiai technikák.....	51
TUNEL esszé	51
Áramlási citometria	51
Sunburn-sejtek – apoptotikus keratinociták kimutatása	51
Immunhisztokémia.....	52
Immunoblot analízis	52
Direkt szekvenálás:.....	53
Pyroszekvenálás	53
A citotoxicitás értékelése	53
DNS microarray	53
Real-time RT-PCR (TaqMan™) analízis.....	54
Promoter extrakció	54
A transzkripció faktor (TF)-kötő helyek promoteren belüli számítógépes azonosítása	55
Kompozit promoter modellek (CPM) előállítása	55
Real-time PCR.....	56
Dokumentáció.....	56
Statisztikai módszerek:	56
5. Eredmények	57
5.1 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	57
5.1.1 A sunburn-sejtek kialakulása bőrben	57
5.1.2 Xpa és Csb knockout egerek apoptózis-készsége jelentősen fokozott a vad típussal összevetve	58
5.1.3 Xpc knockout egerek apoptózis-készsége szignifikánsan nem különbözik a vad típusától	60
5.1.4 A Trp53 indukciója Xpa és Csb knockout egereknél jelentősen fokozottabb az Xpc és a vad típushoz képest.....	62
5.1.5 Az Mdm2 indukciója eltérő a vad típus és Xpc knockout egerekben mint az Xpa és Csb knockout egerekben.....	64
5.2 A Trp53 apoptózist indukáló hatásában résztvevő gének szerepe, újabb adatok az	

UVB-indukálta apoptózis reguláció komplex rendszerében	67
5.2.1 p21 ^{Cip1/Waf1} knockout egerek apoptózis-készsége nem különbözik a vad típusétól	68
5.2.2 p27 ^{Kip1} knockout egerek apoptózis-készsége nem különbözik a vad típusétól	69
5.2.3 E2F1 knockout egerek apoptózis-készsége jelentősen fokozott a vad típuséhoz képest	70
5.2.4 Az E2F1X Trp53 dupla knockout egerek túlélése a vad típusúéhoz hasonló	75
5.2.4 Az E2F1X Trp53 dupla knockout egerek születéskori ivararánya a vad típuséhoz hasonló	76
5.3 Trp53 mutáns klónok időbeli és térbeli dinamikájának vizsgálata krónikus UVB besugárzás mellett	77
5.3.1 A Trp53 pozitív klónok méretben és sejtszámban is növekednek krónikus UVB hatására	78
Fogságba esett klónok	80
5.4 Az antigén-specifikus immunitásnak nincs hatása az UVB-indukálta p53-mutáns klónok keletkezésére és akut regressziójára	86
5.5. A hypoxia válasz szerepének vizsgálata HaCaT keratinocitákon UVB besugárzást követően	91
Az UVB az általunk alkalmazott dózisban nem volt letális hatású a HaCaT keratinocitákra	92
5.5.1 A z UVB hatására a HIF1 alfa szintje az időben dinamikusán változik	92
5.5.2 A HIF1 alfa szintje az UVB dózistól függően változik	93
5.5.3 Az UVB hatásával előidézett HIF1 alfa szintcsökkenés ismételt UVB besugárzással újraindítható	93
5.5.4 Az UVB hatása a HIF1 alfára, VEGF, HO1-re mRNS szinten	94
5.5.5 A PI3K gátlása csökkenti a HIF1 emelkedését az UVB expozíció után	96
5.6 Egyes újonnan azonosított szfingolipid derivátumok a keratinocita differenciációt fokozzák	97
5.6.1. A szfingolipid vegyületek citotoxicitásának meghatározása	98
5.6.2. A konfluencia-indukált differenciáció megfelelő hatékonysággal használható kísérletes modellként	101
5.6.3. Az átlagos génexpresszió változás több gén expressziójának változását vizsgálva jól tükrözi a differenciációra hatással lévő anyagok hatékonyságát	104
5.6.4 Szfingolipid származékok keratinocita differenciációt moduláló hatása	105
5.6.5 A vegyület-specifikus promotor modellek összehasonlítása	106
5.7. Egész-genom transzkripcionális profilanalízis segítségével új differenciáció-regulált gének azonosíthatóak keratinocitákban	109
5.7.1 A keratinocita differenciáció nagyszámú gén expresszióját változtatja	110
5.7.2 Szelektált gének expressziójának verifikálása kvantitatív PCR-rel	112

5.7.3 Szelektált gének expressziójának verifikálása immunhisztokémiai módszerrel	114
5.7.4 A génexpressziós vizsgálatok gyakorlati aspektusai –új útvonalak feltérképezése	116
5.8 A PTCH 1315-ös kodonjának polimorfizmusa és a non-melanoma bőrtumorok kockázatának összefüggése	117
5.8.1 A fehérebb bőrtípusokhoz a Pro/Pro allél kisebb aránya társul	119
5.8.2 A PTCH 1315-ös kodonja Prolin kódolása önmagában nem hajlamosít basaliomák kialakulására.....	120
5.8.3 A heterozigótaság elvesztése non-melanoma bőrtumorokban.....	122
6. Eredeti tudományos felismerések.....	125
7. Az eredmények lehetséges gyakorlati alkalmazásai	127
8. Rövidítések jegyzéke.....	128
Köszönetnyilvánítás	129
Irodalomjegyzék	131

1. Preambulum

A bőr a legnagyobb emberi szerv, fő funkciója, hogy a környezettől való elhatárolódás és védekezés első vonalát alkotja. A szervezetet védi a kiszáradás, sérülések, fertőzések, kémiai, fizikai, és egyéb környezeti behatások ellen. Ezen funkciók ellenére, mint egységes szervre gyakran nem gondol az általános orvosi vélekedés és így jelentősége alulértékelt marad. A bőr a szervezetet védő, elhatárolódó funkcióját pusztán a hámsejtek sajátos fizikokémiai tulajdonságain alapuló passzív funkcióként látja el. Emellett azonban a hámsejtjei a környezettel való kapcsolattartásban kifejezetten aktív feladatokat is betöltenek. A valóságban tehát a bőr egy aktívan megújuló dinamikus rendszer, számos igen eltérő funkciót ellátó sejt együttese. Azon számos sejtípus közül, melyek a bőrt alkotják, legfontosabbak az epidermisz keratinocitái részben számuk, részben funkciójuk gazdagsága miatt. Bár az emberi epidermisz legfelső rétegének, a stratum corneumnak a sejtjei már magot nem tartalmazó keratinnal kitöltött élettelen zsákok, az alatta elhelyezkedő rétegek kiemelkedő jelentőséggel bírnak a szervezet túlélése szempontjából, nagyon is életteli, sokszínű funkcióval bíró sejtek[1]. A bőr három rétege közül a legfelső, az epidermisz domináns sejtípusa, a hámsejt, a keratinocita, aktív sejt, amelynek funkciói egyre diverzebbek, számost részlet még jelenleg is vizsgálatok tárgyát képezik. A keratinociták életük során egy előre eltervezett elhaláson, a terminális differenciáción mennek keresztül, amely által egy folyamatosan megújuló mechanikus és kémiai barriert képeznek a szervezet és a környezet között. A tranziens amplifikáló sejtek, amelyek az epidermisz bazális sejtjeiből alakulnak ki, már jellegzetes morfológiai jeleket mutatnak[2] és ezek alkotják a bazális réteg sejtjei fölötti réteget, a stratum spinosumot, amely aztán stratum granulosummá alakul. Ez a réteg az, ahol elkezdenek kialakulni a később létrejövő stratum corneumot alkotó keratin granulumok, amelyek a keratinocita differenciálódási folyamat végén aztán a stratum corneumban lapos elhalt sejtekké, korneocitákká alakulnak át. Ezen folyamatos megújulás során az intermediér filamentumok és a különböző horgonyzó proteinek is folyamatosan megújulásra kényszerülnek, csak úgy, mint a lipid összetétele a sejteknek folyamatos változáson megy keresztül. Mindezen folyamatok azt eredményezik, hogy egy mechanikusan jól strukturált, fiziko-kémiai kötésekkel megerősített védőköpeny alakul ki a szervezetben, amely lamelláris struktúra elengedhetetlen alkotó része a bőrnek. Ez a lamelláris felépítés biztosítja aztán a vízhatlanságot, valamint a kémiai barrier funkcióját a bőrünknek. Bár úgy tűnhet, hogy különböző folyamatok eredményezik a mechanikai és a kémiai barrier létrejöttét, azonban

a molekuláris mechanizmusokat megvizsgálva ezek nagyfokú integráltságot mutatnak. A szintetizáló folyamatok eredményeképpen jön létre az a homeosztázist reguláló hálózat, amely a bőr definitív barrier funkcióját biztosítja.

A terminális differenciáció egy sok lépéses folyamat, a keratinocita számos egyéb funkciót is el kell lásson, de közben 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 fiziológias 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 gyulladásal 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. Bőrgyógyászként, 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 bőrtumorok molekuláris hátterének megismerése, az onkogenezis egyes lépésinek feltérképezése az általános onkológiai gyakorlat számára is nagy jelentőséggel bír. Jó példa erre a p53 funkciójának bőrtumorok 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

differentiáció és ennek mesterséges befolyásolására kínálkozó 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. Létezik DNS károsodást kivédő, azt helyreállító T4 endonukleáz V hatóanyagú lokális készítmények pl. xeroderma pigmentosumos betegek kezelésére, továbbá születtek ígéretes kísérleti eredmények a mutációt szenvedett p53 kísérleti körülmények közötti molekuláris helyreállításával kapcsolatban is, amely a jövő terápiás eszköze lehet.

2. Bevezetés

Az értekezés klinikai relevanciája: Non-melanoma bőrtumороk klinikuma

Gyakorló orvosként, bőrgyógyászként és dermatoonkológusként mindenek előtt a páciens egészsége érdekel, a kutatómunka lényegét is a kórképek patomechanizmusának megismerése és az esetleges jövőbeni terápiás lehetőségek megtalálása adja.

A bevezetésben is ezt az elvet követem, az egész felől haladok a részletek felé, így elsődlegesen a klinikai relevanciát, a kórképek klinikumát tekintem át. A bőrből kiindulva három gyakori malignus tumor kialakulására lehet elsősorban számítani: basocellularis carcinoma (basalioma, 1.1. ábra) spinocellularis carcinoma (spinalioma, 1.2. ábra) és a melanoma. Mivel mindkettő a keratinocitából indul ki, és klinikai megjelenésük valamelyest hasonlít, de jelentősen eltér a melanomától, ezért a basaliomát és a spinaliomát együttesen, mint non-melanoma bőrrákokat is említjük. A basalioma és a spinalioma klinikai megjelenése hasonló: mindkettő relatíve lassan növekvő, bőrszínű tumor; ezzel szemben a melanoma az egyébként nem oszló melanociták malignus transzformációjaként jönnek létre, így általában sötéten pigmentált. További hasonlóság a basalioma és a spinalioma között, hogy mindkét tumor a bőr legfelső rétegét, az epidermiszt 90%-ban felépítő sejtek, 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.

Bár a melanoma halálteki tényezőként messze fontosabb a basaliománál és a spinaliománál, molekulárbiológiai ismereteink korántsem annyira teljesek ezen daganat háttéréről, mint a non-melanoma bőrrákok esetén. Primer melanomákban eddigi ismereteink szerint a B-raf gén mutációját lehet leggyakrabban megtalálni, de ez is csak a tumorok kb. 60%-ában fordul elő.[3] A non-melanoma típusú bőrrákok esetén megértésünk ennél valamelyest teljesebb, ezekben a tumorokban ismerjük két gén, a Trp53 és a PTCH oki szerepét.

Non-melanoma bőrtumorok: spinalioma és basalioma

Bár fent relatíve hasonló klinikai megjelenésük alapján a basaliomát és a spinaliomát együtt, mint non-melanoma daganatok 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, a solaris keratosisban is kimutathatóak. A klinikai tapasztalattal összhangban az élet során ismétlődően elszenvedett UV károsodás vezet aztán tumor kialakulásához, jellemzően a magasabb életkorban a napnak folyamatosan kitett bőrfelületeken. Más a helyzet a basalioma esetén. A p53 mutációk itt is a tumorok több mint felében megtalálható és már kisméretű tumorok egy-egy sejtjében is kimutatható[4, 5], a basalioma esetén mégis inkább a PTCH génnek van nagyobb szerepe. Bár az UV-re jellemző kézjegy mutációk ebben a génben is megtalálhatóak[6, 7], 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[8].

Az immunrendszer hatása is máként jelentkezik, a spinaliomák esetén az immunszupprimált státusz kevésbé jelent rizikótényezőt, de a spinaloma esetén ez

meghatározónak tűnik lenni[9]. Ennek alapja az a megfigyelés, hogy a szervtranszplantáltak körében átlagban 100-szoros a kockázata a spinaliomának a normál populációval összehasonlítva, de a közlések 65-250-szoros gyakoriságfokozódásról is beszámolnak[10-13]. Basaliomára átlagosan 3-10-szeres kockázat fokozódás a jellemző [13, 14]. A szervtranszplantáltakon észlelt daganatok lefolyására is a kifejezetten gyors progresszió és nagy számban egyszerre felbukkanó jelleg a jellemző[15]. Természetesen az, hogy az immunszuppresszió primeren vezet-e a daganatok kialakulásához, vagy a virális tényezők szerepe az elsődleges, ez még ma is vizsgálatok tárgyát képezi[16].

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 elszennvedett UV fény hatására a bőr foltossá, durva tapintatúvá válik, helyenként hajszálértágulatok jelennek meg rajta[17]. 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, solaris keratosisokat generál (3. ábra). Ezek szöveti képében már felismerhetőek a szöveti atípiák jelei, úgymint: szabálytalan sejtoszlások és atípusos sejtdifferenciáció[18]. Bár ezek az elváltozások még képesek spontán visszafejlődni, amennyiben a napfény expozíció megszűnik[19], mégis egy az ezerhez arányban *in-situ* karcinómába mehetnek át[20]. Ennek az átmenetnek jól nyomon követhető szöveti jelei vannak, amelyek magukba foglalják a sejtek aneuploiditását és a malignus tumorokra jellemző metasztázis készséget. A fenti folyamatos átmenet a reverzibilis pre-malignus formákból malignus tumorokba elsősorban a spinaliómákra jellemző, ehhez hasonlatos átmeneti alakok basaliomákban nem mutathatók ki[21]. A spinaliomákkal ellentétben még a teljesen kiérett basaliomák is megtartják a sejtek diploiditását és pusztán lokális invázió révén terjednek. Metasztázisok megjelenése basaliomákban kifejezetten ritka, a közlések 0,0028% és 0,55% közötti gyakoriságról számolnak be[22]. A hazai gyakorlatban inkább a néhány ezred százalék körüli metasztázis ráta tűnik valószínűnek lenni[23].

Ez utóbbi tény ellenére, a non-melanoma bőrtumorokat pusztán a gyakorisága, amely amerikai és ausztrál adatok szerint az emlő-, tüdő-, vastagbél-, és prosztaták együttes gyakoriságát is meghaladja[24, 25], fontos népegészségügyi problémává emeli. Nem jelentéktelen az a tény sem, hogy mindkét daganat kutatása olyan részletekkel gazdagította a karcinogenezisről ma meglévő ismereteinket, amely alapján, mint modell rendszer is jelentős értékkel bírnak. Kitűnően bizonyítja, hogy az alap kutatás a klinikai tárgyak esetén



1.1. ábra Basalioma jellegzetes klinikai megjelenése: idős páciensen, napnak kitett bőrfelületen, éles szélű, gyöngyházzsínű szegéllyel bíró, számos teleangiectasiát tartalmazó tumor. Az ábrán látott előrehaladott formáknál az exulcerálódás jelentősebb

is milyen nagy jelentőséggel bír az a tény, hogy az értekezés beadása előtti hónapokban láttak napvilágot egyebek mellett a basalioma kezelésében a később részletesen tárgyalt Hedgehog útvonalat célzó új kezelések klinikai fázis III.-as vizsgálati eredményei.



1.2. ábra Spinalioma jellegzetes klinikai megjelenése: hasonlóan a basaliomához, itt is a páciens életkora magas, ez a típusú daganat csaknem kizárólag napnak kitett bőrfelületen fordul elő, vaskosan keratotikus, később exulcerálódó tumor formájában.



1.3. ábra Multiplex solaris keratosisok idős férfitársas homlokán és fejbőrn. Jellegzetes a vastagon hyperkeratotikus jelleg, az esetenként erőteljesebben erythemás alap.

DNS károsodást javító mechanizmusok defektusai nyomán kialakuló betegségek

Cockayne-szindróma

A Cockayne-szindróma egy ritka autoszom recesszíven öröklődő kórkép. A szindróma részjelensége a növekedési retardáció, szubkután zsírszövet elvesztése, bőratrophia, az idegrendszer fejlődésének zavara, kifejezetten káros fényérzékenység és korai öregedés[26]. A folyamat hátterében a DNS reparációs mechanizmusok közül a transzkripcióhoz-társuló nukleotid excíziós repair zavara áll.[27, 28] Halláskárosodás, pigmentált retionopátia és belszeri működészavar szintén részei a kórképnek. A Cockayne-szindróma hátterében leggyakrabban a CSB génmutációja áll, az esetek közel 80%-ában[29], ezért vizsgálataink során is ezt az állatmodellt használtuk. A TCR indító szignálja az RNS polimeráz II megállása a DNS károsodása miatt, aminek eredményeképpen a TCR eltávolítja a károsodott vagy téves oligonukleotidot és így az

RNS polimeráz további munkáját biztosítja[30]. A CSB ezen kívül a hypoxia hatására kialakuló válaszfútvonalak regulációjában is szerepet játszik[31].

Klinikai formái:

CS I. típus: a klasszikus megjelenés, amely az első két életév során manifesztálódik normális magzati fejlődés után. Látás-, hallászavar, progresszív központi és perifériás idegrendszeri eltérések, amely az első, második évtized során halállal végződik.

CS II. típus: a konnatális megjelenésű forma, már születéskor idegrendszeri eltérések észlelhetők, a várható élettartam nem éri el a 10 évet sem.

CS III. típus: Megjelenésében az I. és II.-es típushoz képest enyhébb, később manifesztálódik.

Ezen formák mellett létezik a Xeroderma-pigmentosum-Cockayne-syndroma (XP-CS) együttes előfordulása is, amikor mindkét betegség jegyei felismerhetők.

Xeroderma pigmentosum

Az egyik legklasszikusabb repair defektussal járó kórkép a xeroderma pigmentosum. Maga

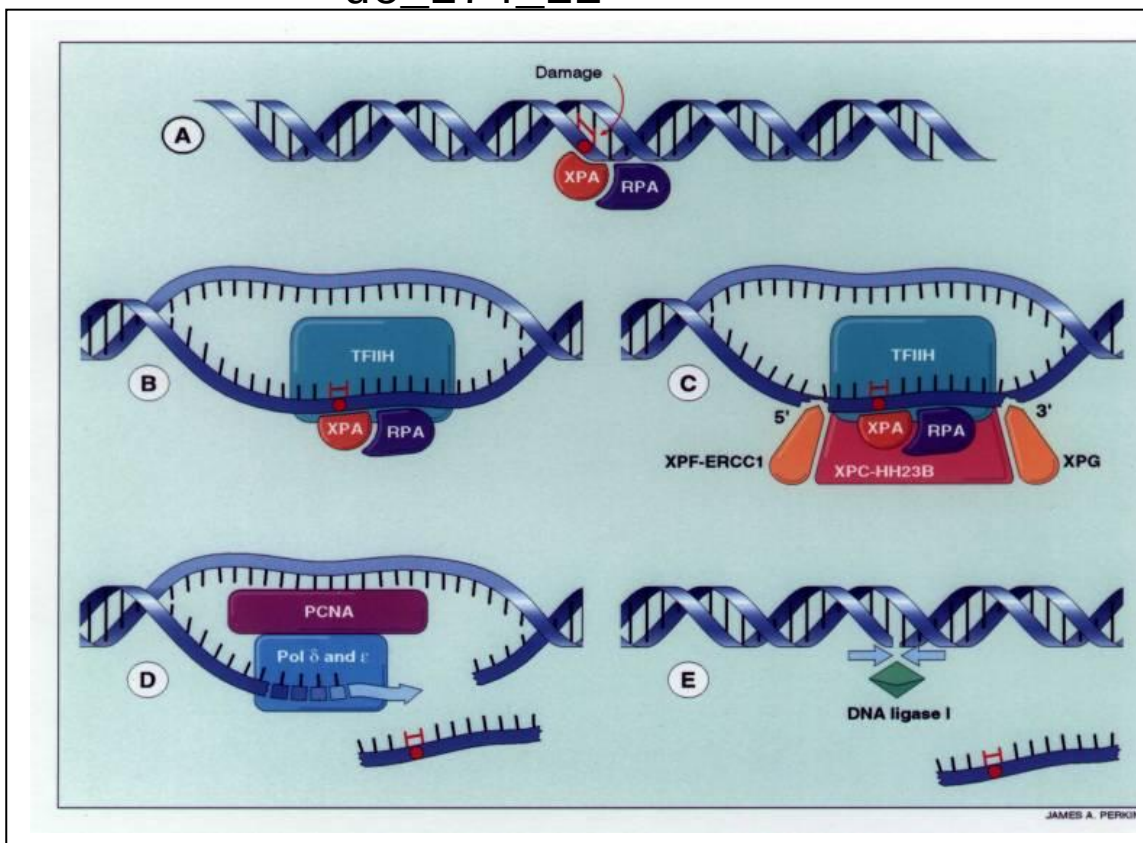


1.3. ábra Xeroderma pigmentosum klinikai képe. Jól látható a fiatal korhoz képest idősnek tűnő bőr, a szeplők, az igen nagy számban észlelhető keratosisok. Prof. Dr. Horkay Irén anyagából.

a kórkép 1874-ben Debra és Kaposi által került leírásra, 1882-ben Kapositól származik a név, leírva a páciensek jellegzetes száraz, pigmentált, szeplőkkel tarkított bőrét.

A xeroderma pigmentosum egy olyan szokatlan nagy fényérzékenységgel járó kórkép, amely legalább ezerszeres fogékonyság növekedéssel jár a napfény által indukált bőrtumorok irányába. A kórkép hátterében a globális genom nukleotid excíziós repair útvonalnak a genetikus zavara áll. Klinikai megjelenésében mindegyik XP páciens számos közös vonást mutat. Ezek a névadásban is szerepet játszó szeplőszerű kifejezett pigmentáció már minimális napfény behatás után is, amely általában már 2 éves életkor alatt megjelenik. Legalább ennyire szembetűnő a bőrtumorok megjelenése akár már a tinédzser kor előtt. Az XP autoszóm recesszív módon öröklődik és 7 gén mutációja állhat mögötte, XPA-tól – XPG-ig. Ezen kívül ismert még egy XP variáns forma is az, XP-V, amely a DNS polimeráz éta mutációjaként áll elő, és így vezet fokozott fényérzékenységhoz és tumorképződési hajlamhoz[32, 33]. Az XPV géntermék a DNS replikáció károsodott DNS szakaszról való replikációjában játszik szerepet, a posztreplikációs repairben[34]. A CSB és CSA-hoz képest az XP gén termékek (XPA-G-ig), hasonlóan a transzkripcióhoz-társuló nukleotid excíziós repairben, a TCR-ben vannak érintve.

Egyes reparációs gének mutációi kombináltan is előfordulhatnak, ahogy fent említettük, ismert XP-CS jeleit egyaránt mutató tünetegyüttes is. A kombinált kórképek is nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy az egyes géneltérések szerepét tisztázzuk, mint például, hogy a CS-ben gyakoriak az idegrendszeri eltérések, viszont a pácienseknek nincsen bőrrák irányú fokozott fogékonysága, míg az XPA esetén ennek az ellenkezője az igaz. Az XP páciensek nagyfokú bőrtumor irányú fogékonysága azt eredményezi, hogy általában melanoma vagy spinalioma metasztázisai okozzák a beteg halálát.



1.4. ábra Az excíziós repair útvonal egyszerűsített modellje

A xeroderma pigmentosum genetikai formái nagyon hasonló fenotípust eredményeznek: legfeltűnőbb a nagyon kifejezett napégésre való hajlam nagyon csekély UV dózisok esetén is, így az ebben a kórképben szenvedő gyerekeknek teljes napfény védelemmel kell biztosítani. A névadó nagyon karakterisztikus szeplők, a már korai életkortól nagyon korán kialakuló solaris keratosisok és ennek következményeként létrejövő spinalioma. A szemek extrém mértékben fokozott fényérzékenysége észlelhető, jelentős fokú konjunktivitisszel. Minimális napexpozíció hatására is hólyagos bőrtünetek jelentkeznek, a bőrön számos teleangiectázia, a bőr általános szárazsága, durva tapintata a hajzat és a test szőrzetének gyenge növekedése, kifejezetten hámló bőr és szokatlan keratosisok és lentigók észlelhetők.

A betegség lényege a nukleotid excíziós repair egyes génjeinek károsodása. Attól függően, hogy melyik gén érintett ebben a betegségben, különböztetjük meg XPA-tól XPG-ig elnevezve a kórképeket. Az egyes gének valamelyest eltérő szerepet játszanak, egyesek mind a globális genom, mind pedig a transzkripcióhoz társuló nukleotid excíziós repair folyamatában is részt vesznek. Az 1.4. ábrán egy sémás megközelítésben mutatjuk az egyes géntermékek szerepét. A reparáció folyamatának első fázisa mindkét repair folyamat

esetén a károsodott DNS felismerése, amelyben elsődlegesen a globális genom érintett NER-ben érintett XPA gén játssza a főszerepet. A DNS károsodás felismerése után egy komplex formálódik, amelyben szerepet játszik az XPG, majd az XPB és az XPD is csatlakozik ehhez a komplexhez, illetve ekkor társul a TFIIH is. Ennek a fehérjecsoport működésének az eredményeképpen a károsodott DNS szakasz eltávolításra kerül, az XPG és az XPF gének által kódolt endonukleázok végzik a hasítást. A végső soron keletkező hézag a DNS polimerázok segítségével kerül feltöltésre.

Magának a xeroderma pigmentosumnak az incidenciája meglehetősen alacsony, általában 1:250000 világszerte, kivéve Japánt, ahol lényegesen gyakrabban, 1:40000-szeres gyakorisággal észleljük[35]. A xeroderma pigmentosumban szenvedő betegeknél az első rosszindulatú bőrdaganat kialakulásának átlagos életkora 8 év, szemben a populációban észlelhető 60 évvel, illetve a keratosisok már az élet első két évében megjelennek[36]. Ezek után nem meglepetés, hogy a páciensek kevesebb, mint 40 %-a éli meg a 20 évesnél idősebb életkort[37]. A kórkép kezelése, genetikai betegség lévén szó, nem megoldott. Ígéretes próbálkozások a bőrtumorkok ellátásán kívül is vannak T4 endonukleáz V-ről írták le, hogy a repair funkciót jelentősen fokozni tudja. A Yarosh és munkatársai közlése alapján indultak el klinikai vizsgálatok, amelyek során a bevonásra került 30 beteg közül 8,2% volt a keratosisok aránya, szemben a 25,9% placebo csoporttal[38]. Természetesen a kórkép kezelésében a legfontosabb a megfelelő fényvédelem, már születést, a diagnózis felállítását követően, ill. kiemelt jelentőségű a genetikai feltérképezés és gondozás[39, 40]: Egyéb gyógyszeres kezelésként a szisztémás retinoidok közül isotretinoin alkalmazásáról írtak le mérsékelt sikereket[41]. Kísérleti szakaszban van még a virális vektorokkal való genetikai gyógyítás[42], amely talán a jövőben – hasonlóan más genodermatózisokhoz – kuratív megoldást jelenthet.

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

Ma már egyértelműen igazolt, hogy az UV sugárzás a basaliomák kialakulásának legfontosabb oka. Ennek kísérletes bizonyítéka, hogy a jellegzetes UV kézjegy mutációk nagy százalékban kimutathatóak a daganatsejtekből.[43-45]

A legfontosabb tumorsuppresszor gének közül a Trp53 esetén 40-60%-ban találtak mutációkat basalioma tumorsejtekből[43, 44]. Ez az arány spinocelluláris carcinomában

90% fölötti[46, 47]. A basalioma és a spinalioma kialakulása a meglévő hasonlóságok mellett nyilvánvalóan nem ugyanazokon a lépéseken keresztül valósul meg. 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 előalakként 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 9q kromoszómán allélvesztéssel, vagy pontmutációval inaktiválódott, így a tumorok kialakulásáért felelős[48]

A Gorlin-Goltz, vagy nevoid basalsejtes carcinoma szindróma 1960-ban került leírásra mint egy ritka genodermatózis[49], 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.[50, 51]

MAJOR KRITÉRIUMOK
>2 basalioma, vagy 1 basalioma 20 éves életkor alatt odontogén keratociszta (mandibula ciszta) vagy több csontot érintő csontciszta 3 vagy több tenyéri vagy talpi behúzottság ektopikus calcifikáció vagy 20 év alatt falx cerebri calcifikáció családban előforduló Gorlin-Goltz szindróma
MINOR KRITÉRIUMOK
Veleszületett csontrendellenesség: hasadt, összenőtt, kifordult vagy hiányzó borda, vagy összenőtt, hasadt, csigolya szív vagy ovárium fibroma medulloblastoma lymphomesenterikus ciszta kongenitális malformáció: nyúlajak, farkastorok, polidaktília, szemészeti eltérések: (cataracta, colobma, microphthalmia, nystagmus)
1.1. táblázat Naevoid basalsejtes carcinoma syndroma – Gorlin-Goltz szindróma diagnosztizálásához szükséges major és minor kritériumok. A diagnózis felállítható 2 major vagy 1 major és 2 minor kritérium megléte esetén.

A betegségben szenvedők számára fontos információ, hogy mivel egy genetikai rendellenességgel már bírnak, így minden karcinogén hatás náluk fokozott veszélyt jelent daganat kialakulása szempontból[52]. Elsődleges tehát, hogy ionizáló sugárzásnak minimális fokban legyenek csak kitéve, például diagnosztikus Röntgensugárzásnak is csak a legszükségesebb mennyiségben legyenek kitéve, illetve kezelésükben a radioterápia nem alkalmazható. Emellett a nem ionizáló ultraibolya sugárzásból is csak minimális mennyiség érje a bőrüket. Ez magában foglalja az igen óvatos napon tartózkodás mellett a szoláriumok használatának teljes mellőzését.

A betegség hátterében álló gén a PTCH gént is azonosították [53], amely a hedgehog szignáltranszdukciós útvonal egy ismert tumorsuppresszor génje. Ennek, és az útvonal más génjeinek mutációját sporadikus basaliomák esetében is igazolták.



1.5. ábra Naevoid basalsejtes carcinoma szindrómában szenvedő fiatal férfibeteg hátbőrén észlelhető igen nagy számú basalioma



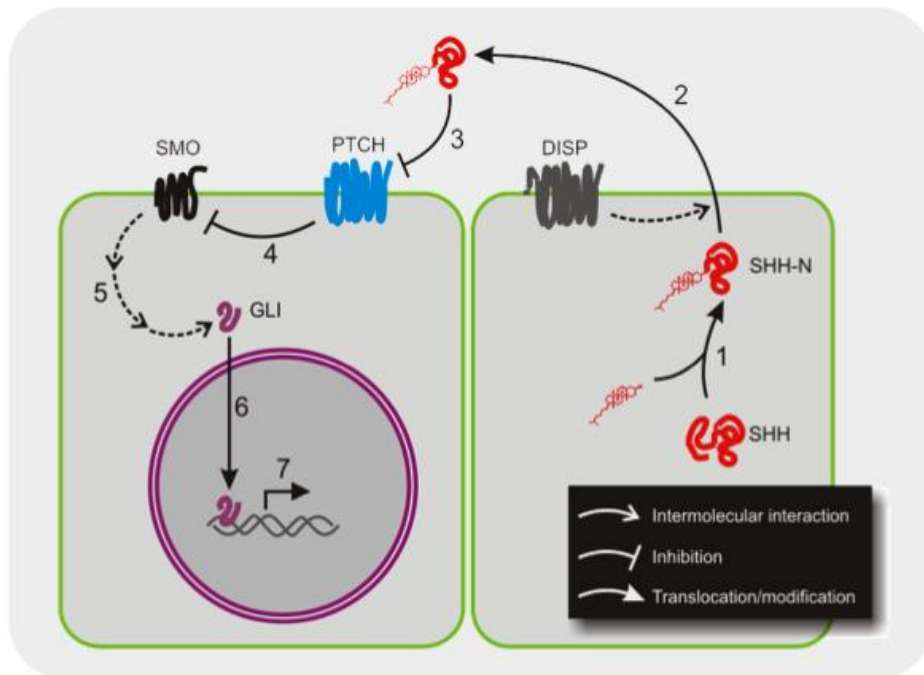
1.6. ábra. Gorlin-Goltz szindrómában szenvedő páciens tenyerének jellegzetes behúzottságai, (pitting).

A PTCH gén a *Drosophila melanogaster*-ben (ecetmuslica) megtalálható és az egyedfejlődésben kulcsszerepet betöltő 'patched' gén humán megfelelője. A PTCH gén a Hedgehog szignáltranszdukciós (HH) útvonal részeként a szervi differenciáció szabályozásán túl tumorszuppresszor funkcióval bír. Ennek elvesztése fokozza egyes daganatok kialakulásának esélyét. A génnek számos mutációja ismert, melyek a basalioma, illetve a Gorlin-Goltz szindróma mellett meningeoma, glioblastoma, oesophagus-, vagy húgyhólyag laphám carcinoma és trichoepithelioma kialakulását okozhatják. A sporadikus basaliomák is igen nagy számban hordoznak PTCH mutációkat. [54]

A PTCH génnek két altípusa, a PTCH1 és PTCH2 ismert, ezek közül az elsőként a PTCH1 került leírásra.[55] A gén a 9. kromoszóma hosszú karján (9q22.3) található. A gén felfedezéséhez a naevoid basalsejtes carcinoma szindróma, Gorlin-Goltz szindrómában szenvedő betegek vizsgálata vezetett, a gén különféle mutációi a szindrómában szenvedő betegek legalább 90%-ban kimutathatóak. Mint a vizsgálatok igazolták, a PTCH génben is megtalálhatóak a jellegzetes UV kézjegy mutációk.[56]

A PTCH 2 (patched 2) gén az 1. kromoszóma rövid karján (1p32.1–32.3) található, aminosav szinten 73%-os egyezést mutat a PTCH 1 fehérje termékével, és jelentős funkcionális hasonlóságokat is találhatunk. Ugyan mindkét gén terméke tumorszuppresszor hatású, azonban míg a PTCH 1 gén teljes hiánya már embrionális korban letalitáshoz vezet, addig a PTCH 2 önmagában álló teljes hiánya sem az egyedfejlődést, sem a tumorképződés rizikóját nem befolyásolta hátrányosan, mint erre egereken végzett kísérletek a közelmúltban rámutattak. Ugyanakkor a PTCH 2 teljes hiánya, a PTCH 1 heterozigóta hiányával kiegészítve már jelentősen megnöveli a tumorok kialakulásának kockázatát.[57]

A továbbiakban a jóval részletesebb, nagyobb számban végzett kutatási eredmény illetve a basaliomák és Gorlin-Goltz szindróma pathomechanizmusában bizonyított kulcsszerepe miatt a PTCH 1 gén (továbbiakban PTCH) hatásmechanizmusát, más szabályozó fehérjékkel való kapcsolatát részletezzük, a PTCH2 esetleges, egyes jellemzőknek fellelhető egyedi sajátosságaira nem térünk ki.



1.7. ábra: A PTCH SMO kölcsönhatásának sémás rajza. Forrás: www.wikipedia.org

A PTCH gén az emberi szervezetben a Drosophiliákban leírt komplex szabályozási rendszerhez több részletben hasonlatosan a hedgehog (sonic HH, indian HH, desert HH) – Smoothened (Smo) – Gli (Gli 1,2,3) útvonal részeként, az Smo gátlásával valósítja meg tumor képződést gátló funkcióját. (1.7. ábra)

A PTCH a sejtmembránban elhelyezkedő transzmembrán fehérjeként extracelluláris N-doménjével kapcsolódik az Smo fehérjéhez, így gátolva annak hatását. Az Smo gátlás következményeképpen a Gli1, Gli2 transzkripciós faktorok aktivitása csökken, így a sejtek osztódása, a tumorképződés kontrollálható.

A PTCH hiányát, vagy funkciócsökkenését követően a fent leírt útvonal révén az Smo, majd közvetve a Gli1, Gli2 transzkripciós faktorok aktivitás fokozódása következik be. A PTCH funkcióvesztése gyakorta a már heterozigóta mutáns alléllal rendelkező egyedeknél a normál allél elvesztésével (LOH- loss of heterozigosity) valósul meg. Ezt követően a Gli target gének, közte a wingless- (Wnt), a decapentaplegic géncsalád (pl.: TGF-béta, transforming growth factor béta), és maga a PTCH gén expressziója fokozódik. Tekintettel, hogy az emelkedett PTCH szint ellenére a feedback gátlás nem tud a PTCH mutációja

miatt megvalósulni, így a folyamat kontrollálatlanul haladhat, hosszútávon tumorképződéshez vezetve.[58, 59]

A fentiek alapján érthető, hogy a PTCH gén mutációi miért mutathatóak ki akár a sporadikus basaliomák (67%), akár a Gorlin-Goltz szindrómás betegek esetében (>90%) igen nagy számban.[58, 60]

Ugyancsak a fenti genetikai és molekuláris biológiai ismeretek alapos megértése vezetett el, olyan jelenleg már klinikai III. fázisban lévő gyógyszer vizsgálatokhoz, melyekben a kiesett PTCH funkciót helyettesítve az Smo direkt gátlásán keresztül próbálják a daganatok eliminációját elérni.

Az előzetes eredmények alapján a fenti terápia sikeressége igazolja a genetikai, molekulárbiológiai alaputatások múltbeli és jövőbeni szükségességét és jelentőségét.

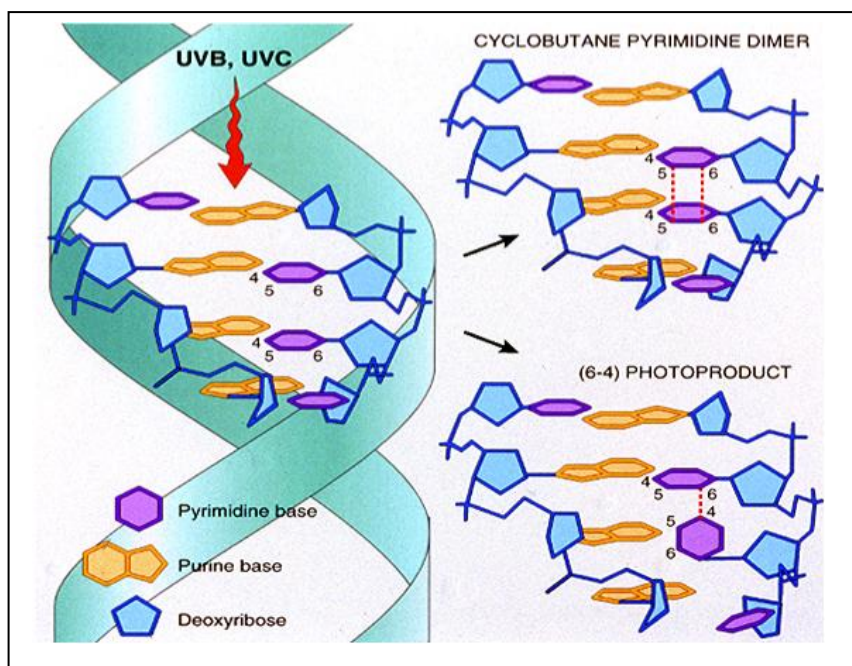
Közel múltban megjelent közlemények [61] leírták a vismodegib (korábbi néven: GDC-0449) szisztémás használatát [62] előrehaladott basaliomák kezelésében. A dolgozat írása előtt néhány hónappal publikálták a klinikai vizsgálatok eredményeit lokális Smo inhibitor tartalmú készítmény, használatával. [63]

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 felszínén az élet kialakulása szempontjából kritikus elem volt az ózonréteg kialakulása, amelynek eredményeképpen a leginkább karcinogén tartomány, az UVC, lebomlásával elnyeli a fotonok energiáját és kiszűri a Föld felszínét elérő sugárzásból az UVC-t. Az ózonpajzs dinamikusan változó, megújulásra képes entitás, amelyet azonban az emberi tevékenység jelentős fokban veszélyeztet, időszakos ózonlyukak kialakulásával kell számolnunk[64]. Az ózonpajzsra ártalmas gázok emissziója mostanra jelentős mértékben csökkent, amelynek eredményeképpen az ózonpajzs regenerációja vélhetően megindult[65]. Napjainkban az ózonlyuk időszakos

kialakulása mellett sem kell számolnunk a Föld felszínét elérő UVC sugárzással, inkább az UVB alacsonyabb hullámhosszúságú komponenseinek az aránya növekszik[66]. Az UVC mesterséges fényforrásokból előállítva viszont pont DNS károsító jellege miatt hatékony dezinficiáló ágens, ilyen módon kerül hasznosításra, mint germicid lámpa vagy mint nagy volumenű víztisztító berendezés.

Az UVC igen kifejezett DNS károsító hatásának alapja az, hogy a DNS molekula abszorpciós maximuma 260 nm, amely teljes egészében 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 jön létre a ciklobután-pirimidin-dimerek, (CPD), illetve kisebb valószínűséggel a pirimidin-(6-4)-pirimidon fotoproduktum ((6-4)-PD). Ezen fototermékek szerkezetét az 1. ábrán mutatjuk be. Emellett a 300 nm-nél hosszabb UV-sugárzás jelenlétében a (6-4)-PD fotoizomerizációja is bekövetkezik, az ún. Dewar-izomer keletkezik[67]. Az UVC- illetve UVB-sugárzás hatására képződő fő fotoproduktum a ciklobután pirimidin dimer, CPD, a (6-4)-PD jóval kisebb mennyiségben képződik. Hasonló mennyiségű CPD létrehozásához az UVB-ből mintegy százszor nagyobb energiamennyiségre van szükség, mint UVC-ből[68].



1.8. ábra A DNS molekulát érő UVB és UVC fotonok hatására létrejövő két fototermék, a ciklobután pirimidin dimer és a 6-4 fototermék.

Mint fent részleteztük, az ózonréteg jelenleg is észlelhető károsodása, elvékonyodása miatt a földet elérő spektrum az alacsonyabb hullámhossz tartomány felé tolódik, UVB-ből a rövidebb hullámhosszú és biológiailag aktívabb sugarak nagyobb részarányban érik el a földfelszínt[69]. Ez egyike azon tényezőknek, amelyek alapján napjainkban fokozottabb a fotokarcinogenezis veszélye. Emellett az 1960-as évek óta jelentősen megváltoztak vakációzási szokásaink, a napon tartózkodás lehetőségeinek kifejezett keresése, napbarnított bőr iránti vágy mind oda vezettek, hogy a populációt érintő UV terhelés jelentősen fokozódott[70, 71]. Az ultraibolya sugárzás hatására keletkezett CPD-t és (6-4)-PD-ot ép sejtekben nukleotid excíziós reparáció (NER) észleli és kijavítja[72]. A 6-4-fototermék reparációja gyors, hatékony, nagyrészt a globális genom reparáció (GGR) révén megy végbe. A CPD-k észlelése és kijavítása lassabb, a kijavítás hatékonysága is alacsonyabb, ennek végrehajtója a transzkripcióhoz kapcsolt repair (TCR)[73]. Az UV fotonok energiája a két szomszédos pirimidin bázis esetén jellegzetes változásokat idéz elő, amelyek, ha a NER nem javítja ki kellő hatékonysággal, akkor az UV-ra egyértelműen utalós típusos pontmutációk, GC–AT tranzíció, CC–TT mutációk jönnek létre. A hiba észlelése a transzkripció leállítását idézi elő, az RNS polimeráz II gátlásával[74-77], ilyenkor a sejtciklus ellenőrző pontjainak aktiválódása és sejtciklus késleltetése áll elő, amely időleges, de végződhet a sejt halálával is. Ez utóbbi a keratinocitákon UVB hatására apoptózis beindulását, ún. sunburn-sejtek kialakulásának a formájában észlelhető[78-80].

Az UVA szerepe

A DNS molekula UV-abszorpciós görbéjéből jórészt levezethető, hogy a hosszú hullámú UVA tartományból a DNS már relatíve csak kis mennyiséget nyel el, ennek biológiai következménye, hogy az UVA direkt módon napégést nem okoz. Egyfajta barnulást viszont csaknem az expozíció után azonnal képes előidézni, így kerültek a piacra a kezdetben tiszta UVA-t, majd napjainkra dominálónan UVA-t és szerény mennyiségű UVB-t emittáló fénycsővek, amelyek az esztétikai ipar mint szolárium csövek használ. Részben az azonnali napégés hiánya, részben egyéb tényezők vezettek ahhoz a téves nézethez, hogy az UVA nem káros sugárzás. A kísérletes eredmények azonban mindinkább amellet szólnak, hogy e hullámhossz tartomány hatására is kialakul DNS károsodás[81]. Az UVA hatása a DNS-re döntően a szabad gyökök képződése révén valósul meg[82]. A 320-400 nm elektromágnes sugárzást a sejtmembránok lipidjei illetve a citoplazma egyéb molekulái

abszorbeálva excitált állapotba kerülnek. Alapállapotba jutásuk közben energiájukat átadják a környezetükben lévő molekuláknak, leggyakrabban a labilis oxigén molekulának, ezzel nagy reaktivitású oxigén gyököt (ROS) generálva, ami további molekulákat alakít át. Az így elindított láncreakció hosszabb életidejű komponensei eljuthatnak a DNS-hez. Ha elég közel keletkeznek a DNS-hez a rövid életidejű, nagy reaktivitású szabad gyökök, egyszálú, esetleg kétszálú DNS-töréseket, bázismódosulásokat hoznak létre. A legjellemzőbb a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanozin (8OHdGuo), az abázikus helyek, ill. DNS-fehérje keresztkötések létrejötte[83]. Az UVA hatására létrejövő szabadgyök-mediált változások relatíve gyorsan korrigálhatóak: az egyszálú DNS-törések gyorsan összekapcsolódnak, a báziskárosodások a bázis excíziós reparáció révén kijavíthatódnak, a DNS-fehérje keresztkötéseket enzimek elhasítják. Szemben az UVB kiváltotta hatással, itt a folyamatban a sejtciklus késleltetése egyáltalán nem jelenik meg[84], vagy az S-fázisra[85], illetve a G2/M-átmenetre[86, 87] szorítkozik. Ez kisebb mértékű DNS-károsodást valószínűsít, bár egyes pontmutációk, leggyakrabban AT–CG transzverzió kialakulhatnak[88]. Bár az UVB lényegesen effektívebb e tekintetben, UVA hatására is keletkeznek CPD-k[89], ill. egyes közlések szerint a léziók nagyobb része nem a szabad gyök károsodásra jellemző 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, hanem a ciklobután pirimidin dimer[90]. humán bőrben kromoszómakárosodás létrejöttét is bizonyították UVA hatására[91]. Az UVA okozta DNS-károsodás relatíve nagyobb dózisokat igényel, mint UVB esetén, de ha figyelembe vesszük, hogy a napfény UV-spektrumában ez a tartomány 90-95%-ot képvisel, az UVA okozta károsodások szerepe már nem elhanyagolható[92]. Az UVB és UVA hatásairól beszélve fontos kiemelni, hogy az UVB mindössze az epidemisz alsó rétegéig képes lejutni, addig a UVA pusztán fizikai karakterisztikája miatt az irhába is jelentős mértékben penetrál. Ezen ismeretek alapján az UVA-sugárzás ártalmi egyértelműek, szerepük a daganatok kialakulásában igazolt. Ennek a ténynek az ismeretében a IARC (International Agency for Research on Cancer), a WHO egyik szervezete, 2009-ben I. csoportba tartozó, azaz bizonyítottan karcinogén kategóriába sorolta az ultraibolya sugárzás mindegyik fajtáját[93].

Akut UV besugárzás hatása a bőrre

Az akut UV besugárzás legközvetlenebbül észlelhető káros következménye a napégés, a

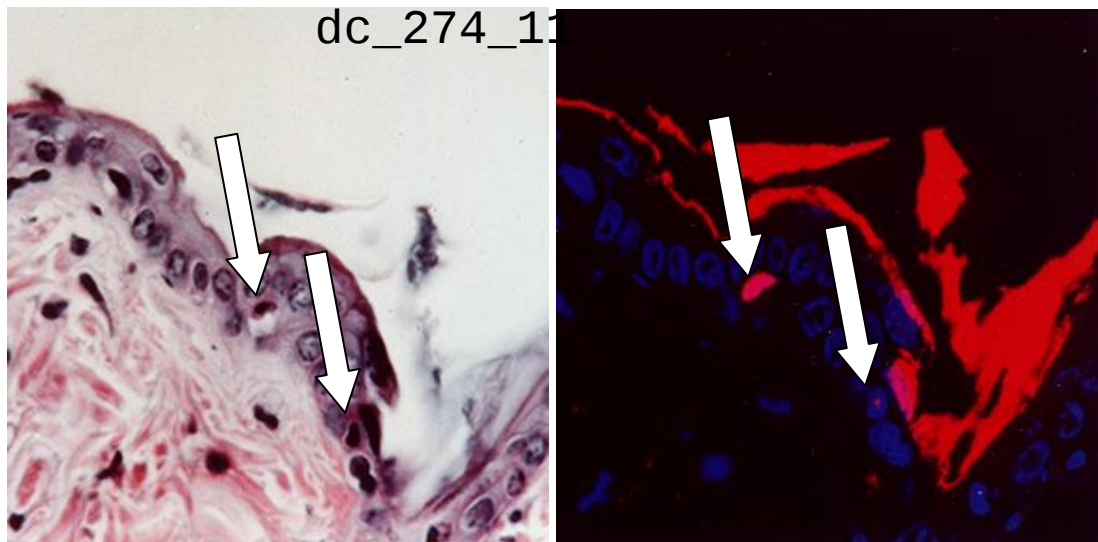
dermatitis solaris. A mindennapi gyakorlatban is előfordul, de ennek mesterséges előidézése diagnosztikus eszközként is szolgál. Az utóbbi, a fényérzékenység meghatározása a minimális eritéma dózis (MED) megállapítása[94], továbbá ismételt besugárzásokkal a fotoszenzitív bőrtünet provokációjában van jelentősége fotoszenzitív kórképek kivizsgálása kapcsán[95]. A napégésnek továbbá a fotokarcinogenezisben is kiemelkedő szerepe van pathogenetikai[96] és epidemiológiai szempontból is[97].

Apoptózis a bőrben: sunburn-sejtek

A programozott sejthalál, az apoptózis, a szervezetben kiemelt jelentőséggel bír számos sejt és szövet fiziológiás működése szempontjából. A legfontosabb funkciója egy olyan védelmi. 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 ismérve: DNS-ük fragmentálódott, foszfatidil-szerin detektálható a sejten kívül a membránon[98], ami amúgy csak a citoplazmatikus felszínen van jelen és kaszpáz aktivitás detektálható bennük[99, 100].

Az apoptotikus keratinocita morfológiája alapján azonosítható már hematoxin eosin festéssel, de használható elektronmikroszkóp is. A molekuláris technikák között a elterjedtek a speciális, a DNS fragmentációt jelző módszerek (TUNEL, DNS létre), fluorimetria (annexin V), fehérje degradációt vizsgáló (PARP cleavage, caspase assay) stb, technikák a pontos szöveti detektálásra[101]. Az apoptotikus keratinociták immunhisztokémiai[102] és molekuláris biológiai elvű (mikroszómális DNS törés) kimutatására is lehetőség van[47].

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.[103, 104]. Az apoptózis során az olyan sejtek, amelyek a DNS állománya nem reparálható meg, eltávolításra kerülnek, hiszen a károsodott DNS-sel bíró sejtek utódsejtjei potenciálisan malignusak lehetnek. Ezen kontrollált elimináció megakadályozza a károsodott genom fennmaradását és továbbadását az utódsejtekbe, így megelőzi a karcinogén mutációk túlélését[104]. A sunburn-sejtek képződésében a Trp53 mediált apoptózis játszik domináns szerepet, de egyéb mechanizmusok is szerepet játszanak. Ismert a mitokondriumok kiemelt szerepe az apoptózisban[105] számos faktor közreműködésével: cytochrom C, sejt felszíni receptorok,



1.8 ábra A sunburn-sejtek valóban apoptotikusak bal o. HE festés, jobb oldalon TUNEL (Terminal UTP Nick End Labeling) Az apoptotikus sejteket a nyilak jelzik. 400X

Fas/CD95 halál receptorok, TNFalfa útvonala. FasL deficiens egerekben megnő a Trp53 mutációk száma UV hatásra)[106]. Az ismert pro-apoptotikus gének közül jelentős a p63, (Trp53 homológ)[107]; az apoptózis ellen gének közül pedig a Bcl2, Bcl-xl[108], jelátviteli utak: MAPKs (ERK, JNK, FOS)[109] is fontos szerepet játszanak a sunburn-sejt képződésben[96], azonban legmeghatározóbb szerepe a Trp53 fehérjének van. Az UVB által elindított apoptózis szignálban az ultraibolya sugárzás által kiváltott DNS károsodás a meghatározó. A keletkezett CPD-ket egy másik enzimszisztéma, a fotoliáz képes ismételt önálló bázisokra bontani, ezáltal visszaállítani a DNS eredeti szerkezetét[38]. Ezen anyagok ma már fényvédő készítmények összetevői is piacra kerültek. Ismert továbbá, hogy UVB irradiációt követően alkalmazva a fotoliáz enzimet, a keletkező apoptotikus sejtek száma csökken.[110].

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, illetve a Trp53 protein termék stabilitásáért felelős mdm-2 gén is.[111, 112]. A Trp53 jelentőségét emberi tumorokban hangsúlyozza az a tény, hogy az összes tumor több mint felében írtak le mutációkat ebben a génben[113, 114]. A non-melanoma tumorok közül elsőként a spinaliomákat vizsgálták a Trp53 mutációk tekintetében[115]. Ebben a tumorfajtában a legkifejezettebb a napfény expozícióval való összefüggés egyrészt epidemiológiai adatokat vizsgálva, másrészt annak a klinikai ténynek

az alapján, hogy eme tumor szinte kizárólagosan napnak kitett helyekre lokalizálódik. A spinaliomák több mint 90%-ában találtak a Trp53 génen mutációkat Egyesült Államokból származó mintákban[46, 47, 113].

A basaliomák spinaliomáktól eltérő klinikai viselkedése, úgy mint a metasztázis készség hiány és a kromoszóma-eltérések ritkasága ismeretében nem váratlan, hogy a Trp53 mutációk tekintetében a basaliomák másként viselkednek: bár az irodalmi adatok nagy változatosságot mutatnak, a basaliomák csak mintegy felében igazolódott Trp53 mutáció[116]. A protein szintet vizsgálva azonban a basaliomák nagyobb hányadánál írtak le eltérést[117], ami olyan módon magyarázható, hogy a Trp53 regulációjában résztvevő egyéb gének szintjén már afiziológiás állapotok uralkodnak, amihez képest a Trp53 szerepe már másodlagos. A basaliomáknál talált Trp53 mutációk másik sajátossága, hogy a mutációk az esetek nagyobbik felénél az aminosav szinten null mutációként jelent meg, azaz stop kodon beépülésére változik a bázissorrend[113]

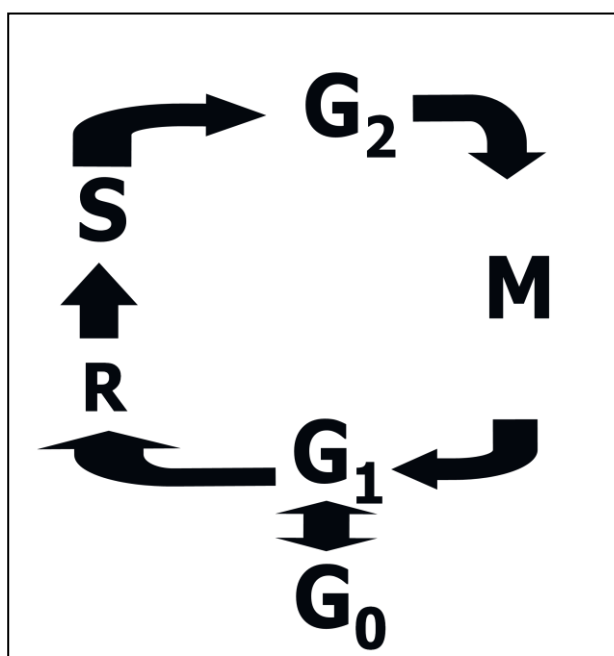
Mutációk bőrdaganatokban

Az a felismerés, hogy a napfény a bőrtumorokért felelős, régen megszületett, az első megfigyelés Thiersch-től származik 1875-ből[118]. A Trp53 mutációk, amiket basaliomákban és spinaliomákban találtunk, a feltételezéseknek megfelelően dipirimidin helyeken fordultak elő, ami a napfény oki szerepét igazolja. A mutációk típusa is árulkodó, amennyiben a mutációk kétharmada az egyik típusos UV kézjegy mutáció: C→T pontmutáció, sőt előfordulnak CC→TT mutációk is[73, 74, 119]. A mutációs spektrum ezekben a tumorokban különbözik egyéb belservesi tumorokban, pl. az emlő- és a vastagbélnél megfigyelt mutációk típusaitól[120, 121]. Bár a mutációkban érintett kodonok hasonlóak a non-melanoma bőrrákokéhoz, ezen utóbbi tumorokban a létrejövő pontmutációk mégsem az UV kézjegy típusúak. Bőrtumorokban megfigyeltek számos C→A és C→G mutációkat amelyeket ugyan szintén leírtak UV hatására, mégsem tekinthetők klasszikus UV kézjegy mutációnak. A fentiekhez még szorosan hozzátartozik az a tény is, hogy a tumorokban leírt mutációk nem pusztán csak az egész életen át tartó napfény expozíció passzív bizonyítékai, hiszen akkor látnánk UV kézjegy mutációkat nagy számban a kodon harmadik pozícióján is, ami pedig aminosav változáshoz nem vezet. Mivel azonban a megfigyelt mutációk csaknem kizárólagosan olyanok, amelyek a kódolt aminosav megváltozásához vezetnek, emiatt joggal mondhatjuk, hogy a fenti mutációk oki

jelleggel bírnak a non-melanoma bőrrákok kialakulásában.

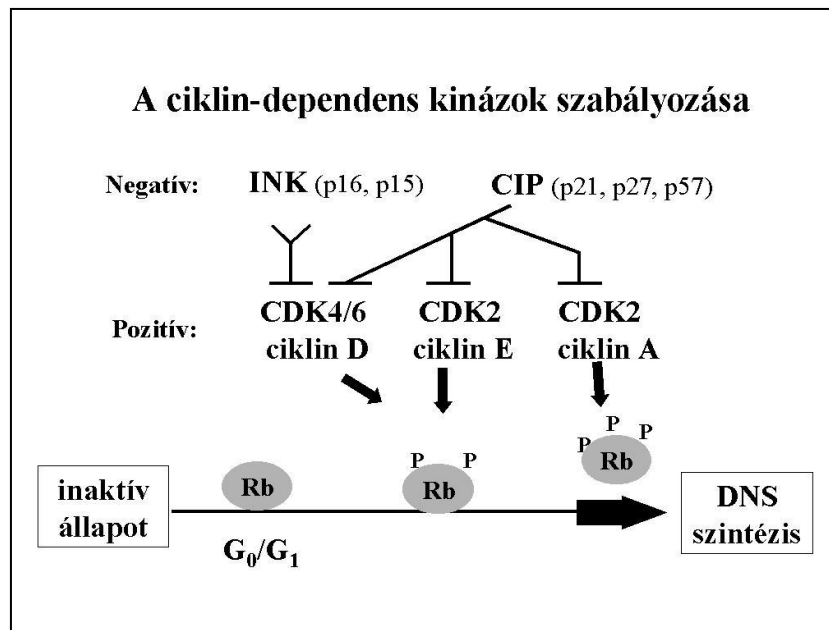
A fenti gondolatmenetben levont következtetéseket állatkísérletes eredmények is alátámasztják. Egereken végzett vizsgálatokkal sikerült UV kézjegy mutációkat generálni egerekben is naponta ismételt UV besugárzással[122]. Ezekben a kísérletekben naponta ismételt UVB és/vagy UVA hatására kialakultak spinaliomák, amelyekben a Trp53 gén mutációi hasonlóak voltak a humán non-melanoma bőrrákok mutációihoz.[119]

A Trp53 gén a genetikai integritást hivatott fenntartani, így a „guardian of the genome, génállomány védelmezője”-ként működik.[114] Ez a védelem két lépésben valósul meg, a sejtciklus feltartóztatása és az apoptózis iniciálása formájában. Első lépésként a DNS



1.9. ábra A ciklin-dependens kinázok aktivitása a ciklin-dependens kináz inhibitorok hatásainak eredményeként dől el. sejtciklus fő állomásai és a G1→S átmenetet megszabó R pont helye. Az R ponton túlhaladva a sejt már elkötelezte magát egy újabb oszlási ciklushoz, ami után a következő „megálló” csak az R pont újabb elérésével lehetséges.

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[123, 124]. A Trp53 a G1 fázisban az ún. R pont (restrikciós pont) elérése előtt képes megállítani a sejtciklust, hiányában azonban ez nem következik be[125] (1.9. ábra).



1.10. ábra Az R ponton való áthaladást vagy megállást az Rb foszforiláltsági állapota határozza meg. Ha az a molekula hipofoszforilált, akkor az egy komplex részeként szorosan kötődik a DNS-hez és a DNS replikáció nem jöhet létre. Amennyiben azonban a ciklin-dependens kinázok aktívak és az Rb hiperfoszforilálttá válik, akkor ledisszociál az E2F-DP komplexből és a sejtciklus továbbhaladása előtt nincsen akadály.

CDK inhibitor p16 más ciklin-dependens kinázok számára elérhetetlenné teszi a ciklin D-t[126]. Ezen a ponton túljutva a sejtciklus automatikusan befejeződik újra elérve a G1 fázist, anélkül, hogy lehetősége lenne a sejtciklus újabb huzamosabb feltartóztatásra. Az R pontban végbemenő történéseket az 1.10 ábrán láthatóak.

Ennek a pontnak a kulcsmolekulája a retinoblasztoma gén és protein terméke, az Rb[104, 127]. Ennek a molekulának a foszforiláltsági állapotától függően szabadul fel az E2F transzkripciós faktor családba tartozó valamelyik faktor, hogy a DNS replikációt beindítsa. A folyamatot felülről szabályozó ciklin-dependens kinázok inhibitorok által szuppresszálódnak, ill. szabadulnak fel a gátlás alól[108]. A ciklin-dependens kináz inhibitor gének ismert targetjei a Trp53-nak[109]

Egyéb karcinogén anyagok szintén szóba jönnek a non-melanoma bőrrák kialakulásának

hátterében. Az arzént a szervetlen trivalens formájában gyakran használták, mint gyógyszert korábbi századokban. Ma az ivóvíz bizonyos területeken tartalmazhatja nagyobb mennyiségben. Krónikus arzén-expozíció multiplex szuperficiális basaliomákat okoz, általában évtizedekkel később[128, 129]. Röntgen sugárzás, amely szintén korábban gyakran volt használatos betegségek kezelésében, ma már igazoltan szintén felelős basaliomák és spinaliomák kialakításáért[130]. Akut vagy krónikus radioderma jelentősen növeli a basalioma kialakulásának esélyeit. Manapság egyre növekvő mennyiségű bizonyíték van a PUVA-kezelés basalioma kialakulását növelő hatására[131, 132], míg a keskeny-hullámsávú UVB esetén nagy anyagon vizsgálva sem lehetett hasonló összefüggést igazolni[133].

A kémiai karcinogének elsődlegesen spinaliomák kialakulásáért tehetőek felelőssé[134]. Első megfigyelésként a kéményseprők scrotum rákját már 1775-ben Percival Pott Angliában megfigyelte és összefüggést véllelmezett a kémiai anyagok és a daganat között. A vesetranszplantációk bevezetése után hamarosan fény derült arra, hogy a szervtranszplantáltak körében a bőrdaganatok száma jelentősen emelkedett az átlag populációhoz képest[135, 136]. A transzplantáltak esetén azonban az átlagpopulációban észlelt basalioma túlsúly megfordul és sokkal nagyobb gyakorisággal észleljük spinalioma kialakulását[137]. Azok a mechanizmusok, amelyek vesetranszplantált betegeknél kialakuló basalioma és spinalioma immunológiai történéseit dolgozzák fel, ma még nem teljesen tisztázottak, de számos eleme mostanra már ismertté vált kiemelve a humán papilloma vírus és a Trp53 szerepét[138]. A megfelelően alkalmazott fényvédők hatékonyan akadályozzák meg a solaris keratosis és a spinalioma kialakulását, azonban kevésbé tűnnek hatékonynak lenni a basalioma-prevencióban[139].

Más krónikus bőrfolyamatok estén is észlelhetőek basaliomák, így feltételezhető volt, hogy összefüggés áll fenn az ismétlődő, nehezen gyógyuló sebek, pl. Lábszárfekély, ill. régi égési sérülések krónikus sebeiben kialakuló tumorok között, azonban a nagyobb anyagon végzett vizsgálatok ezt nem tűnnek alátámasztani[140].

Hosszú időn át elszenvedett UV sugárzás hatásai a bőrre

A krónikus UV besugárzás a bőrön korai öregedéséhez, daganatképződéshez vezethet.

Intinzik és extrinzik bőröregedés - photoaging

A photoaging (néha: photoageing) kifejezés a bőr fiziológiás, intrinzik öregedésénél lényegesen gyorsabb UV-indukálta öregedését takarja. A természetesen bekövetkező intrinzik fiziológiás. Foka főként genetikai faktorokon múlik, jól megítélhető idős páciensek napfény-expozíciónk soha ki nem tett bőrfelületein, klinikai tapasztalat, hogy esetenként ez mennyire szerény fokú az extrinzik öregedéshez képest. A photoagingnél, az extrinzik öregedésnél, a külső környezeti hatások szerepe a legmeghatározóbb. A környezeti hatások közül legfontosabb UV-sugárzás, amely bőrtípustól függően ugyan, de mindenkinél létrehoz több-kevesebb károsodást a bőrön. Természetesen az UV-sugárzás mellett a környezet egyéb elemei, a táplálkozás, a légszennyezés foka, a földfelszíni ózonterhelés, és a dohányzás is jelentős szerepet játszanak. Ez utóbbi tényező a bőr extrinzik öregedésének egyik legmeghatározóbb komponense[141].

Az intrinzik bőröregedés oka az a folyamatosan jelentkező károsító hatások miatti irreverzibilis sejt és szövetkárosodás, elsődlegesen a szabad gyökök bőrt károsító hatása. Elsősorban metabolikus folyamatok generálják a szabad gyököket, egyebek mellett a xantin/hipoxantin oxidáció, a kollagén szintézis, a mitokondriális elektron transzport[142]. Ezekben a folyamatokban a mitokondriumok játszanak meghatározó szerepet, hiszen az elektrontranszport mellett keletkező oxigén szabadgyökök itt képződnek, de egyben károsítják a mitokondriális DNS-t is. A kialakuló DNS mutációk ezután tovább rontják az oxidatív foszforiláció effektivitását, energiavesztést és további szabad gyök képződését eredményezik. A citoplazmatikus szabad gyök képződés okozta károsodások elsődleges célpontjai a proteinek[143]. A proteosomális enzimek oxidációja funkciójuk károsodásával jár, csökken az egyéb oxidált fehérjék eliminációja, így felhalmozódnak káros fehérjék, amelyek fénymikroszkópos képeken is kimutathatóak. Mindezen változások a photoagingben is megjelennek, csak a folyamat dinamikája jóval gyorsabb[144, 145]. Emellett azonban az intrinzik és extrinzik bőröregedés között jelentős eltérések is vannak[17]. Utóbbira igen jellemző a solaris elastosis, egy amorf elasztintartalmú anyag felhalmozódása a dermiszben[146]. Ennek ismérvei a szignifikánsan kevesebb kollagén I, III, VII, kevesebb fibrillin-1 jelenléte, ill. az elasztikus rostok fragmentálódása, az intersticiális kollagén bazofil degenerációja. A photoagingben az UVA a domináns hullámhossztartomány, pusztán a bőrbe való mélyebb penetrációs képesség miatt[147, 148]. A dermális fibroblaszt és extracelluláris mátrix károsodásában a degradáció igen kifejezett, ennek hátterében a mátrix metalloproteinázok aktiválódása

áll[149]. A photoaging része a teleangiectáziák képződése, a fokozott vaszkularizáció, ennek hátterében a VEGF szerepe merül fel[150].

A hypoxia válaszvonal szerepe a bőrben

A bőr oxigénellátás szempontjából nem tekinthető kifejezetten igényesnek számos egyéb szövettel, szervvel összevetve. Ismeretesebb azonban közlések, amelyek arra utaltak, hogy UV az angiogenezis regulációján keresztül is kifejti hatását, amely daganatok kialakulásában korai lépésként szerepet játszik[151-153].

A HIF-1 egy heterodimerekből felépülő transzkripciós faktor, amely az oxigén homeosztázis központi regulatoraként működik. Két alegységből áll, HIF-1alfa és béta. Ezek közül a HIF-1 béta konstitutívan expresszált és dimerizációs partnerként szolgál egyéb transzkripciós faktorok számára, más néven egyébként aryl-hidrokarbon receptorként is ismert[154]. A HIF-1 alfa expressziója ezzel szemben a sejten lévő oxigénkoncentráció kontrollja alatt áll, és mint ilyen, fontos szingáltranszdukciós útvonalakat regulál[155, 156]. Ennél fogva aztán a HIF-1 transzkripciós faktor komplex aktivitása egyértelműen a HIF-1 alfa alegység kontrollja alatt áll, tehát kijelenthető, hogy a HIF-1 alfa szolgál mind az oxigén homeosztázis legfőbb regulátora[155]. A hypoxia a HIF szintjét olyan módon szabályozza, hogy gátolja a HIF-1 alfa proteasomális degradációját. Ennek effektor mechanizmusa a HIF-1 alfa prolin-hidroxiláznak a hypoxiás környezetben észlelhető csökkent hidroxilizációs aktivitása[157]. A lebontás során a HIF-1alfa prolin részei hidroxilálttá válnak, ezáltal a von Hippel-Lindau faktor kötődni képes hozzá. A von Hippel-Lindau faktor az E3 ubikvitin protein ligáz felismerő komponense, ez a komplex normoxiás körülmények között gyorsan ubikvitinálja a HIF-1alfát, amit ezt követően a proteasómában lebomlik[158]. Hypoxiás környezetben a fent leírt folyamat aktivitása megszűnik, amely nagyon gyors HIF-1 alfa szint emelkedésben nyilvánul meg, amely aztán egy sor adaptív folyamatot regulál a HIF-1 target géneken keresztül[159]. HIF-1 alfa célgénjei magukban foglalnak számos olyan gént, melyek a sejtek metabolizmusának alacsony oxigénhez való alkalmazkodását regulálják, például az anaerob energiatermelés fokozása, ilyenek például glükóz transzporter 1 és 3, hexokináz 1 és 2, foszfofruktokináz L, glyceraldehyd-difoszfát stb. Emellett megemelik az oxigént szállító és produkáló faktorokat, olyat, mint az eritropoetin, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), és a VEGF receptor. Emellett számos további target génen keresztül is kifejti hatását,

amelyek pontos funkciója a mai napig nem ismert, például a transzferin, transzglutamináz 2, hemoxigenáz 1.

Az alap oxigénfüggő regulációja a hypoxia gén expresszióinak egy nagyon komplikált folyamat, amely egyéb sejt szignál transzdukciós útvonalakkal összefüggést mutat, mint például a foszfatidil-inozitol-3 kináz (PI-3-kináz) útvonallal az a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) és a kalcium kalmodulin kináz dependens útvonalakkal, melyek végső soron HIF-1 alfa szignálon keresztül protein expresszióhoz vezetnek és a DNS kötő képességét fokozzák bizonyos fehérjéknek már nem hypoxiás környezetben is[160].

A reaktív oxigéngyökök (ROS) szerepe is felmerül a HIF-1 alfa stabilizációban, amely így egyes daganatok esetén is jelentőséggel bírhat[161]. Ezeknek az útvonalaknak a fontossága a daganatok terápiás targetként is jelentőséggel bírhat.[162, 163].

Mindezeket összefoglalva, úgy tűnik, hogy az UVB szerepet játszhat a HIF-1 alfa aktivációjában és a hypoxia szignál kialakításában keratinocitákban[155, 164, 165]. Ez a feltételezésünk további támogatást nyert olyan felismerések által, hogy az VEGF mellett egyéb HIF-1 alfa target gének, például a hemoxigenáz, az indukálható nitric oxid szintáz szintén az UV fény regulációja alatt állnak[164, 166-168]. Érdekes módon újonnan végzett megfigyelések, azt mutatják, hogy a hypoxia érzékelés a HIF-1 alfán keresztül egér keratinocitákban nagyon fontos komponense a szisztémás hypoxiás válasznak, hangsúlyozva tehát a hypoxiás jelátvitel jelentőségét a szervezetben keratinociták által. Ezzel tehát nem csak bőrben, hanem szisztémás szerepe is tűnik lenni az epiteliális hypoxiás válasznak[169].

D-vitamin szerepe

Az értekezésben számos alkalommal fordul elő a keratinocita differenciációs vizsgálatoknál a D-vitamin, de nem csak emiatt tartottam fontosnak kitérni erre a hormonra a bevezetésben. A másik ok az, hogy nagyon sok közlés születik a D-vitamin alacsony szintjéhez társuló különböző betegségekről, illetve találkozunk direkt napozásra felhívó véleményekkel a populáris médiában. Ezen utóbbi vélekedés tudományos igényességű cáfolata nem kerülhető meg az értekezés témájába váltó jellege miatt. A D-vitamin az emberben különleges funkciót tölt be, hiszen a definíció klasszikus értelmében nem is meríti ki a vitamin fogalmát, hiszen szerveztünk képes ezt az anyagot akár teljes egészében

előállítani, bár a mindennapok életvitele mellett ez többnyire nem valósul meg. A D-vitamint ma inkább hormonnak tekintjük, amelynek pro-hormonját a szervezet a bőrben állítja elő D₃ vitamin formájában megfelelő napfény expozíció hatására. A D-vitaminnak két forrása van, egyrészt a napfény általi endogén szintézis, másfelől a diétával bevitt D-vitamin, amelyek együttesen megfelelő szintet kell elérjenek a szervezetben, a helyes működéshez. A napfény és a diéta közötti arány klimatikus viszonyoktól függően jelentősen változni tud[170]. Norvégia jelentős részben a D- vitamin hiány nem jelent problémát az igen kevés ultraviola sugárzás ellenére sem, hiszen nagyon sok D-vitaminban gazdag halat fogyasztanak az ott élők[171]. Ezzel együtt az utóbbi években a D-hipovitaminózis feltételezett szerepe egyre nagyobb figyelmet kap a médiában, és egyes vélemények szerint az UV expozíció fokozásával kell erre válaszolnia az embernek. Maga a D-vitamin elnevezés egy szteroid vázú molekula családot takar, amelynek legfontosabb két formája D₂-vitamin, vagy ergocalciferol, illetve a D₃-vitamin, azaz a kolekalciferol. A D₃-vitamin az ultraibolya fény hatására keletkezik a 7-dehidrokoleszterinből. Ez az anyag állatok bőrében és tejben is nagy mennyiségben fordul elő. A D-vitamin szintézis szempontjából hatékony hullámhossz a 250 – 300 nanométer közötti tartomány, lényegében az UVB tartomány. A bőrben keringő 7-dehidrokoleszterin az UV energia hatására alakul át kolekalciferollá. Ez a folyamat már egészen alacsony, 3-as UV index esetén elindul. Magasabb UV index esetén sem nagyobb hatékonyságú a szintézishez, hiszen a görbe relatíve hamar telítésbe fordul. A klasszikus D-hipovitaminózis az angolkór, rachitis, ma már ritkán látható[172]. Ez a kórkép és ez csak a D-hipovitaminózis csoport legpregnansabb megjelenése, ezen kívül kevésbé látványos módon számos betegség köthető alacsony D vitamin szinthez. Felmerült a D-vitamin háztartás zavara autoimmun betegségek, infekciók, kardiovaszkuláris betegség, illetve malignus daganatok hátterében is. A bőrben képződött D-vitamin azután a májban 25-hidroxi D-vitaminná metabolizálódik. Ezt használjuk a D vitamin szérum szintjének mérésére is. A 25-hidroxi D-vitamin ezután a vesékben 25-hidroxivitamin D-1 α -hydroxyláz (CYP27B1) enzim hatására 1,25- dihidroxi D-vitaminná alakul át. A vesében történő 1,25-dihidroxi D-vitamin szintézis nagyon szigorúan a véráramban keringő parathyroid hormon, a kalcium és a foszfor szintjében alakul. A D-vitaminnak nemzetközileg standardizált szintje nem egyértelműen van meghatározva, mindenesetre általánosan elfogadott, hogy a 20 ng/ml, illetve 50 nmol/l érték alatt beszélünk D-hipovitaminózisról. Ezen értékeket figyelembe véve becslések szerint a világon körülbelül egy milliárd ember D-hipovitaminózissal él[173-176]. Különösen veszélyeztetett az időskorú populáció[170]. Egyes vizsgálatok

szerint az európai és észak-amerikai idősök között 40-100 % közötti D-hipovitaminózis lehet megfigyelni. Sötétbőrű közösségekben, gyerekkorban és fiatalkorban is előfordulhat D-hipovitaminózis[177]. A D-vitamin elsődleges funkciója a kalcium és a foszfát metabolizmus regulációján keresztül a csontok folyamatos újraépülő funkciójának a biztosítása. Ennél lényegesen érdekesebb az utóbbi években észlelt nem csont szerkezeti funkciója a D-vitaminnak.

Az egyenlítőnél messzebb élő populációk körében egyre gyakoribb a Hodgkin-kór, a vastagbél pancreas, prosztata, ovárium, emlő malignus daganatainak a gyakorisága, ha összehasonlítjuk a egyenlítőhöz közelebb élő populációkkal[178-181]. Prospektív és retrospektív epidemiológiai vizsgálatok azt igazolták, hogy 20 ng/ml alatt 30–50%-kal fokozódik a vastagbél, prosztata és emlőrák kialakulásának veszélye, valamint ezek mortalitása is magasabb[182]. Számos vizsgálat indult e kérdés tisztázására; egy közel 1000 nő körében végzett vizsgálatnál a magas D-vitamin szint és az alacsony D-vitamin szintű csoport között 50%-os eltérés volt az emlőrák kialakulásának kockázatát illetően[182]. Daganatok esetén a helyzet azonban lényegesen bonyolultabb, a tumor kockázata és a szérumban D-vitamin szintje nem direkt módon korrelál. Ennek magyarázata, hogy a vese nagyon szigorúan szabályozza az 1,25-dihidroxi D-vitamin termelését, amely szint nem egyértelműen emelkedik nagyobb UV hatás, vagy fokozott D-vitamin bevitel mellett sem. Megfigyelték azt is, hogy D-hipovitaminózis előfordul teljesen normál, vagy akár emelkedett 1,25-dihidroxi D-vitamin mellett is[174, 183, 184]. Ennek egyértelmű magyarázat -, melyet számos referencia támasztja alá -, hogy a vastagbél a prosztata, az emlő és egyéb szövetek daganatai 25-hidroxi D-vitamin d1alfa hidroxilázt expresszálnak, és így 1,25-hidroxi D-vitamint termelnek túlélésükhöz. A vizsgálatokból az tűnik ki, hogy egy sejt malignussá válásakor az 1,25-dihidroxi D-vitamin apoptózist képes indukálni és ezért újdonszerűen képes indukálni, ezáltal a sejt esélyét a túlélésre jelentősen képes csökkenteni. Miután ez megtörtént maga az 1 – 25 dihidroxi d vitamin stimulálja a CRIB 24 gén indukcióját, amely az inaktív kalcitriol savvá bontja le. Ez garantálja, hogy az 1 – 25 dihidroxi D-vitamin nem kerül be a keringésbe, hogy a kalcium háztartásra jelentős hatással legyen.

A malignus tumorok mellett egyéb betegségek is ismertek, amelyek szintén D-hipovitaminózis számlájára írhatónak tartanak. Ezek közé tartoznak autoimmun betegségek, reumatológiai betegségek és a diabetes, de emellett a skizofrénia és a depresszió hátterében is felmerült az alacsony D-vitamin szerepe. A fenti logikából következően a D-vitamin pótlása szükséges lehet akár az élelmiszerek D- vitamin

gazdaggá tételében, például az USA-ban árult tej esetén, illetve táplálék kiegészítők fogyasztásával. Napi 200 IU D-vitamin ajánlott gyermekeknek és felnőtteknek 50 éves kor alatt, 400IU 51 – 70 között és 600IU 71 év fölöttiek számára. Azonban ha ez nem átlagos fokú napfény expozícióval párosul, a szükségletek akár meg is duplázódhatnak. A legköltséghatékonyabb megoldás, hogyha heti 50.000 IU tartalmú D₂ vitamint kap a páciens heti egyszer két hónapig, majd ezt követően minden második, vagy harmadik héten. Emellett főleg Amerikában elterjedt gyakorlat a tej és a narancslé D-vitaminnal történő kiegészítése[185, 186]. A napfény expozíció szerepe ebben a D-vitamin háztartás pótlásában kérdéses. Ha a napon tartózkodás hosszát józan, mértéktartó módon választjuk meg, a szervezet nyári időszakban bőséges D-vitamin készletet képes előállítani és azt a zsírban tárolni, mely aztán a téli időszakban a véráramba kerül. Ehhez elegendő a kezek és a lábak 5–30 perc közötti napfény expozíciónak való kitétele 10 óra és 15 óra között, heti összesen két alkalommal. Az egy MED-nek megfelelő napfény expozíció egy fürdőruhát viselő embernél körülbelül 20.000 IU D-vitaminnak felel meg[187, 188]. Ezzel együtt a D-vitamin pótlására elsődlegesen javallott módszer a táplálék kiegészítők, a D₂ és D₃-vitamin per os fogyasztása, amely mellé józan mértékben élvezett UV hatás elégséges lehet[189]. Semmiképpen sem javallott az excesszív napozás, illetve a mesterséges UV források használata a D-vitamin pótlására, hiszen ezeknek bőrdaganatokat keltő hatása egyértelműen igazolt.

A keratinociták terminális differenciációja

Ahogy azt korábban már említettük, a terminális differenciáció az a folyamat, amely során az élő keratinociták elhalt korneocitákká válnak. A korneociták már sejtmagot nem tartalmazó aktív funkciókkal nem bíró sejtek, alap építőelemei a stratum corneumnak.

A szaruréteg kialakulása, ezzel együtt, nemcsak a sejtes szerkezet átépülését jelentik. A barrier kialakulásához szükségszerűen elvárt a lipid struktúra megváltozása, hogy egy erőteljes vízhatlan barrier jöheszen létre. Ezek után nem meglepő, ha kijelentjük, hogy a jól funkcionáló epidermális barrier, a lipid struktúra átépülését és folyamatos újräépülését is feltételezi. A terminális differenciáció elsődlegesen fehérjék szintjén valósul meg.

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 sejtei között találhatóak az epidermális őssejtek és a

tranzit amplifikáló sejtek. Az igazi őssejtek nagyon alacsony számban találhatóak meg a bőrben, feladatuk a genetikai integritás maximális védelme és csak esetenkénti oszlás. A tranzit amplifikáló sejtek szerepe a későbbi sejtoszlás számára megteremteni azokat az utódsejteket, amelyek aztán a terminális differenciáció folyamatában részt vesznek[190]. A tranzit amplifikáló sejtek magas mitotikus aktivitással bírnak és a bazálmembránhoz kötöttek. A differenciáció első lépéseként az utódsejtek elvesztik a kapcsolatukat a bazálmembránnal, a hám stratum spinosumába lépnek. A terminális differenciáció során a sejtek ellapulnak, és jellegzetes differenciációhoz kapcsolható fehérjék expressziója indul meg, ezek közül legismertebbek az 1-es és 10-es keratin. Ezzel párhuzamosan a citoskeleton is átrendeződik. A stratum granulosumban indul a keratohialin granulumok kialakulása, amelyekben képződnek azok a keratinok, amelyek majd a keratinfilamentum hálózatot alkotói lesznek. A keratinfilamentumok úgy jönnek létre, hogy az egyes fehérjeszálakat a transzglutamináz I. enzim Ca^{2+} -függő módon rögzíti kovalens keresztkötésekkel oly módon, hogy a glutamin és lizin csoportok között izopeptid kötést hoz létre[191]. Az így képződött kovalens kötés proteolízissal gyakorlatilag bonthatatlan, erős lúgos kémiai anyagok képesek csak a kötések elroncsolni.

A terminális differenciáció során a DNS lebomlik, a sejtorganellek szétesnek, a plazmamembrán helyett kornifikált sejtburok (cornified envelope) alakul ki[192] és ceramid szabadul fel a lamelláris testekből[193]. Az elszarudosott réteg, a stratum corneum már elhalt sejtekből áll, amelyek aztán lehámlanak a bőr felületéről.

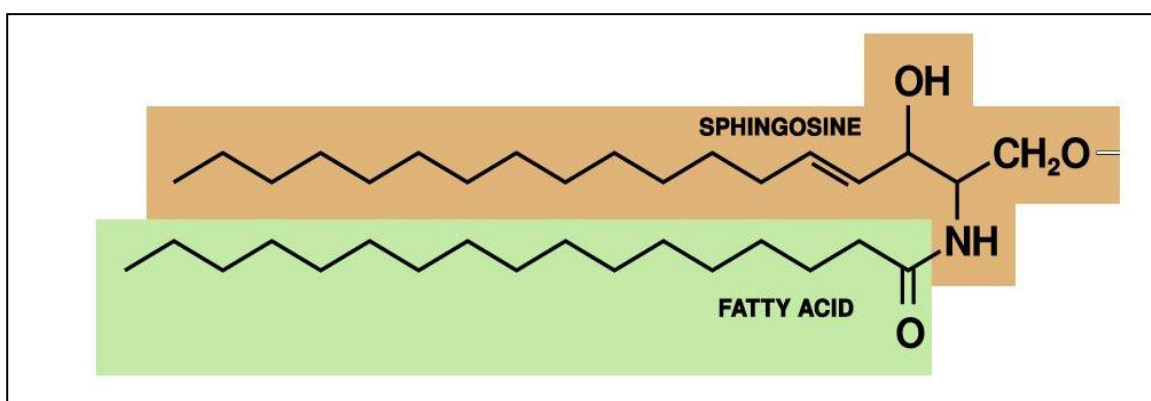
A bőr lipidjei

A stratum corneum által létrehozott barrier kialakulásához szükségszerűen elvárt a lipid struktúra megváltozása, hogy egy erőteljes vízhatlan barrier jöheszen létre. Ezek után nem meglepő, ha kijelentjük, hogy a jól funkcionáló epidermális barrier a lipid struktúra átépülését és folyamatos újraépülését is feltételezi, így a keratinocita differenciációja jelentős lipidváltozásokkal is együtt jár. A folyamat során a nagyon hosszú szénláncú

zsírsavak felgyülemzése figyelhető meg. Felszaporodik a koleszterin-szulfát, a nem-észterifikált koleszterin és a szfingolipidek, parallel a gricelofosfolipidek, trigliceridek és a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak arányának a csökkenésével[194]. A szfingolipidek a stratum corneum lipidjeinek kb. 50 %-át alkotják, elsődlegesen ceramidok formájában[194-196]. A ceramidok a lipidvegyületek egy családja, felépítésükre általában jellemző, hogy egy szfingozinból és egy hozzá amid kötéssel csatlakozó zsírsavból állnak. A ceramidok a sejtmembránban találhatóak nagy számban. A membránban a

szfingomielinbe felépítésében játszanak szerepet, maga a szfingomielin egy ceramid magból és egy poláros foszfokolin vagy fosztoetanolamin részből áll, amelyik a molekula fejéhez csatlakozik.

A ceramidok glicozil-ceramidokká konvertálódnak a ceramid glikozil-transzferáz enzim hatására a célból, hogy a lamelláris granulumokban akkumulálódjanak[197]. Ennek a folyamatnak nem minden eleme ismert, de egy aktív transzport folyamat szükségesnek tűnik lenni, amely sejtközi térbe juttassa a lamelláris test granulumok tartalmát[198, 199] A ceramidok gyors előállítása a stratum granulosum - stratum corneum határán történik



1.11. ábra. A ceramidok felépítése. Egy szfingozin lánc és a hozzá amid kötéssel kapcsolódó zsírsav. forrás: www.wikipedia.org

glikozilceramid és szfingomielin hidrolízise által, majd azután a ceramidok kiszabadítása történik meg a stratum corneumban a ceramid pull hidrolízise által[196, 200, 201]. Az epidermális lipidek számos fehérjével együtt elsődlegesen a lamelláris test granulumokban vannak felhalmozva a stratum granulosum területében. A pontos mechanizmus ezen lipid depozitumok létrejöttéhez még mindig vita tárgya. Elsődlegesen egy aktív transzportot feltételeznek, amely során az intersticiális térbe jutnak ezek a lipidek, hasonlóan a lizoszómákhoz. Ennek a folyamatnak az eredményeképpen jön aztán létre a korneociták között fölépült lipid mátrix. Bár ez a folyamat kevésbé energiafüggő, mégis a különleges lipid lamelláris szerkezet létrejöttének ez áll a háttérében. A ceramidok egyik leginkább vizsgált tulajdonsága az apoptózis indukáló hatásuk. A ceramidok felszaporodása észlelhető olyan hatások eredményeképpen, amelyek ismertén apoptózist indukálnak. Ezek közé tartoznak az ionizáló sugárzás[202], az UV sugárzás[203, 204], a TNF alfa, és a kemoterápiás szerek[203, 205]. 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.

Fehérjék és lipidek a terminális differenciációban

Mint a fentiek alapján kiderült, a terminális differenciációban a fehérje és lipid komponensek jelentős fokban összehangolt változásaira van szükség tökéletes időzítéssel a normális elszarusodás, az orthokeratosis megvalósulásához.

Kitűnő példája a kölcsönös egymásra utaltságnak, ami a mechanikai fehérjék alkotta, illetve a vízellenálló barrier lipid réteg kialakulását jelenti. A lamelláris ichthyosis 1. és 2. típusában észlelt meglepő klinikai hasonlóságok. A lamelláris ichthyosis egyes kórképeiért a transzglutamináz I[206]. és az ABCA12[207] gén a felelősök. A transzglutamináz I. az az enzim, amely kovalens kötésekkel a fehérjéket összekapcsolja, amíg az ABCA12 egy olyan transzporter fehérje, amely a szfingolipidek epidermiszbe jutását segíti elő. Egyes bőrgyógyászati betegségek, mint az atópiás dermatitis, a psoriasis, illetve egyes genodermatosisok esetén keratinociták differenciációja mutat zavarokat. Hasonló zavarokat idéz elő az akut UV károsodás és a gyógyszeres kezelés. Ezek közül érdeklődésünknek megfelelően elsődlegesen az UV-sugárzás barrier funkcióra mutatott kedvezőtlen hatásai voltak érdekesek. Ismert tény, hogy a napozás hatásra a bőr megvastagszik, elsődlegesen az epidermisz hyperproliferációja révén és ebben a folyamatban a transforming growth factor (TGF) alfának szerepe van[208, 209]. Egyes közlések szerint a bőr permeabilitására, a hyperproliferációra kifejezett hatással van az UV sugárzás[210, 211]. Az oxidatív stressz szerepét is leírták az Alzheimer-kór patogenezisében, ahol a ceramid és koleszterin metabolizmus a ROS által károsodik és vezet neurodegeneratív betegségekhez[212].

A fent leírt károsító hatások eredményeképpen a lipidek és ezáltal az epidermisz barrier funkciója zavart szenved. Emellett a barrier funkció szerves oldószerekkel való megváltoztatása szintén a keratinocita differenciációt befolyásoló tényezőként kerül leírásra[213]. Az epidermisz barrierjének kialakulása tulajdonképpen egy jól kontrollált transzkripcionális változás-sorozat kell legyen, amelyek során a hámsejt érése fokozatos lépcsőkön keresztül valósul meg. Ebben a folyamatban a barrier lipidek a szfingolipidek

szintén reguláló funkcióval bírnak[214, 215].

Az 1990-es évek végén került felismerésre, hogy a szfingolipidek szerepe a membránban a jelátviteli útvonalak szempontjából is jelentőséggel bír[216]. Korábban is ismert volt a koleszterin és a glicerofosfolipidek, szfingomielin és a szfingolipidek közötti kapcsolat[217], de a sejtmembránban úszó tutajok (raftok) mint önálló morfológiai egység felismerése csak ekkor történt meg[216, 218]. Ezek a membránban elmozdulásra képes struktúrák a jelátviteli útvonalak működése szempontjából bírnak különleges jelentőséggel[219, 220]. Lényegük, hogy a jelátvitel szempontjából fontos fehérjék számára képeznek kötődési platformot[216, 221].

Bár a keratinociták differenciációjának szabályozása extenzíven került vizsgálatra és rengeteg információ gyűlt fel a p63[222, 223], az NF-kappaB[224-226] a homeobox transzkripciós faktorokról és magi hormon receptorokról ebben a folyamatban, az egész szabályozási folyamat pontos dinamikája az epidermiszben mind a mai napig nem ismert. Korlátozottak az ismereteink azokról a molekulákról, amelyek a keratinocita differenciációját szabályozzák és azoknak a géneknek a listája sem teljes, amelyek expressziójuk változásával keratinocita differenciációban részt vesznek.

A fiziológiás keratinocita differenciáció epidermális barrierben betöltött szerepének ismeretében nem meglepő, hogy a keratinocita differenciációt módosítani képes ágensek ma fontos gyógyszereink. Ilyen mechanizmussal hatnak a D-vitamin analógok, és a retinoidok, így kísérletes modellünkben is ezeket alkalmaztuk kontrollnak.

3. Célkitűzések

A 2000-ben védett PhD munkám folytatásaként tovább foglalkoztam azokkal a hatásokkal, amelyek Trp53 változásokhoz vezetnek, az apoptózis szerepét vizsgálják és annak regulációjában résztvevő folyamatok további részleteit tárják fel. Jelen doktori értekezésemben természetesen ennek egy szélesebb kontextusba helyezett megközelítését ismertem, 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 Trp53 szerepe a bőrben

fiziológiása és a tumorok kialakulása szempontjából is egyértelmű, így kézenfekvő volt p53 mutációinak kialakulásának egészen korai stádiumait is vizsgálnunk. A kísérletes munkában sikerrel állítottunk elő olyan „molekuláris szintű tumorokat”, p53 mutációt hordozó sejtszöveteket, amelyek esetén vizsgálni tudtuk, 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 lipidek, 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 sejtszövetek egy olyan kísérletes rendszerben, ahol a hámsejtek lapszerinti növekedésüket tudjuk vizsgálni?
3. A Trp53 pozitív sejtszövetek adaptív immunitás hiányában más dinamikával jellennek-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 expressziójában DNS-microarray technikával vizsgálva.
7. A keratinocita differenciáció szempontjából fontos génekről tenyésztett primer humán keratinocitákon vizsgáltuk, hogy milyen eddig ismeretlen gének expressziója változik? A jelentős változásokat mutató gének közül a potenciális dermatológiai érdekességet mutatóak esetén az észlelt változások kvantitatív reverz transzkriptáz PCR-rel és immunhisztokémiai reakcióval is relevánsnak mutatkoznak-e?
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?

4. Anyagok és Módszerek

Az egyes vizsgálatokban számos módszer ismétlődik, így elsődlegesen a kísérletek kivitelezése szerinti csoportosításban ismertetjük őket. Alább tárgyaljuk a vizsgálatainkban használt modellrendszereket, bemutatjuk a kísérletek során végzett beavatkozásokat, kezeléseket és végül az értékelésben használt makro-, mikro- és molekuláris morfológiai módszereket ismertetjük.

A közleményekben klinikai kutatási anyagok, *in vivo* és *in vitro* humán és egereken végzett vizsgálatok eredményei szerepelnek. A humán vizsgálataink számára a betegekből vagy egészséges önkéntesek vér és bőrmintái szerepelnek, kizárólag csak vizsgálati célra nem történt bőr mintavétel. A beavatkozás előtt a páciens, illetve törvényes képviselőjét szóban és írásban minden esetben is tájékoztattuk, hogy a minta tudományos vizsgálat tárgya lesz, amibe szóban és írásban is beleegyezését adta. Az állatokat az egyetemeken ilyen irányú

szabványa szerinti körülmények között tartottuk és láttuk el. Feláldozásuk általános anesztéziában történt. A tanulmányok mindig az illetékes egyetem és kutatóintézet (RIVM, Semmelweis Egyetem, Yale Egyetem) megfelelő etikai bizottságainak írásos engedélyezése után zajlottak. Ezek pontos adatait az értekezés tárgyát képező közlemények részletesen tartalmazzák.

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 a rutin hisztológiai diagnózis felállítása után, az archívumban lévő blokkokból történő metszetek készítése után szereztük be.

A populációgenetikai vizsgálatokra a DNS-t limfocitákból izoláltuk[227] 96 egészséges random szelektált páciens anyagát használva. Emellett DNS-t 356 normál bőrből és 180 non-melanoma bőrtumorból is szeparáltuk. Tumorok esetén a diagnózist patológus szakorvos állította fel. A mikrodisszekcióhoz 1,0mg/ml proteináz K-val emésztettük a mintákat (Boehringer Mannheim, Mannheim, Németország) 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 mintái perifériás vérből származtak, ezeket elsőként lízis pufferben inkubáltuk (115 mmol/l NH₄Cl, 10 mmol/L KHCO₃ és 0,1 mmol/ EDTA) majd a mintákat 1% SDS és 0,1mg/ml proteináz K jelenlétében 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[228], az Xpc[229] és a Csb[230] knock-out egerek az eredeti közleményekben található leírás szerint kerültek megalkotásra, és kollaboráció keretében kerültek laboratóriumunkba.

A Trp53^{-/-} és RAG-1 egerek kereskedelmi forrásból, a Jackson Laboratory, (Bar Harbor, ME, USA), és Taconic Farms (Germantown, NY, USA) cégektől vásároltuk, illetve az Erf1^{-/-} egereket S. Fieldtől (Childrens Hospital, Boston MA, USA) ajándékba kaptuk. A

transzgén K5 *E2F1* közepes overexpresszáló 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.[231]

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

Az egerek genotípusát a kísérletek előtt PCR-ral ellenőriztük, 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 leborotváltuk, hogy az esetleges minimális hámsérülések így regenerálódni tudjanak. Az állatok megnyírását általános érzéstelenítésben végeztük, amihez ketamine –rompun – atropin (AUV, Inc., Cuyk, Hollandia), ill. isofluorane (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) anesztéziát használtunk. Az UV-kezelések a szőr eltávolítását követő nap délelőttjén végeztük 9 és 10h 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 fókuszbőr távolság végig egyenletes maradjon a besugárzás időtartama alatt. A dozimetria természetesen ennek a rácsnak a figyelembevételével történt. Az állatok 24h elteltével teljes anesztéziában cervikális diszlokációval eutanázián esték át, és a hátbőrüket dolgoztuk fel szövettani technikákkal.

Sejt- és szöveti minták

Primer humán keratinocita kultúra:

A fent részletezett forrásból származó mintákat a dermiszt az epidermisztől dispáz II enzim (Roche Diagnostics, Germany) 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 Reinwald és Green módszere szerint[232]), 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, transferrin, 1% Fungibact hozzáadása volt szükséges. A tápfolyadékot három naponta 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 szedték felt, majd KGM médiumban 3T3 sejtek nélkül tenyésztették tovább.

A diszpáz emésztés után a keratinocitákat tripszines-EDTA segítségével lehetett kinyerni a hámból. Az így kapott sejtszuszpenziót KGM médiumban tenyésztettük (Clonetics BioWhittaker, San Diego, CA) vagy Epilife (Cascade Biologics, Portland, OR) szérummentes médiumban tenyésztettük.

A tápfolyadék cseréjekor a primer humán keratinocitákhoz vagy a tesztvegyületet vagy az oldószerét, alkoholt adtunk, az etanol 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 flaskával használtunk a megfelelő RNS mennyiség előállítására.

HaCaT sejt kultúra

A primer keratinocita kultúra mellett HaCaT humán spontán immortalizált keratinocita vonalat használtuk, amelyet Norbert E. Fusenig-től szereztünk be[233]. A tenyésztéshez 10% FBS-t tartalmazó DMEM tápfolyadékot használtunk (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 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 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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 csészék négy óráig hipoxia kamrában tartottuk (Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, CA, USA), ahol a keverék összetétele 1% O₂, 5%CO₂ és 94% N₂ volt.

Molekuláris szintű minták

DNS szeparálás:

A DNS izolálása teljes vérből, illetve a mikrodisszekcióval végzett PCR vizsgálatnál 20 µm vastagságú szövettani metszetek deparaffinálásával nyert anyagból történt.

Többféle módszert alkalmaztunk: a genomiális DNS kinyerése a TRIzol (Life Technologies) reagens protokolljában leírtak szerint az RNS szeparálás után maradt fenolos fázisból. Fenol- kloroform módszer segítségével (fenol:kloroform:izo-amilalkohol (PCI, 26:25:1)) is extraháltunk mintákat. A kisózásos eljárással 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 (QUIAGEN), illetve automata DNS szeparáló automatával is végeztünk izolálást.

RNS szeparálás

A totál RNS szeparálása a perifériás vér limfocitáiból és a sejtenyészetből RNAasy kittel (QUIAGEN), vagy Chomczynsky és Sacchi módszerével[234] TRIzol reagens (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával történt a gyári előírásoknak megfelelően. Az izolátumokat DNS mentes DN-áz emésztésnek tettük ki gyári kitet használva (DNase Treatment and Removal kit, Ambion Austin, TX, USA). 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 és a neomycinre kazettára 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 keverés, 5 pmol primer (biotin-5'-GT GGT GAT GGG CTG GCA GTA-3' és 5'-CCC CAG AGA AGG CTT GTG GC-3') valamint 1,25U of AmpliTaqGold DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, U.S.A.).

Klón mikrodisszekció 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 pozitívan festődő sejteket mechanikusan szeparáltuk el a környező szövetektől. A sejtcsoport mérete 15–500 sejt volt 100 és 2000 közötti sejtet tartalmazó klónból. A DNS

izolálására InstaGene Matrix (Bio-Rad) került felhasználásra. A teljes DNS amplifikálására elsőként semirandom nonamer primert használtunk az alábbi szekvenciával: 5'-NNNNNN(G/C)(G/C)(G/C)-3' in 2.5 µl 10 X Expand High Fidelity pufferben (15 mM MgCl₂, 7,8 µl H₂O, 2,5 µl 2 mM dNTPs, 1,2µl primer (2,5 µg) 1µl (3,5 unit) Taq DNS polimeráz és hibajavító polimeráz (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics) 10 µl templát DNS (2 ng)[235]. A PCR egy PTC-100 PCR készülékkel történt (MJ Research, Cambridge, MA). A paraméterek az alábbiak voltak: 1 lépés (60°C 3min, 94°C 5 min); 40 ciklus (2.9 min rámpa 94°C/94°C10sec/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'-AAGAGGTGACTTTGGGGTGAAG-CTC-3' voltak, a reakcióhoz használt enzim: HotStartTaq DNS polimeráz (Qiagen, Chatsworth, CA) 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.

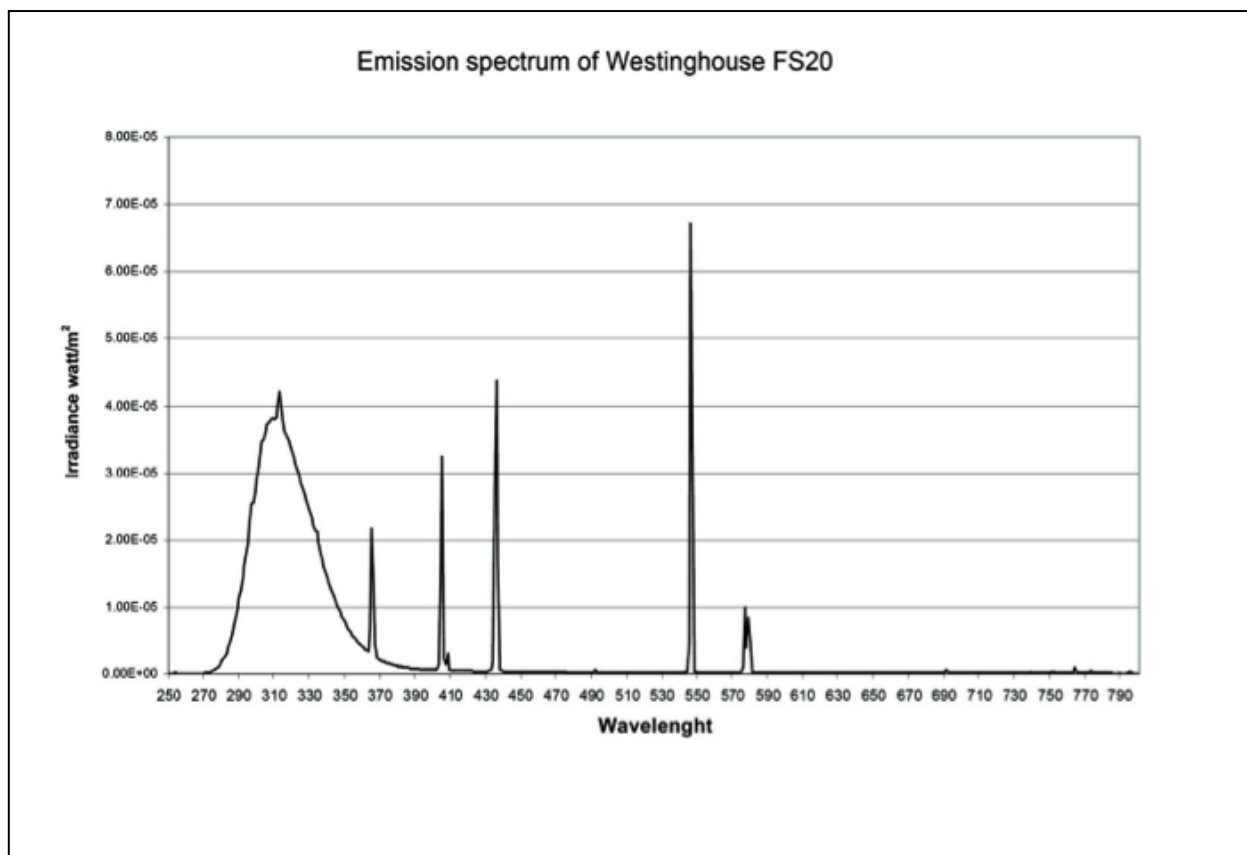
Epidermális lemezek készítése:

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 acetonban 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 fénycsöveket használtunk, amelynek az emissziós spektrumát a 4.1-es ábrán mutatjuk be. A 290 nm alatti tartományt Kodacell filterrel (Kodak, Rochester, NY, USA) szűrtük ki.



4.1. ábra A besugárzáshoz használt fényforrás emissziós spektruma. A 290 nm alatti tartományt Kodacell filterrel szűrtük ki.

Dozimetria

Az ultraibolya fénnnyel végzett vizsgálatoknál kritikus a megfelelő dozimetria. Ezért a besugárzások előtt minden alkalommal mértük a lámpák emisszióját egy UVX meter (UV Products, Upland, CA) ill. egy másik kísérletsorozatban egy VLX-3W radiométerrel, ami CX-312 szenzorral volt felszerelve (Vilber, Lourmat, Franciaország)

Fixálás, anyagok:

Minden humán forrásból származó szöveti mintát 10% pufferolt formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk és poli-L lizinnel vagy xilánnal bevont tárgylemezekre 4-6 µm-es metszeteket készítettünk. A friss minták egy részét OCT-be ágyztuk, a folyékony

nitrogén gyors-fagyasztás kriosztátban történt, majd a blokkot bevont tárgylemezre metszettük, acetonban fixáltuk.

Egér bőrok fixálására Telly-féle fixálót használtunk[236] (100ml 70% etanol, 5ml ecetsav, 10ml 40% formalin).

Differenciációt indukáló szfingolipidek

Retinol (Ret) és Calciferol (VD3) a Sigma-tól származtak (St. Louis, MO, USA). 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 promoter kontrollja alatt áll[237] A transzfekcióhoz Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) használtunk.

Citotoxicitási vizsgálat

A szfingolipidek különböző vegyületeit alkoholos oldatban vittük be a sejt kultúrába. Pozitív kontrollként hidrogén peroxid és Na-laurilszulfát szolgált, (Sigma-Aldrich, MO, USA) A tesztanyagok az alábbiak voltak: retinol és calciferol (Sigma,) fitoszfingozin, szfingozin, szfinganin, szalicilát, hexanoil-fitoszfingozin, hexanoil-szfingozin, hexanoil-szfinganine, sztearoil-fitoszfingozin, sztearoil-szfingozin, sztearoil-szfinganine, szfingozin-szalicilát, szfinganine-szalicilát, fitoszfingozin-szalicilát, C12-alkilamin, C12-alkilamin-szalicilát (Evonik-Goldschmidt GmbH, Essen, Németország)

Az értékelésben használt technológiák:

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[238] használtuk, amelyhez ApoBrdU Red DNA Fragmentation Kitet (BioVision, Inc. San Francisco, CA, USA) 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 eltávolításra 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 leszuszpendálva 1 % FCS-t tartalmazó PBS-ben. Ennek az oldatnak 500 mikroliteres frakciói voltak áramlási citometriás csövekbe helyezve és vizsgálva. Az áramlási citometriai analízis az apoptózis irányába az Annexin V, (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) illetve a propidium jodid metódus szerint történt. A festéséhez használt kit a Roche cégtől került beszerzésre és a gyári eljárások szerint jártunk el. Magát az áramlási citometriás mérést egy Becton-Dickinson FACScan készüléken végeztük (Franklin Lakes, NJ, USA).

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 paraffinba ágyasztuk, metszettük és hematoxin – 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 eozinofilen 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. Az endogén peroxidázt 0,15%-os H_2O_2 -val blokkoltuk, majd a nem-specifikus kötődéseket normál kecske szérum 3% BSA-PBS oldattal védtük ki. Az elsődleges antitest nyúl polikonális antitest volt CM-5 (Novocastra, Newcastle, U.K.), 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 (Vector Laboratories, New Jersey, USA), amit 3% BSA-PBS-ben hígítottunk, majd PBS-ben mostunk. A reakció vizualizálására diaminobenzamid ABC reagens kitet (Vector Labs. New Jersey, USA) használtunk DAB reagenssel (Research Genetics, Huntsville, AL, USA) 14 percen át.

Immunoblot analízis

A mintákat Laemmli-féle felviteli pufferben tartottuk 5 percig, majd a mintánként azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó oldatot 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 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) való inkubálás után másodlagos antitestként torma peroxidáz jelölt anti-egér antitesteket használtunk (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Az antitesteket aztán kemilumineszcens reagenssel (Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) tudtuk láthatóvá tenni Rtg filmen. A megfelelő protein felvitel Ponceau-red festéssel került igazolásra.

Anti-phoszfo-AKT (Ser 473) és anti-AKT antitesteket a Cell Signaling Technology cégtől (Beverly, MA, USA) szereztük be.

Direkt szekvenálás:

A PCR termék dideoxinukleotid lánc-terminációs szekvenálás Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (United States Biochemical)[239] S dATP (Amersham) segítségével történt.

Pyroszekvenálás

A betegek tumorából, vérből és a kontrollcsoport vérmintáiból pyroszekvenálás módszerrel került feldolgozásra[240] Az ehhez szükséges templátot egy MBS automatával gyártottuk le. (Magnetic BioSolutions, Stockholm, Sweden). A biotinilált PCR termék streptavidinnel bevont super paramagnetikus gyöngyökre került lekötésre (Dynabeads M280; Dynal, Oslo, Norway) 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 reszuszpendáltuk (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'). A real-time pyroszekvenálást egy automata 96-lyukú PyroSequencer készülékkel végeztük az enzimeket és szubsztrátokat LucKit SNP 96 felhasználásával kaptuk. (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden).

A citotoxicitás értékelése

A citotoxicitási vizsgálatot az LDH, az adenilát kináz, és a sejtek ATP koncentrációjának mérésére alapoztuk. Az LDH aktivitását a sejt kultúra felülszójából és a letapadt sejtekből is NADH konverzió alapuló spektrometriával határoztuk meg, az LDH felszabadulást a két mérés aránya alapján számoltuk ki[241]. Az adenilát kináz esszéhez és a sejt ATP tartalmának meghatározására ToxLight and ViaLight plus kitet használtunk (Cambrex, Rockland, ME, USA). Minden fenti eljárást a gyártó utasításai alapján végeztünk. A sejtek fehérjetartalmát Bradford módszerével határoztuk meg[242]

DNS microarray

A génexpressziós profilokat az Affymetrix HGU133+2.0 gén chip (Affymetrix, Santa

Clara, CA, USA) 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 időpontot és kezelés esetén, kivéve a nem kezelt kontrollokat az első és a negyedik napon, amikor is 2 chipet hibridizáltunk ugyanabból a donorból származó, egymástól teljesen különválasztott sejt csoportból. A gén chip esszét és kezdeti analízist egy korábban publikált módszer szerint végeztük[243]. A microarray eredmények validálására kvantitatív PCR-t végeztünk 20 gén esetén, két függetlenül végzett méréssel.

Real-time RT-PCR (TaqManTM) analízis

Real-time reverz transzkriptáz (RT)-PCR analízist optimalizált Assays on Demands (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) használatával végeztünk a korábban leírt módon[243]. Az alábbi esszéket használtuk: filaggrin (Hs00863478_g1), involukrin (Hs00846307_s1), transzglutamináz 1 (Hs00165929_m1) and korneodezmozin (Hs00169911_m1).

Promoter extrakció

Minden vegyülethez különböző fokban expresszált gének csoportjait (up- vagy downregulált) készítettük el csoportonként 150 gént szelektálva a legmagasabb változást mutató gének közül > 1.3) amelyeket növekedett vagy kissé növekedett csoportoknak nevezünk el. 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, sfingozin, hexanoil-szfingozin, sfingozin-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 [244], 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 (TF)-kötő helyek promoteren belüli számítógépes azonosítása

A transzkripció faktor lehetséges (TF)-kötő helyeinek promoteren belüli számítógépes azonosítása a Match[®] program segítségével történt, amely a teljes TRANSFAC[®] könyvtárat használja (Library of Positional Weight Matrices (PWM) from TRANSFAC[®] database)[245-247]. A TRANSFAC adatbázis a TF-ok kötőhelyeik adatait tartalmazza promoterekben és enhancerekben eukariota gének esetén, továbbá a PWM-ek könyvtára, mely különféle transzkripció faktorok kötőhelyeinek komputer által értelmezhető modelljeit tárolja. A Match[®] program végigfuttatja a PWM-et a szekvenciákon, minden pozícióban értékeli a kötődést, és megpróbálja megjósolni a TF-kötő helyet, ha a kötődés ereje egy beállított érték felé megy[246]. A jelen vizsgálatunkban a matrix score határok (cut-offs) minimális fals-negatív értékre (minFN) voltak beállítva, amely minden PWM-re más értéke 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[248] 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 a 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. A CMA módszer további leírására utalunk korábbi közleményekre[248, 249].

Kompozit promoter modellek (CPM) előállítása

Korábban számos publikációban a promoterek összetett struktúráinak analízisére tett próbálkozások meggyőző kísérletes megerősítést kaptak. A kompozit modulok használatával társuló kötőhelyeket lehetett találni a sejtciklusban fontos E2F transzkripció faktornak[250], 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 (Biorad) egy E. Cyclor real time PCR géppel (Biorad). A taqman univerzális PCR master mix-el, vagy Cybr zöld PCR master mix-el applied. CDNS az 1,25 nanogramm RNS-ből volt használva minden reakcióhoz. A génspecifikus Taqman próba és primer keverék az ABI-től volt beszerezve.

Minden mérés 25 mikroliteres térfogatban történt 3 mintával humán béta aktin MRNS szint volt használva a normalizáláshoz. Az adatfeldolgozás DDCT módszer 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 szoftvert v1.62-t 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. StatsDirect Ltd., Cheshire, UK). A Wilcoxon matched-pair signed-ranks teszt-et 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 (SAS Institute, Cary, NC, USA) rendszert és a SPSS 7.5 for Windows-t is használtunk.

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 számítást is végeztünk.

A DNS szekvencia megállapítása Chromas program 2.31-et használtunk. A DNS bázissorrendeket az NCBI adatbázisban (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) ellenőriztük.

5. Eredmények

A Trp53 szerepét az apoptózisra és sejtciklus szabályozására non-melanoma bőrrákok esetén már a PhD értekezésemben vizsgáltam. Az akkori munkák során igen sok kérdés tisztázatlan maradt a Trp53 működésével kapcsolatban, így ezen problémák egy részének további megválaszolását szükségesnek éreztük.

Elsőként a Trp53 indukciójának vizsgálatát tűztük ki célul azzal a szándékkal, hogy információt kapjunk az indukciójához szükséges szignál kiindulási helyéről.

5.1 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

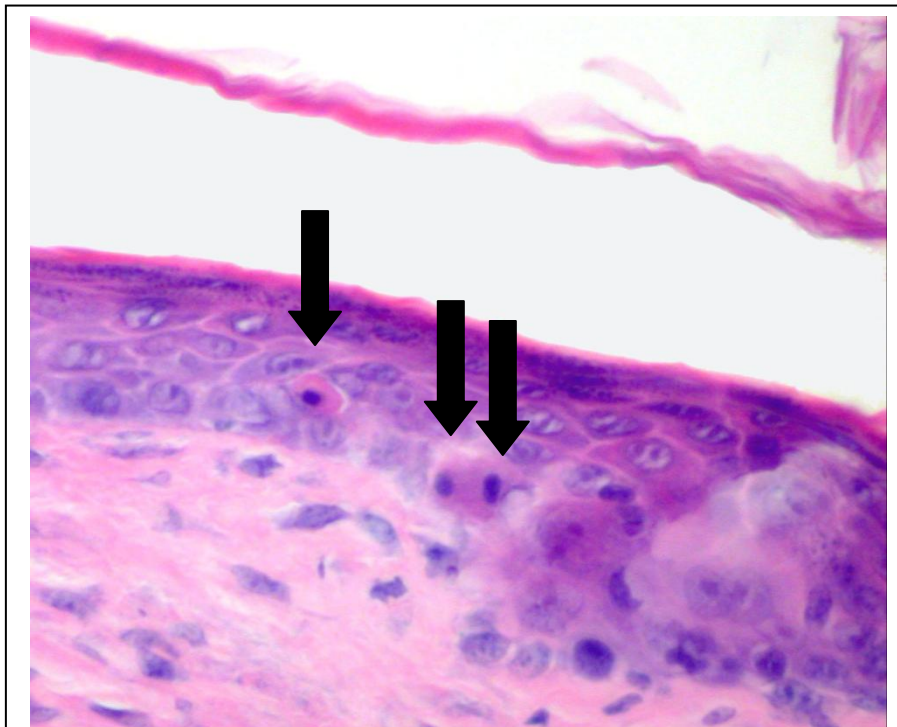
5.1.1 A sunburn-sejtek kialakulása bőrben

A Trp53 legfontosabb funkcióinak egyike az apoptózis indukciója. Az apoptózis a bőrben jellegzetes morfológiájú sejteket eredményez, ezek a sunburn-sejtek, amelyek HE festés után jól vizsgálhatóak az epidermiszben. A sunburn-sejtek gyakorlatilag biológiai doziméterként is értelmezhetőek, hiszen adott mennyiségű, szignifikáns, de nem letális dózisú UV hatás után alakulnak ki[251]. A sunburn-sejtek az Anyagok és Módszerek fejezetben tárgyalt módon objektíven értékelhetően jelzik a Trp53 indukciójának fokát.

Vizsgálataink során különböző génekre nézve knock-out egereken vizsgáltuk az apoptózis-készséget egyszeri adott dózisú UV besugárzás után. Az irradiációt követően 24 órával az egereken teljes anesztézia után eutanáziát hajtottunk végre, majd a hátbőrüket preparálva metszeteket készítettünk, és HE festés után fénymikroszkóppal számoltuk az epidermisz egy centiméterére eső sunburn-sejtek számát.

A sunburn-sejtek jellegzetes morfológiáját a 13-as képen mutatjuk be. A morfológiában kiemelt jelentőségű a piknotikus, erősen bazofílen festődő sejtmag, a sejtet körülvevő elhatárolódás a szomszédos sejtektől, a „halo”, az erősen eozinofil citoplazma, vagy az esetek egy részében csak egy eozinofil struktúra nélküli zsákszerű képlet. Normál hámsejtek magjában egér Trp53 fehérje elleni antitesttel, majd immunperoxidáz jelöléssel csak igen alacsony szinten detektálható a Trp53 fehérje mivel annak félélet-ideje 30 perc körül van[252], UVB besugárzás után 24 órával azonban erős nukleáris jelölődés látható,

világos, közepes és sötétbarna festődést adva, ami 72 óra múltán eltűnik. Az erősen pozitívan festődő keratinociták száma a hám hosszára megadva kvantitatív értékelést tesz lehetővé.

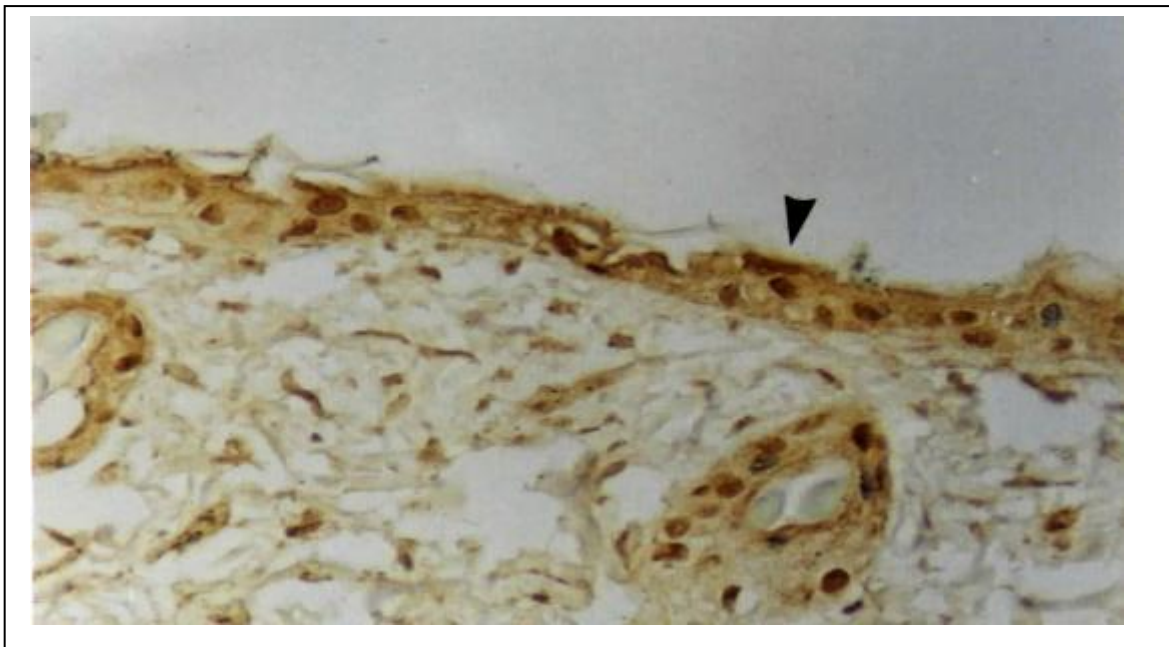


5.1.1. ábra A sunburn-sejtek jellegzetes megjelenése az egér bőrének epidermiszében. Azonosításuk hematoxilin-eozin festés után a morfológia alapján történik: piknotikus, erősen bazofílen festődő sejtmag, a sejt elhatárolódása a szomszédos sejtektől, a „halo” jelenség, erősen eozinofil citoplazma, vagy az esetek egy részében csak egy eozinofil struktúra nélküli zsákszerű képlet. A nyilak a sunburn-sejteket jelzik. HE festés, 400X.

5.1.2 *Xpa és Csb knockout egerek apoptózis-készsége jelentősen fokozott a vad típussal összevetve*

Az UV sugárzás okozta DNS károsodások kijavításában döntő szereppel rendelkező nukleotid excíziós repair-t alkotó géntermékek ismertek, egyes elemekből null/null kísérletes állatmodell is elérhető. Vizsgálataink során a NER egyes, egymástól jelentősen eltérő elemeit vizsgáltuk. Az excíziós repair rendszer szempontjából 3 egymástól jelentősen eltérő funkcióval bíró gént tudtunk vizsgálni. Az Xpa gén a nukleotid excíziós repair teljes egészéért felelős, beleértve a globális genom repairt (GGR) és a transzkripcióhoz társuló repairt (TCR) is. Ennek megfelelően tehát az Xpa $-/-$ egér sejteiben nem működik a nukleotid excíziós repair a génállomány egyik területén sem. Az Xpc gén a transzkripció aktivitással nem bíró génszakaszok felügyeletét és repairjét látja el, míg a Csb gén funkciója az aktívan átíródó génszakaszokon fellépő DNA károsodások kijavítása. A knockout egerek esetén tehát a Xpc $-/-$ egérben az aktívan át nem íródó DNS

szakaszokon nem működik a repair, míg a Csb^{-/-} állatok esetén az aktívan transzkripció alatt lévő géneken kialakuló hibák javítása nem valósul meg. A modell két humán kórképcsoport, a Xeroderma pigmentosum és a Cockayne szindróma leképezése, amelyek



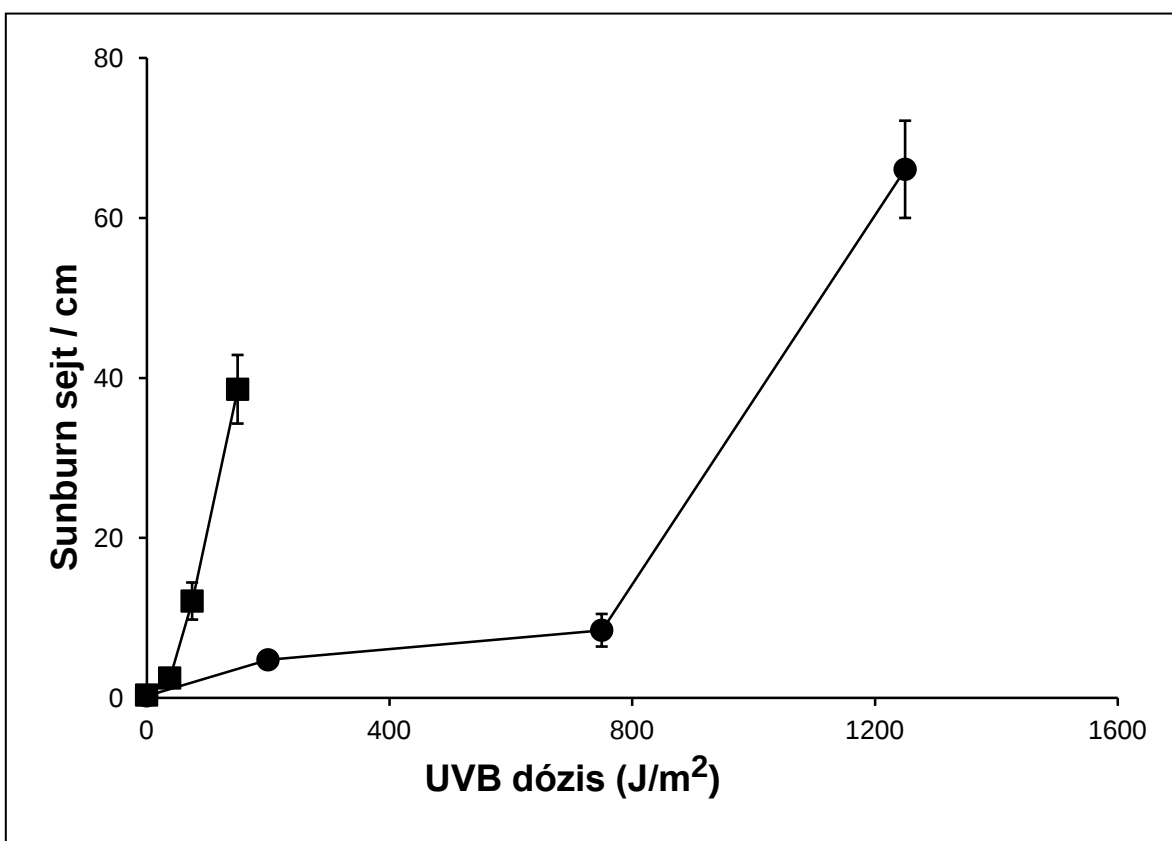
5.1.2. ábra p p53 pozitív sejtek a hámban CM-5 anti-p53 elsődleges antitest, amely a mutáns és a vad típusú p53-at is kimutatja. Diaminobenzamid vizualizáció, a sötétbarna magfestődést nyíllal jeleztük. 400X

mind több genetikai rendellenességet tartalmazó alcsoportokra bonthatóak. Mind a Xeroderma pigmentosum, mind Cockayne szindróma a Bevezetésben részletezettek szerint nagyon jelentős fokú fényérzékenységgel jár[253], a Xeroderma pigmentosum esetén a bőrtumorok gyakran a páciens halálért is felelősek.

Az állatmodellben is ennek megfelelően azt tapasztaltuk, hogy mind az Xpa^{-/-}, mind a Csb^{-/-} állatok bőre az UV besugárzást követően már igen kis dózis után néhány órával eritémássá váltak. Az Xpc^{-/-} állatok esetén a fényérzékenység nem különbözött vad típusétól.

A besugárzás alatt észlelt fényérzékenységi reakció jó korrelációt mutatott az epidermiszben kialakult sunburn-sejtek számával is. A következő három ábrán az UVB dózis függvényében ábrázoljuk a létrejött sunburn-sejtek számát. Fontos megjegyezni, hogy az alkalmazott UV dózisek fiziológiás tartományban mozogtak, amennyiben a legmagasabb általunk alkalmazott dózis, az 1250 J/m² hozzávetőleg a minimális eritéma dózishoz (MED) felel meg. A sunburn-sejtek számát az Anyagok és Módszerek fejezetben

tárgyalt módon határoztuk meg az epidermisz egy centiméterére vetítve a kapott értékeket.

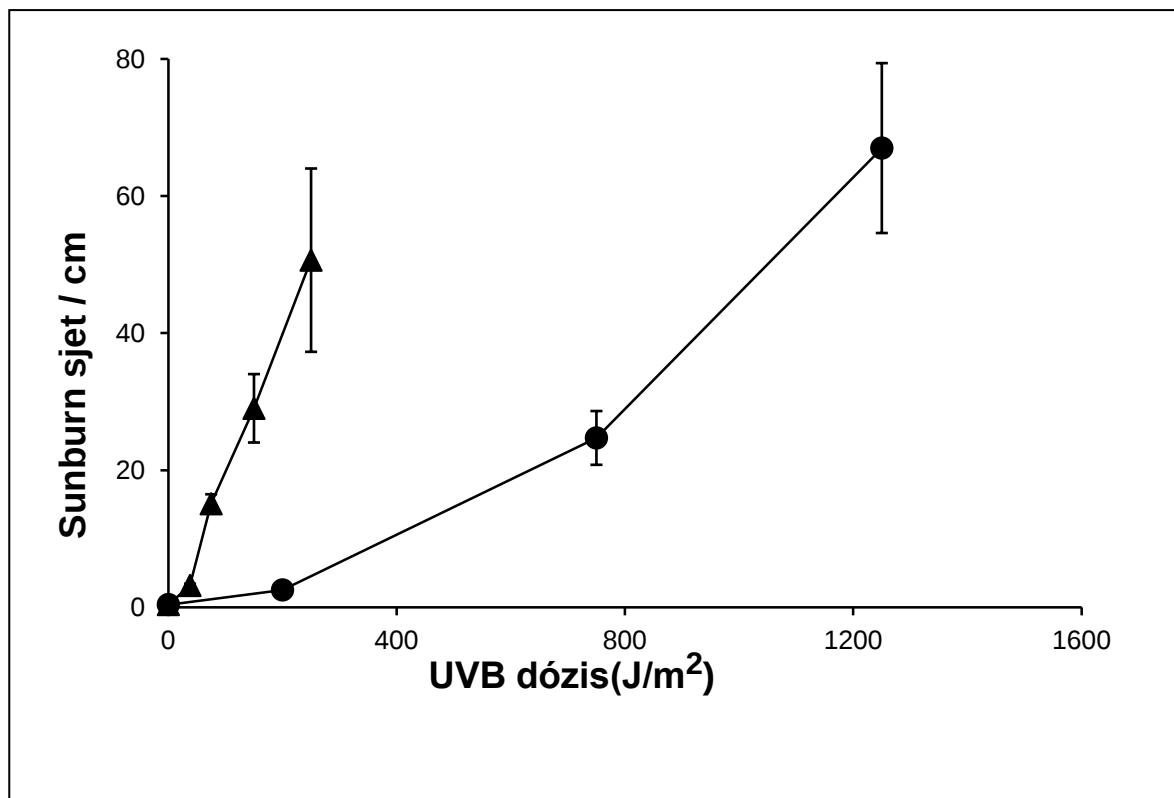


5.1.3 ábra. Xpa deficinens (négyzet) és vad típusú (kör) egerek hátbőrének UVB besugárzása után észlelt sunburn-sejtek száma a dózis függvényében. Adatpontonként 3-4 állat átlagát mutatjuk $\pm$ SEM.

Mint a fenti ábrákból látható, az Xpa knockout egerek esetén sokkal alacsonyabb UV dózis esetén is nagy számban alakultak ki apoptotikus sejtek. Hozzávetőleg 6-9-szer nagyobb fogékonyságot mutattak az UV-indukálta apoptózisra, mint a vad típusú egerek. A Csb^{-/-} egerek hasonlóan jelentős fogékonyságot mutattak a sunburn-sejtek kialakulása tekintetében, az 5.1.4. ábrán látható módon itt is szerényebb UV dózisokkal nagy számban lehetett apoptózist indukálni. Az Xpc egerek esetén viszont már az első megfigyelések utaltak rá, hogy a hátbőrük fényérzékenysége sokkal kisebb, mint a vizsgált másik két knockout egértörzsnek. Ennek sejtszintű bizonyítékát is meg lehetett állapítani, hiszen a 5.1.5. ábrán jelzett módon itt nem találtunk szignifikáns eltérést a vad típushoz képest az apoptózis indukcióban.

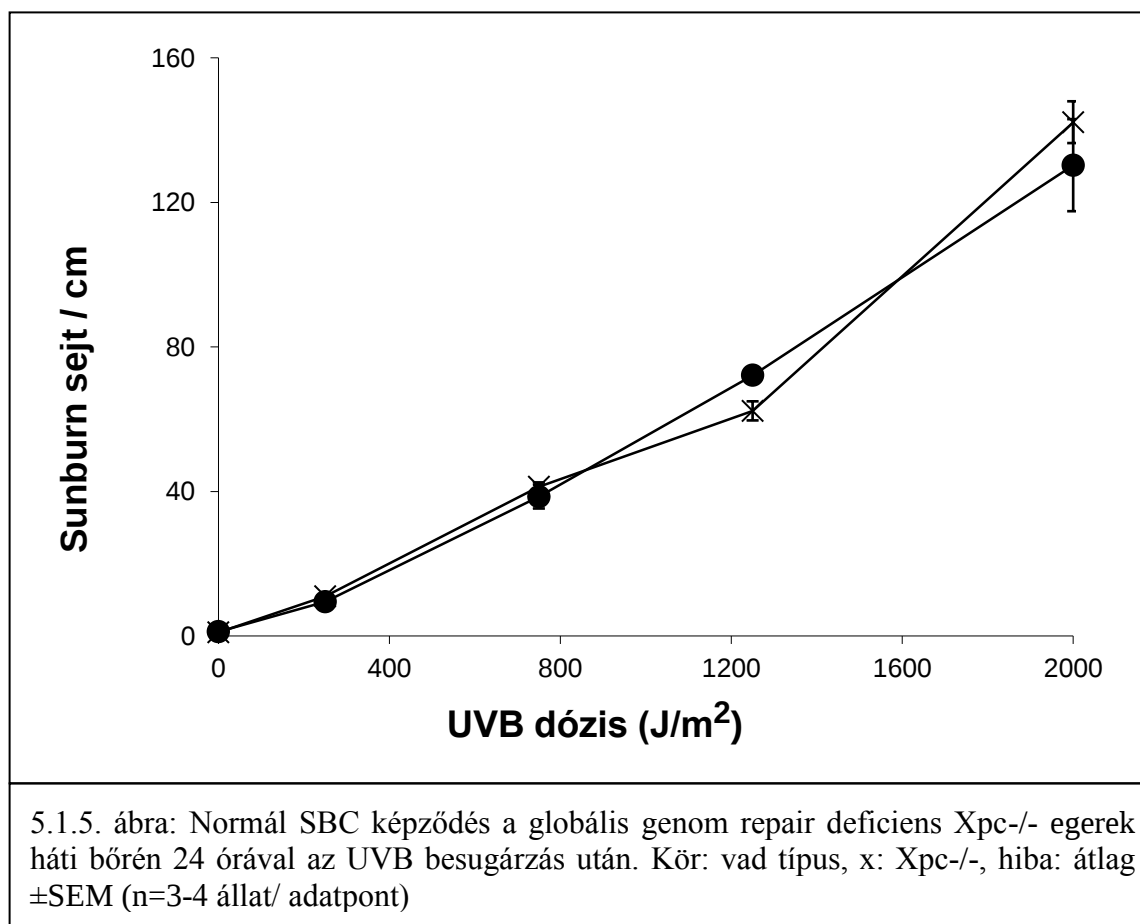
5.1.3 Xpc knockout egerek apoptózis-készsége szignifikánsan nem különbözik a vad típusétól

Összegezve az eddig ismertetett eredményeket, elmondható, hogy azok az egértörzsek mutattak fokozottabb érzékenységet az UVB iránt, ahol transzkripcióhoz társuló repair aktivitása károsodott, azaz az Xpa és a Csb knockout egerek esetén, függetlenül az egyidejűleg a globális genom repairben fennálló károsodásoktól. Kísérleteinkkel azt találtuk, hogy az izoláltan csak a GGR szempontjából deficiens Xpc-/- egerek a normál vad típusúakhoz hasonlóan viselkedtek, tehát a gén hibás működés nem járul érdemben hozzá a SBC képződésben. Ha a GGR nem működik megfelelően és emiatt



5.1.4. ábra. Csb knockout (négyzet) és vad típusú (kör) egerek hátbőrének UVB besugárzása után észlelt sunburn-sejtek száma a dózis függvényében. Adatpontonként 3-4 állat átlaga $\pm$ SEM.

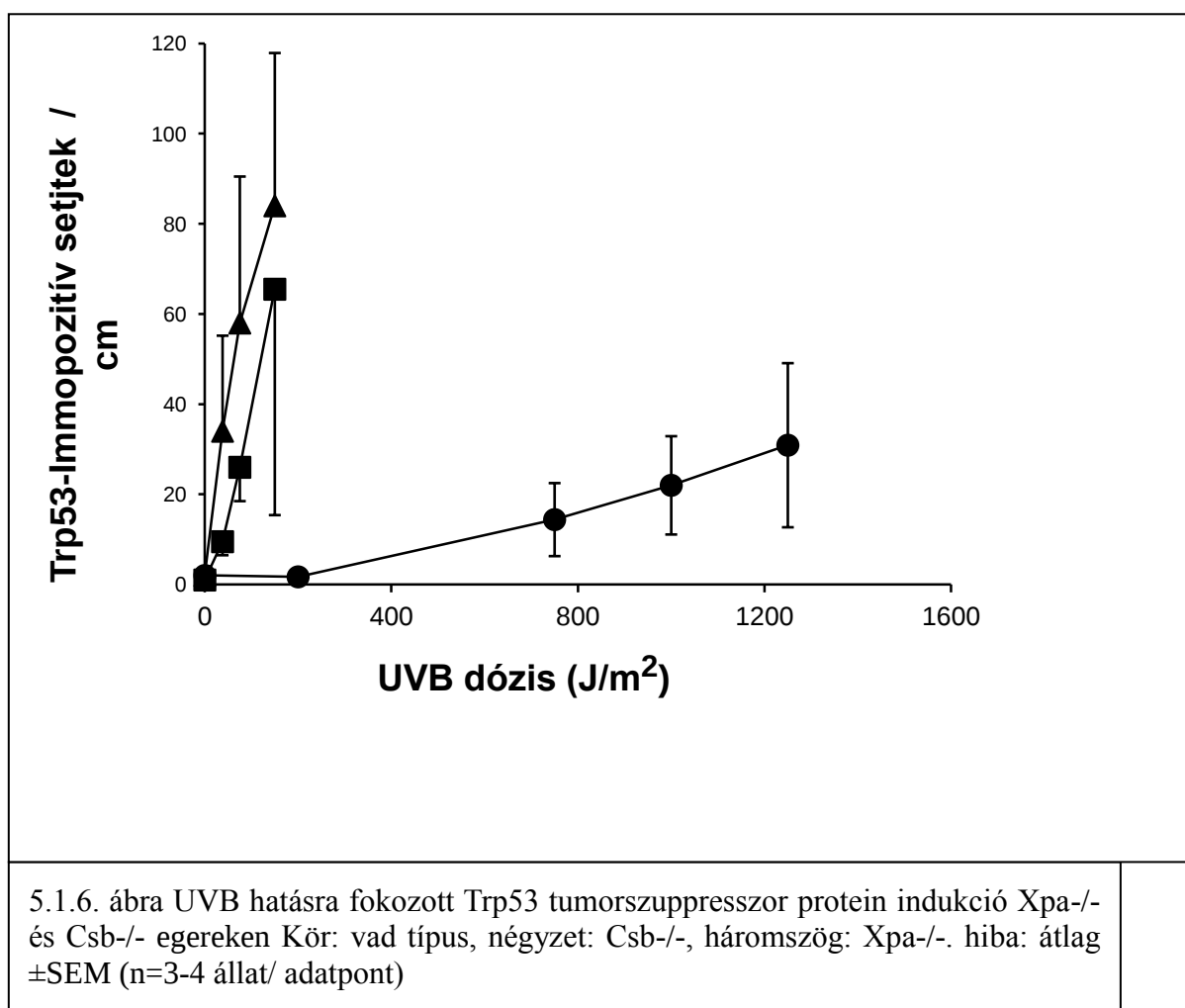
a károsodott DNS perzisztál, attól még a SBC képződés kinetikája a vad típuséhoz nagyon hasonló. Hiába jön létre több károsodás a GGR által javítható DNS szakaszokon, ez nem befolyásolja a képződő sunburn-sejtek számát, tehát a DNS ezen szakaszain létrejövő károsodások nem eredményeznek fokozott apoptózist, nem alakulnak ki nagyobb számban sunburn-sejtek. Nyilvánvalóan a fenti repair mechanizmusok mellett egyéb tényezőkkel is kell számolnunk, ezek azonban szerényebb fokban járulnak csak hozzá az UVB hatására megfigyelt apoptózis-készséghez az epidermiszben.



Az UVB-indukált fokozott apoptózis hátterében a Trp53 tumorszuppresszor fehérje fokozott expressziója áll, az ehhez szükséges szignál dominálón az aktívan átíródó DNS szakaszokról származik egerekben *in vivo*.

5.1.4 A Trp53 indukciója Xpa és Csb knockout egereknél jelentősen fokozottabb az Xpc és a vad típushoz képest

A Trp53 tumor szuppresszor gén szerepe az apoptózis kiváltásában elsődleges szereppel bír, de ismert a Trp53-independens apoptózis jelensége is [254]. Fenti észlelésünk alapján joggal merült fel tehát a knock-out állatok epidermiszében a Trp53 protein expressziójának vizsgálatának jogosultsága. Ehhez immunhisztokémiai módszerrel mutattuk ki a Trp53 protein szintjét az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt technikával.



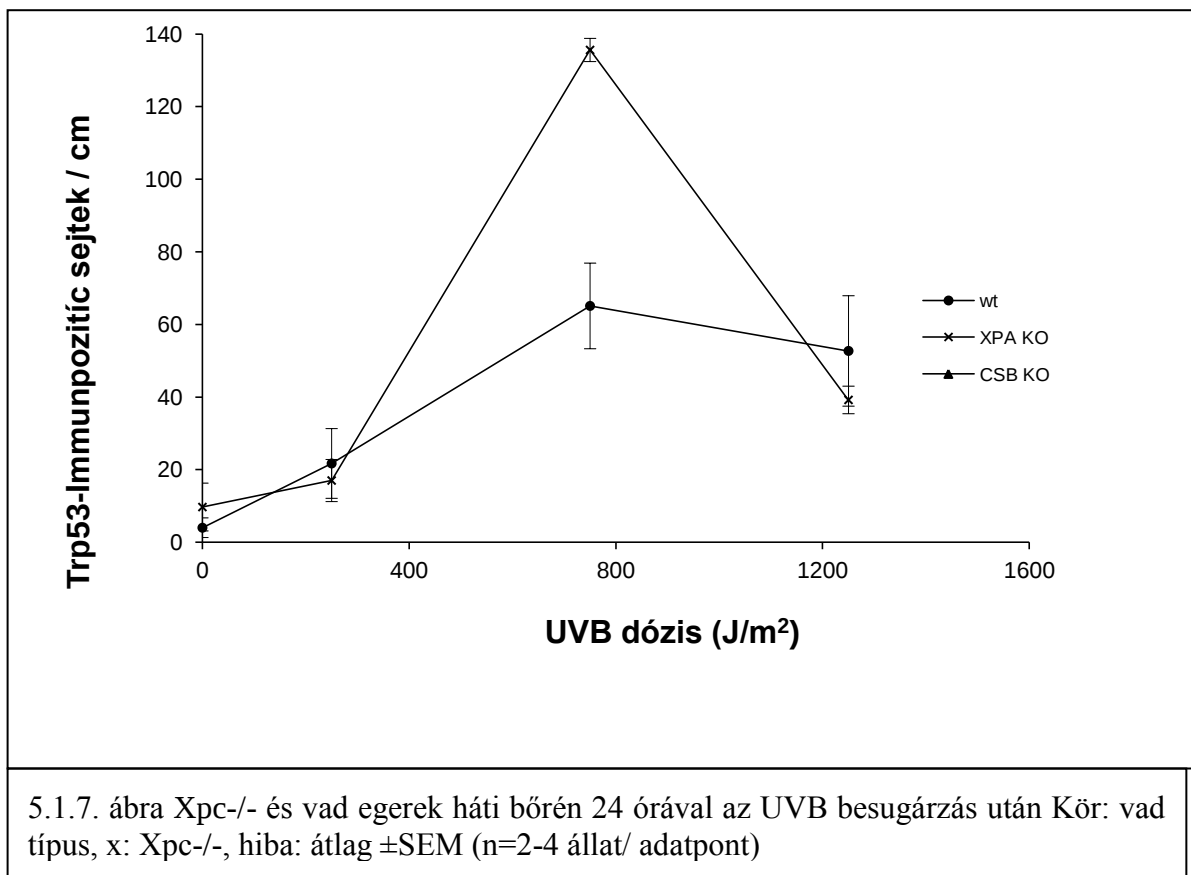
Az 5.1.6 ábrán látható, hogy a két magas apoptózis-hajlammal bíró törzs, a Csb^{-/-} és Xpa^{-/-} egerek esetén az UVB besugárzás után már alacsony dózisok esetén is nagy számban voltak Trp53 pozitív sejtek kimutathatóak. Hasonló kísérletes rendszerben az Xpc^{-/-} egerek besugárzása esetén jelentős eltérés mutatkozik a Trp53 expressziójának tekintetében. Megfigyelhető, hogy alacsony és magas dózisok esetén a vad típusúhoz hasonló dinamikával észlelhető sunburn-sejtek kialakulása, míg a közepes UVB dózis esetén (800 mJ/m²) esetén szignifikánsan emelkedett Trp53 expressziót észlelhetünk.

Észlelésünk szerint az Xpa^{-/-} és Csb^{-/-} egereket a vad típusúakkal összehasonlítva ugyanakkora szintű 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.

A fentiek alapján levonható a következtetés, hogy a bőrben kialakuló apoptózisért jórészt a

Trp53 fehérje indukciója a felelős, hiszen egyidejűleg ennek a fehérjének a fokozott jelenléte is észlelhető volt. Ebben az indukcióban is az aktívan átíródó szakaszok károsodásai szolgáltatnak szignált a fehérje fokozott expressziójára.

A Trp53 központi szerepet tölt be a sunburn-sejtek kialakulásában, hiszen Trp53 knockout egerekben mindössze 10 százaléknyi apoptózis-készség észlelhető a vad típussal összehasonlítva [255]. Az 5.1.6. ábrán demonstráljuk, hogy a Trp53 indukciója már egészen alacsony, 25 J/m^2 -es UVB besugárzás esetén észlelhető, majd a dózis függvényében meredeken emelkedik az Xpa^{-/-} és Csb^{-/-} egerekben, ahol a TCR aktivitása hiányzik. Ez a Trp53 expresszió in vitro adatokkal összevetve is jelentős érzékenységre



utal[256]. A transzkripcionálisan aktív gének esetén az XPC-RAD23B szerepét a DNS károsodás felismerésében a funkciójában gátolt RNS polimeráz enzim veszi át [257, 258].

5.1.5 Az Mdm2 indukciója eltérő a vad típus és Xpc knockout egerekben mint az Xpa és Csb knockout egerekben

A Trp53 mellett az Mdm2 szöveti expressziója is jelentős fokban tükrözi a szöveti apoptózis-készség fokát. A Trp53 funkciójának a szabályozásában az Mdm2 jelentős szerepet játszik, hiszen az N-terminális transz-aktivációs domén blokkolásán keresztül

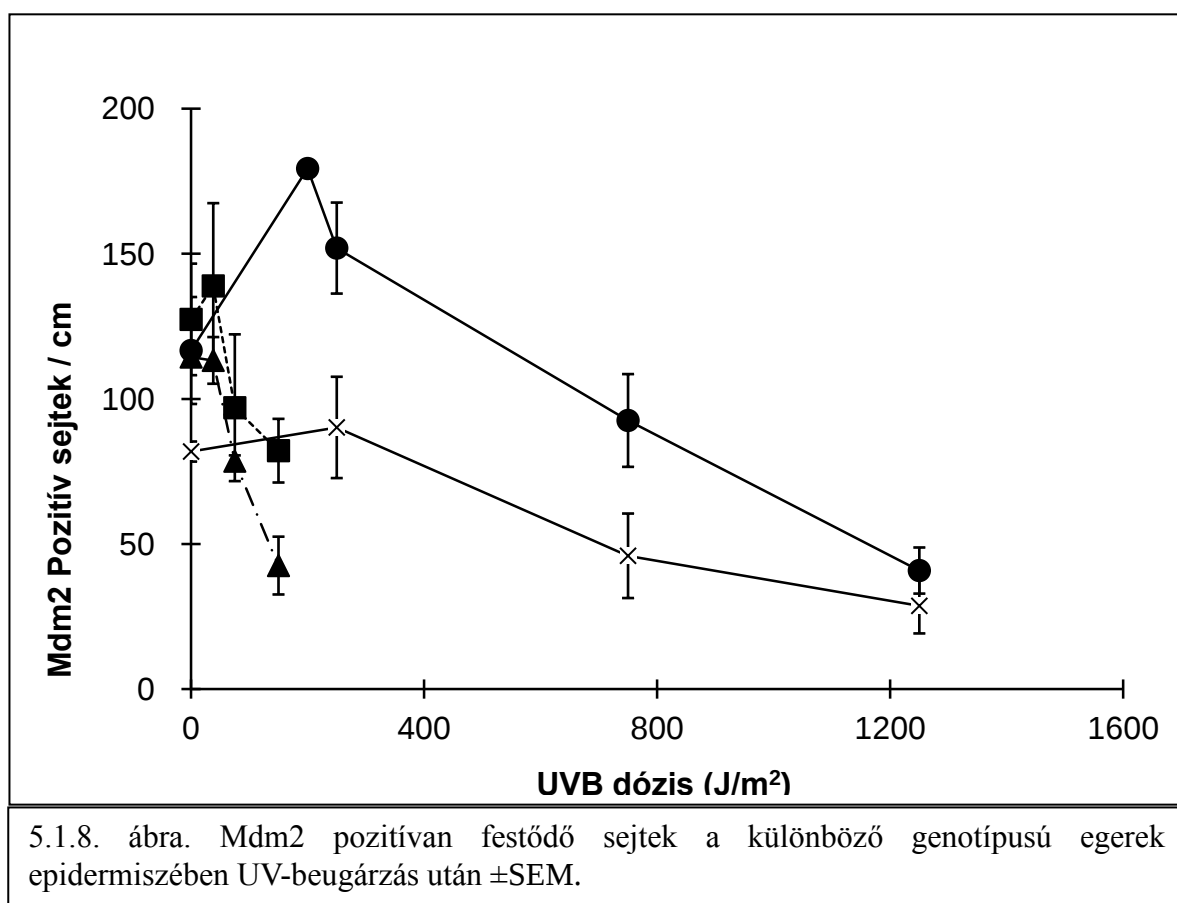
gátolja a p53 transzkripcionális aktivitását[259-261]. Emellett az Mdm2 a Trp53 szintjének szabályozásában is jelentős szereppel bír, mivel az ubikvitinizáción keresztül a Trp53 gyors lebomlását eredményezi[262-264]. Az ubikvitin-dependens útvonalon kívül leírásra került egy ubikvitinizáció nélküli proteasomális degradációja is a p53-nak[265].

A DNS károsodás során fellépő molekuláris történések eredője, hogy a rövid élettidejű Trp53 proteasomális degradációja akadályozva lesz, így megnő a p53 stabilitása és ezzel létejönnek a sejtciklust fékező és apoptózist indukáló hatásai. Az Mdm2 kötődése a Trp53 molekulához annak transzkripcionális aktivitását is befolyásolja. UV besugárzásra az Mdm2 szintje csökken[74], de overexpressziója gátolja a Trp53 UV általi indukcióját[266].

In vitro kísérletben tenyésztett humán fibroblasztok esetén XPC páciensek sejtjei UVC hatására MDM2 szint emelkedéssel reagáltak, hasonlóan a normál fibroblasztokhoz, azonban XPA és CSB páciensek fibroblasztja esetén ez az emelkedés elmaradt [267]. Ez valamelyest ellentmondásban van a klinikai tapasztaltnak, így érdeklődéssel vizsgáltuk *in vivo* rendszerünkben az Mdm2 szintjének változását.

Eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy alacsony UVB dózisoknál az Mdm2 expressziója fokozódott a keratinocitákban. 200 J/m² 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. (5.1.8 ábra). A kísérleteinkből arra következtettünk, hogy a sejt szintű történések sorrendje a sunburn-sejt képződés során a következő: transzkripció gátlás → Mdm2 → Trp53 → apoptózis.

Az apoptózis képesség megtartott jellege ellenére az Xpc knockout egerek DNS-reparációs képessége károsodott. A vad típushoz képest itt ugyan nem jön létre több apoptotikus sejt, de az UVB besugárzás után jelentős DNS károsodás lép fel, amit a ciklobután pirimidin dimerek kimutathatósága is demonstrál[268]. Állatkísérletes megfigyelésünk összhangban van *in vivo* közlésekkel. A klinikai megfigyelés ezzel az észleléssel magyarázható, ismert ugyanis a klinikai tapasztalat, hogy az XPC pácienseknél még az XPA betegekhez képest is nagyobb számban alakulnak ki bőrdaganatok[269].



Sejtkultúrákon végzett vizsgálatok is azt mutatták, hogy fokozott apoptózis-készség Xpa^{-/-} és Csb^{-/-} sejteken is kimutatható volt[270]. A protein szintű változások, az Mdm2 és Trp53 indukciója szempontjából inkább érzékenynek mutatkoztak az Xpc^{-/-} egerek. A rendszer komplexitását jól alátámasztja az a humán és egérmodellben is leírt megfigyelés, hogy az Xpa^{-/-} és Xpc^{-/-} egerekben kell fokozott daganatképződéssel számolni; a Csb fenotípus alig fokozott daganat-rizikóval jár a vad típusokhoz képest[271]. A daganatképződési fogékonyság a GGR hiányával függ össze, mint azt későbbi vizsgálatok megerősítették[272]. Az Xpa fenotípus az Xpc-hez képest tumorszuppresszív hatású[272]. További vizsgálatok is alátámasztják, hogy az apoptotikus szignál az aktívan átíródó szakaszokról származik, aminek védő hatása van a daganatképződéssel szemben[273].

Eredményeink alapján levonhatjuk a következtetést, hogy a DNS károsodás sunburn-sejt képződést eredményez, ha a károsodás kijavítása zavart szenved. Ehhez a szignál dominálón az aktívan átíródó, TCR által felügyelt DNS szakaszokról származik. Megfigyelésünk összhangban van hairless egereken végzett vizsgálatokkal[274] és in vitro eredményekkel[275]. A sunburn-sejt képződés szabályozásában központi szerepet játszik a Trp53 fehérje[47]. Az eredmények szerint a Trp53 indukciója is a transzkripció alatt

elszenvedett károsodástól függ, és megegyezik az *in vitro* eredményekkel, de annál markánsabban érvényesül. A Trp53 szintje az ubikvitinizáció miatt az Mdm2 fehérjétől függ[74], megfigyelésünk szerint ez utóbbi expressziója UV hatásra csökken és az ehhez szükséges szignál is az aktívan átíródó DNS szakaszokról származik.

A sunburn-sejt képződés védi az epidermiszt a DNS-károsodás patológiás következményeitől. Az Xpc knockout egereken ugyan alacsony UV dózis mellett nem alakulnak ki nagy számban sunburn-sejtek, de a DNS állományban igen sok károsodás létrejön és ezek kijavíthatlanul maradnak. Ezek az állatok nem érzékenyek az akut UV-re, a leégés a vad típusban észlelt UV dózisoknak megfelelő besugárzás után jön csak létre, mégis fokozottan érzékenyek az UV sugárzás karcinogén hatására, illetve fogékonyak más daganatkeltő hatásokra, pl. kémiai karcinogénekre[276]. A Xpc állatok daganatok iránti fogékonysága még az Xpa egerek fogékonyságán is túltesz, jelezve, hogy az apoptózis protektív hatása kiemelt jelentőségű. Normál viszonyok mellett a DNS károsodást hordozó sejtek a sejtciklus késleltetésével a repair mechanizmusok aktivizálódnak vagy apoptózison mennek át. Ehhez a Trp53 fokozott jelenléte kell, amely leállítja a sejtciklust és a DNS károsodások kijavítódnak. Ha ez nem történik meg, a károsodás átadódva daganatképződés forrása lesz. Trp53 deficiens egér bőrében UV hatásra kevés sunburn-sejt képződik és az állat fokozottan érzékeny a daganatképződésre[119]. Tehát a sunburn-sejt képződés a genom védelmében (guardian of the genome) történő folyamat és protektív hatása van a karcinogenezis szempontjából[47, 104, 114]. Ezt a korábban is elfogadott véleményt a vizsgálatunk ismételten megerősítette.

5.2 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. Az alább ismertetett vizsgálatsorozatban arra kerestünk választ, hogy a fent ismertetett *in vivo* végpont, a sunburn-sejtek kialakulása szempontjából mely faktorok játszanak meghatározó szerepet. Számos elem esetén észleltük, hogy a Trp53-mediálta apoptózis szempontjából szerepük

nem meghatározó, egyes adatok nem is kerültek közlésre, ezeket külön jelöléssel láttam el. Az így nyert információ viszont segített helyes irányba terelni a munkánkat, így ezek is hasznos adatokként részét képezik dolgozatomnak. A szabályozó rendszer komplex működésének fontossága a klinikumban is jelentkezik, hiszen a p53 funkció helyreállításának esetleges terápiás hozadéka is vizsgálatok tárgyát képezi[277].

A Bevezetésben részletesen ismertettem azokat a tényezőket, amelyek által a sejtciklus szabályozása a G1-ben való megrekedés (G1 arrest) létrejön. Az 1.10. sz. ábrán bemutatott módon az Rb foszforiláltsági állapotától függően tud az E2F komplex-szel összekapcsolódni. A hipofoszforilált Rb az E2F-1 transzkripciós faktorhoz kötődik és ezzel gátlás alá helyezi. Az hiperfoszforilált Rb viszont többet nem képes kötődni az E2F-1-hez, ledisszociál, amely ez által a gátlás alól felszabadul[278, 279]. Ilyen módon az E2F-1 a DP-1 partnermolekulával együtt számos target gén transzaktivációját hozza létre ezzel a sejt G1→ S irányú progresszióját és sejt S fázisba lépését eredményezik[280]. Az E2F-1 célgénjei olyan gének, amelyek a sejt replikációja szempontjából fontos fehérjetermékeket kódolnak, mint egyebek mellett a DNS polimeráz, timidin kináz, dihidrofolát reduktáz[279, 281]. Az Rb foszforiláltsága tehát kritikus szerepet játszik a sejtciklus szabályozása szempontjából, ennek effektorai a ciklin-dependens kinázok, illetve ezek regulátorai a ciklin-dependens kináz inhibitorok. [278]

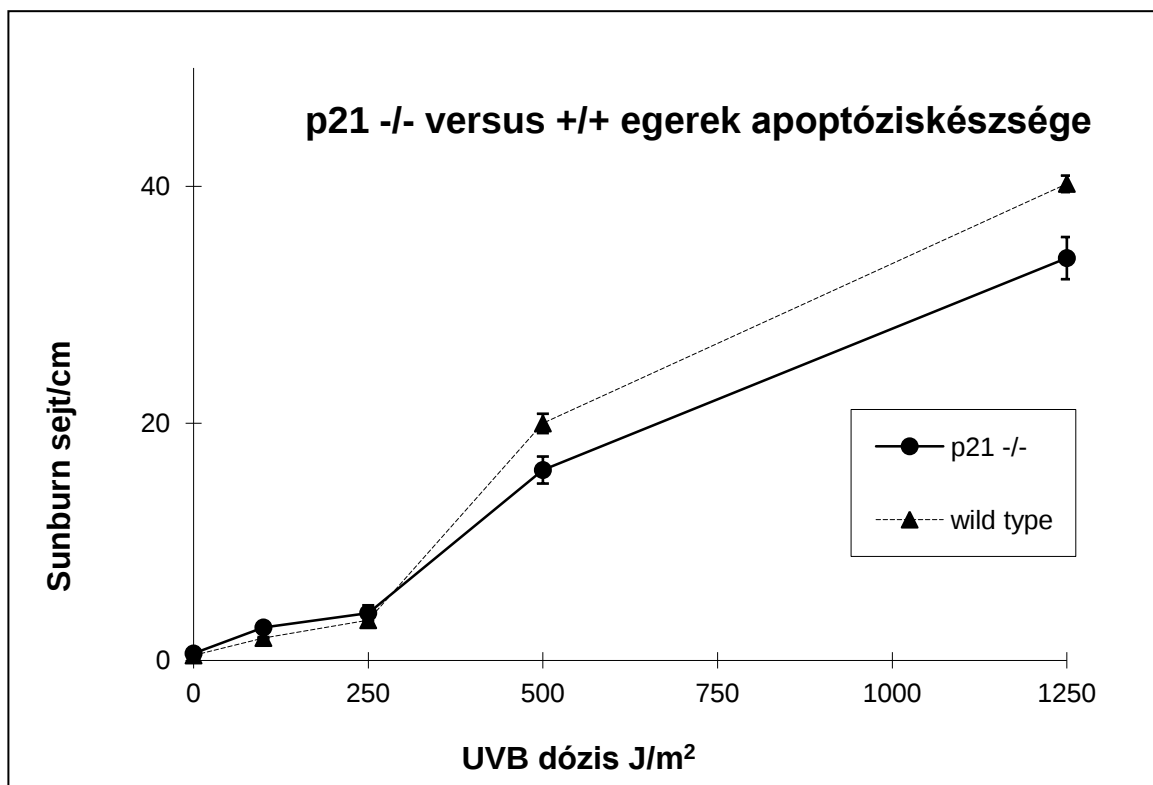
5.2.1 *p21^{Cip1/Waf1} knockout egerek apoptózis-készsége nem különbözik a vad típusétól*

A korábban leírt kísérletes modell szerint vizsgáltuk az egyszeri UVB expozíció után észlelhető apoptotikus választ a 24 órával később bőrben detektálható hatására sunburn-sejtek mennyiségi meghatározásával. A ciklin-dependens kináz inhibitorok közül a Trp53 egyik legközvetlenebb célpontja a p21(CIP1/WAF1) gén és génterméke[126]. A p21 knockout egerek homozigóta null formában sem mutatják a p53 knockout egerekre jellemző spontán tumorképződést és következményes élettartam-rövidülést[282]. Daganatokban viszont ez gyakran alacsony szinten expresszálódik és ez kedvezőtlen prognózissal korrelál[283-285]. Vizsgálatunkkal ezzel együtt tisztázni kívántuk ennek a génnek az UVB-indukálta apoptózis válaszban játszott szerepét.

Az ábrán azt mutatjuk be, hogy a p21 knockout egerekben UVB hatására a vad típushoz nagyon hasonló dinamikával észleltük apoptotikus keratinociták kialakulását. (adat nem került közlésre)

5.2.2 $p27^{Kip1}$ knockout egerek apoptózis-készsége nem különbözik a vad típusétól

Mivel a ciklin-dependens kináz inhibitorok másik sokat tanulmányozott reprezentánsa a



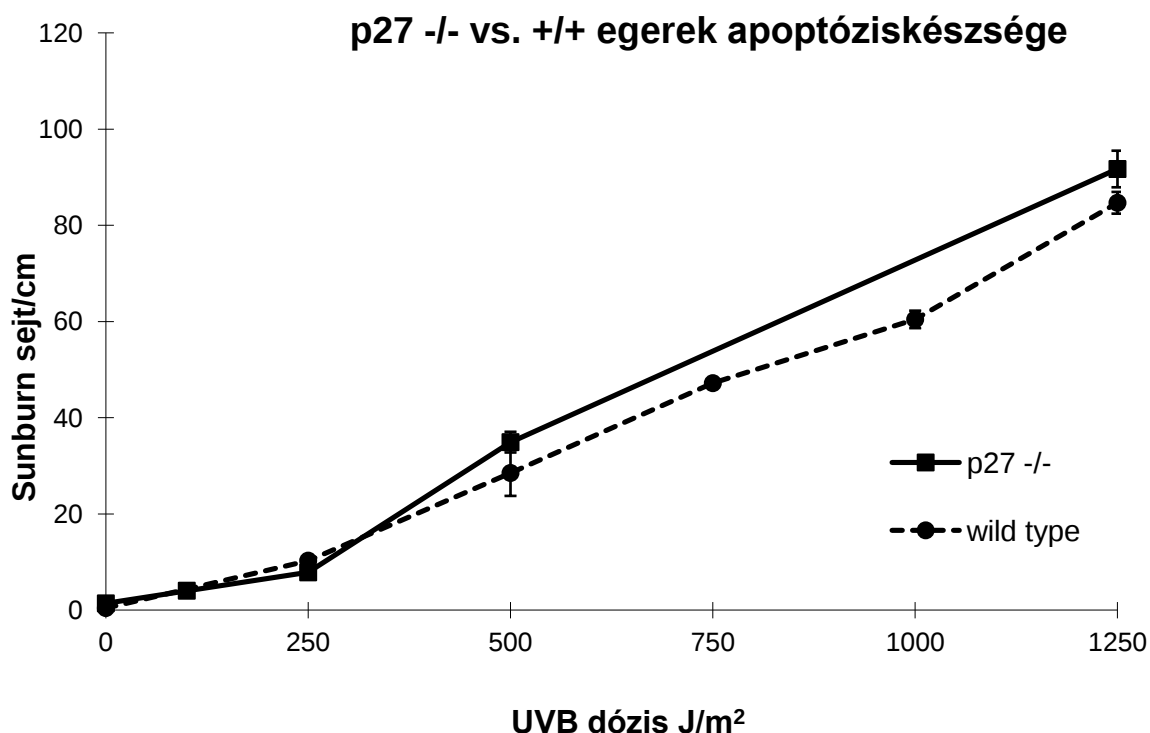
5.2.1. ábra. $p21^{Cip1/Waf1}$ knockout egerek apoptózis-készsége megegyezik a vad típusú egerekével egyszeri UV-besugárzást követően. $\pm$ SEM.

$p27^{Kip1}$ és génterméke is számos hasonlóságot mutat a $p21^{Cip1/Waf1}$ -gyel, pl. a tumorokban való alacsonyan expresszált jellege miatt[286-288]. Így kézenfekvő volt ennek a knockout egérmódelnek a vizsgálata is. Ezen gén elveszése, tumorképződésre hajlamosít elsődlegesen kémiai karcinogének és gamma sugárzás hatására[289]

A kísérleti rendszer hasonló volt a $p21$ -nél alkalmazottal és az észlelt eredmény is hasonló módon nem igazolt szignifikáns eltérést a knockout és a vad típusú egerek besugárzása között. (adat nem került közlésre)

Az affektor útvonalak vizsgálata során relatíve kevés különlegesen érdekes adatot kaptunk, bár fenti negatív felismerések is tükrözik a $p53$ apoptózist indukáló rendszerének a sokszínűségét.

5.2.3 E2F1 knockout egerek apoptózis-készsége jelentősen fokozott a vad típuséhoz képest

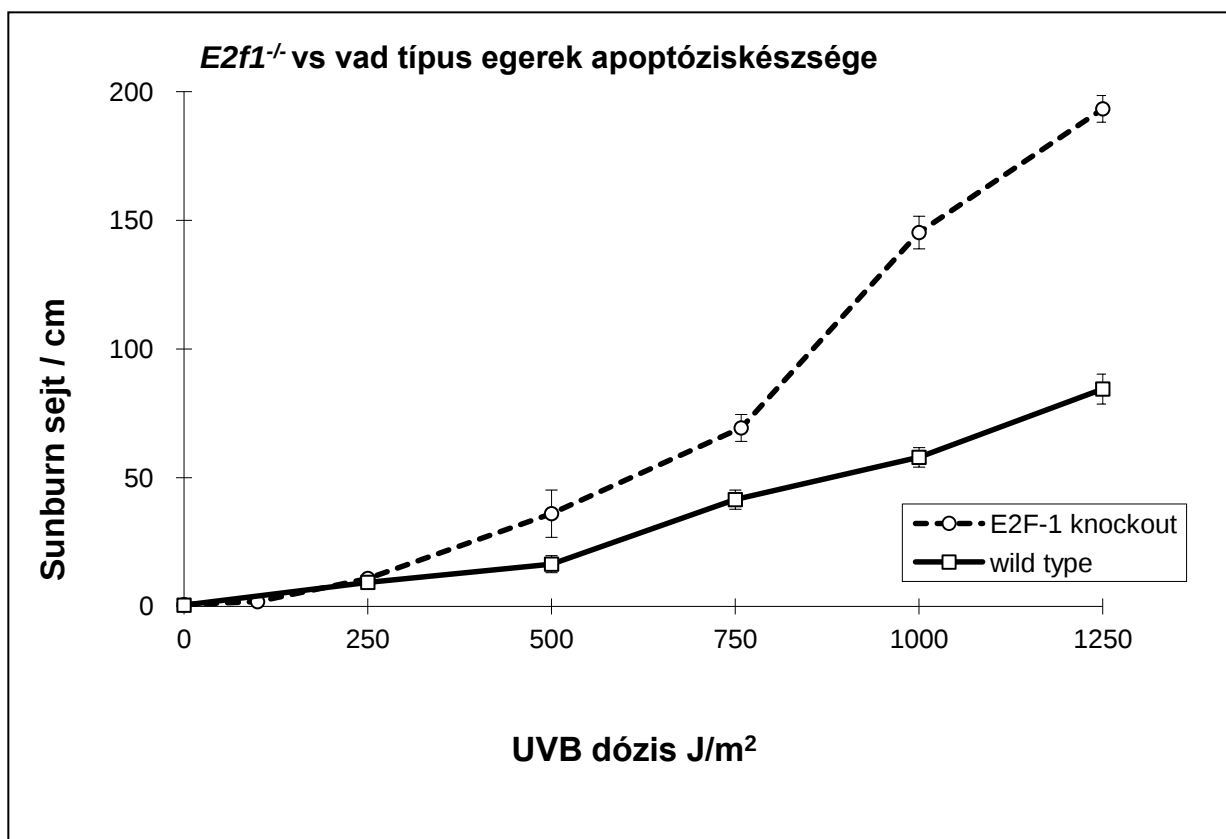


5.2.2. ábra. p27^{Kip1} knockout egerek apoptózis-készsége megegyezik a vad típusú egerekével egyszeri UV-besugárzást követően. $\pm$ SEM.

Az apoptózis és sejtciklus közvetlen szabályozásában résztvevő gének közül a további downstream elemek vizsgálatával folytattuk a munkát. Az Rb-re nézve knockout egerek homozigóta null formában életképtelenek[290]. A rendelkezésre álló lehetőség alapján tehát az ismert apoptózis-reguláló szereppel bíró E2F1-re nézve homozigóta knockout egereken végeztünk vizsgálatokat[291]. A két közel egyidőben létrehozott knockout egértörzs közül mi a Field és munkatársai által a 3-as exonba épített neo kazettával és a 4-es exon deléciójával létrehozott knockout egeret használtuk, szemben a közel egyidőben Yamasaki és mtsai. által létrehozott törzzsel[292].

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.

Az észlelt sunburn-sejt képződést az alábbi ábrán ábrázoltuk, ahol látható, hogy ezek az állatok az apoptózis-készség tekintetében a vad típusnál is kifejezettebb reakciót mutatnak,

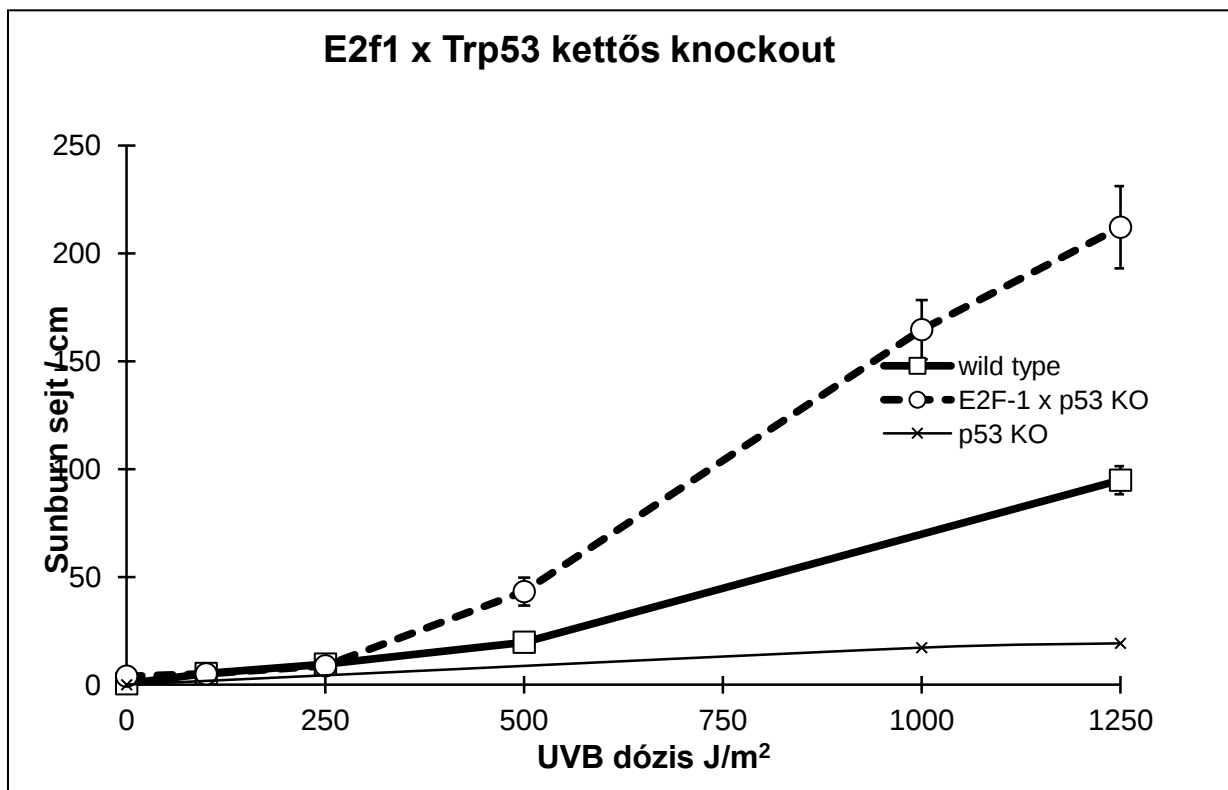


5.2.3. ábra. E2F1 knockout egerek apoptózis-készsége jelentősen fokozott a vad típusú egerekével egyszeri UV-besugárzást követően. $\pm$ SEM.

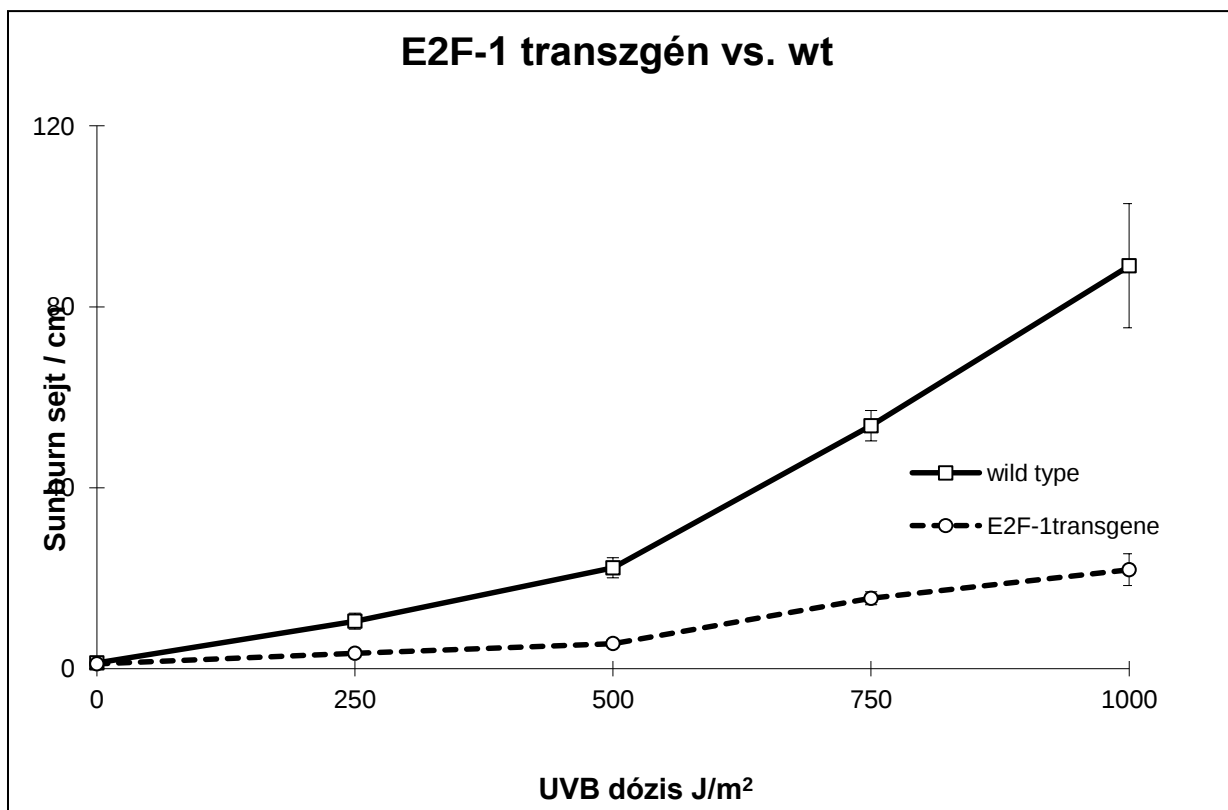
azaz nagyobb számban voltak sunburn-sejtek megtalálhatóak a hámban.

A kísérlet eredménye valamelyest meglepetést hozott, hiszen az E2F1 apoptózis-indukáló képességére voltak irodalmi adatok[293, 294]. Az eredeti hipotézis szerint az E2F1 elvesztése a Trp53 elvesztéséhez hasonló módon viselkedett volna, azaz kisebb számban vártuk sunburn-sejtek képződését. Az eredményt a kísérletek természetszerű megismétlése után olyan módon is kontroll alá vettük, hogy kollaborációs partnereinktől K5 promoterrel hajtott E2F1 overexpresszáló egértörzset is vizsgáltunk[231]. Ez egy olyan speciális konstrukció, ahol a hám bazális rétegében expresszálódó K5 promoter mellett jelenik meg E2F1 overexpresszió, tehát az állat egészében nem, de az epidermiszében jelentős mennyiségben folyamatosan túltermeli ezt a transzkripció faktort[231]. A fent ismertetett módon elvégezve a besugárzást és a sunburn-sejteket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a

korábbi eredménnyel összhangban itt markánsan csökkent apoptózis-készséget mutattak a hámsejtek. Ez az észlelésünk teljes összhangban volt a knockout egereken tett megfigyelésünkkel. A jelenség érdekessége mellett szólt még, hogy spontán tumorokra az E2F1 knockout egerek nem voltak hajlamosak, élettartamuk az átlagos vad típusú egerekével megegyezett. 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 figyeltünk rá, hogy alapvetően azonos, C57/Bl6 egértörzset használjunk, mivel az egyes beltenyésztett egértörzsek között markáns különbségek lehetnek[295]. A kísérlet egyértelműen megmutatta, hogy ilyen állatok létrehozása lehetséges volt, a tenyésztés egyszerűsége pozitív meglepetésként ért minket, ismerve a Trp53 egerek pároztatásának nehézségeit, amelyeket alább részletesen ismertetek. A knockout állatok egészségesnek imponálva születtek meg, 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 észlelt sunburn-sejt számokat az alábbi ábrán mutatjuk be.

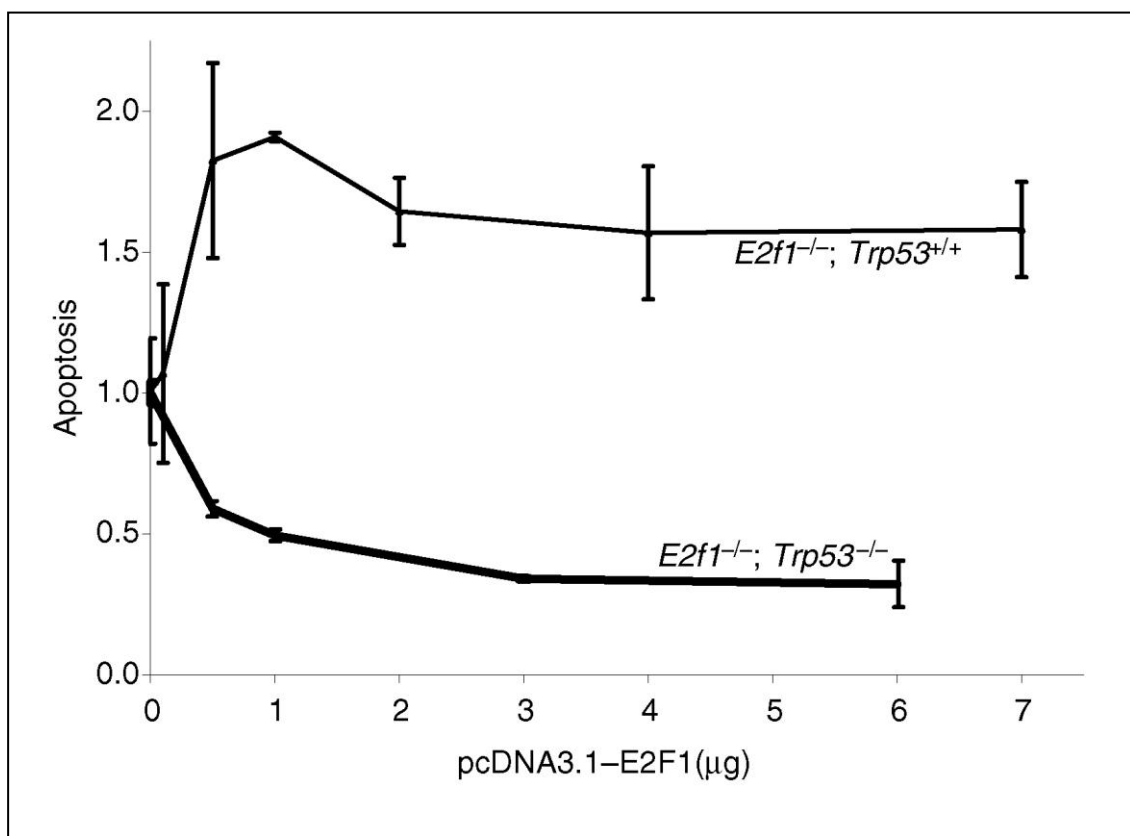


5.2.4 ábra. E2F1 X Trp53 dupla knockout egerek apoptózis-készsége jelentősen fokozott a vad típusú egerekével egyszeri UV-besugárzást követően. $\pm$ SEM.



5.2.5 ábra. E2F1 transzgén egerek apoptózis-készsége csökkent a vad típusú egerekével egyszeri UV-besugárzást követően. $\pm$ SEM.

Az eredmények azt mutatták, hogy az E2F1/Trp53 dupla knockout egerek apoptózis-készsége lényegében megegyezik az egyszeres E2F1 knockout egerekével, hasonlóan emelkedett jelleget mutat. Ez mindenképpen figyelemreméltó eredmény, hiszen a Trp53 apoptózisra gyakorolt meghatározó szerepének mondott ellen. A közlés során az alap egértörzsek esetleges jelentős eltéréseinek kizárására a bírálók kérésére a teljes genetikai variációsorozatot ismételt előállítottuk, a kapott eredményt egy közös ábrán mutatjuk be. Mint látható, lényegében teljesen azonos eredményt kaptunk mint az irodalomban már közölt Trp53 knockout kísérlet, így sikerült megbízhatóan reprodukálni az eredményeket.



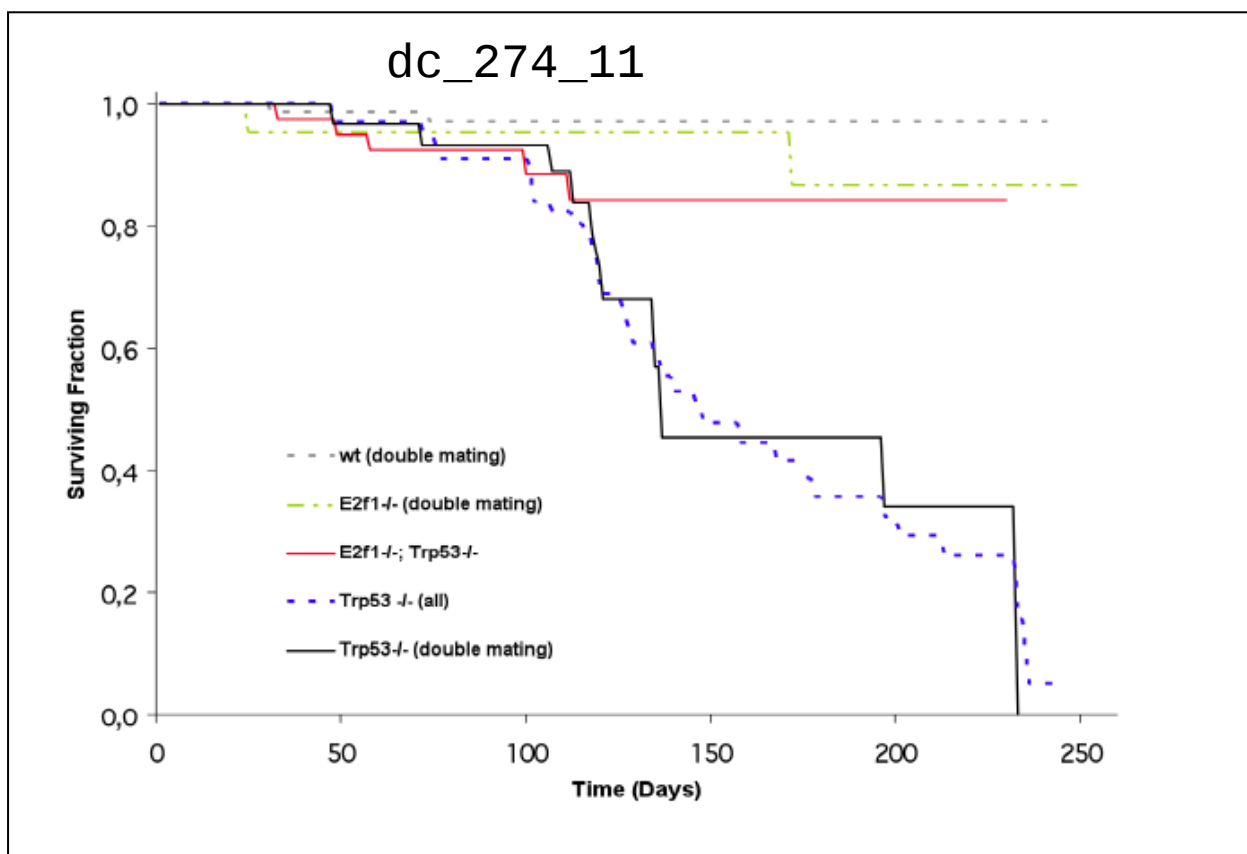
5.2.6 ábra. E2F1 X Trp53 dupla knockout egerek fibroblaszt kultúrájának apoptózis-készsége, illetve a Trp53 visszatranszfektálását követően. $\pm$ SEM.

Elmondható tehát, hogy dupla knockout egereken (Trp53^{-/-}-E2F1^{-/-}) nem érvényesül a Trp53 hiánya, a sunburn-sejt képződés az E2F1 KO egerekre jellemző jellegzetes dózis – sunburn-sejtszám görbét látjuk. Úgy tűnik, hogy a molekuláris

mechanizmusok alá-fölérendeltségi viszonyában a E2F1 inaktivációja felülírja a Trp53 elvesztése után észlelhető apoptózis rezisztenciát. 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 transzfektálva gátolni tudjuk az UV-indukálta apoptózis fokozódását. 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-suppresszor funkciója jelen van a sejtciklus szabályozásában betöltött szerepe mellett[296].

5.2.4 Az E2F1X Trp53 dupla knockout egerek túlélése a vad típusúéhoz hasonló

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 a hagyományos Kaplan-Meier görbén ábrázolva mutatjuk be az 5.2.7. ábrán. A fenti ábrából egyértelműen kitűnik, hogy a hosszú távú megfigyelések során 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[297, 298], 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.



5.2.7 ábra. E2F1 X Trp53 dupla knockout egerek fibroblaszt kultúrájának apoptózis-készsége, illetve a Trp53 visszatranszfektálását követően. $\pm$ SEM.

5.2.4 Az E2F1X Trp53 dupla knockout egerek születéskori ivararánya a vad típuséhoz hasonló

Az egerek hosszú távú életben tartásának másik fontos hozadéka is volt, mivel alkalmunk volt megfigyelni az egerek szaporítása során a született utódok ivararányát. A munka szempontjából kellemes meglepetésként nyugtáztuk, hogy az Trp53^{-/-};E2f1^{-/-} egerek szaporítása lényegesen egyszerűbb, mint az egyszeres Trp53 knockout egereké. Az utóbbiak esetén ugyanis a hím:nőstény arány jelentősen eltolódott az előbbieik javára. Ezt a jelenséget a lenti táblázatban demonstrált módon nem észleltük, a Trp53^{-/-};E2f1^{-/-} dupla knockout egereknél az utódok a vad típushoz hasonló kiegyensúlyozott arányban jöttek a világra.

Genotípus	Összesen	Hím	Nőstény	Arány
<i>Trp53</i> ^{+/+} ; <i>E2f1</i> ^{+/+}	80	44	36	1:1,22
<i>Trp53</i> ^{-/-} ; <i>E2f1</i> ^{+/+}	122	100	22	1:4,55
<i>Trp53</i> ^{-/-} ; <i>E2f1</i> ^{-/-}	53	27	26	1:1,04

5.2.1 táblázat. E2F1 X Trp53 dupla knockout, Trp53 knockout és vad típusú egerek között a születéskori nőstény : hím egerek aránya

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

A Trp53 elvesztésével járó apoptózis válaszkészség megváltozásának visszafordítása az E2F1 egyidejű kiiktatásával onkológiai szempontból jelentős, akár később terápiában is használható eredménynek tekinthető. A tumorok jelentős része rendelkezik p53 mutációval, amely immunhisztokémiával is kimutatható és a tumor prognózisa szempontjából komoly jelentőséggel bír[299]. Az apoptózist indukáló terápiás ágensek hatástalanságáért vagy terápia során fellépő hatásvesztéséért a tumorsejtekben kialakuló p53 mutáció jelentős részben felelős. Ha egy másik fehérje, mint jelen esetben az E2F1 transzkripciós faktor inaktiválása a sejteket ismételten képessé teszi az apoptózisra, akkor ez jelentősen megváltozott kezelési hatékonyságot jelenthet. A kezelés közben kialakuló multidrug rezisztencia hátterében is állhat a p53 inaktivációja. Mint fentebb már említettem, jelenleg már terápiás célú törekvések vannak a p53 funkciójának visszaállítására[277]. Hasonló jellegű, célzott molekuláris terápiára az utóbbi évek alapkutatásai hívták fel a figyelmet[299-301].

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

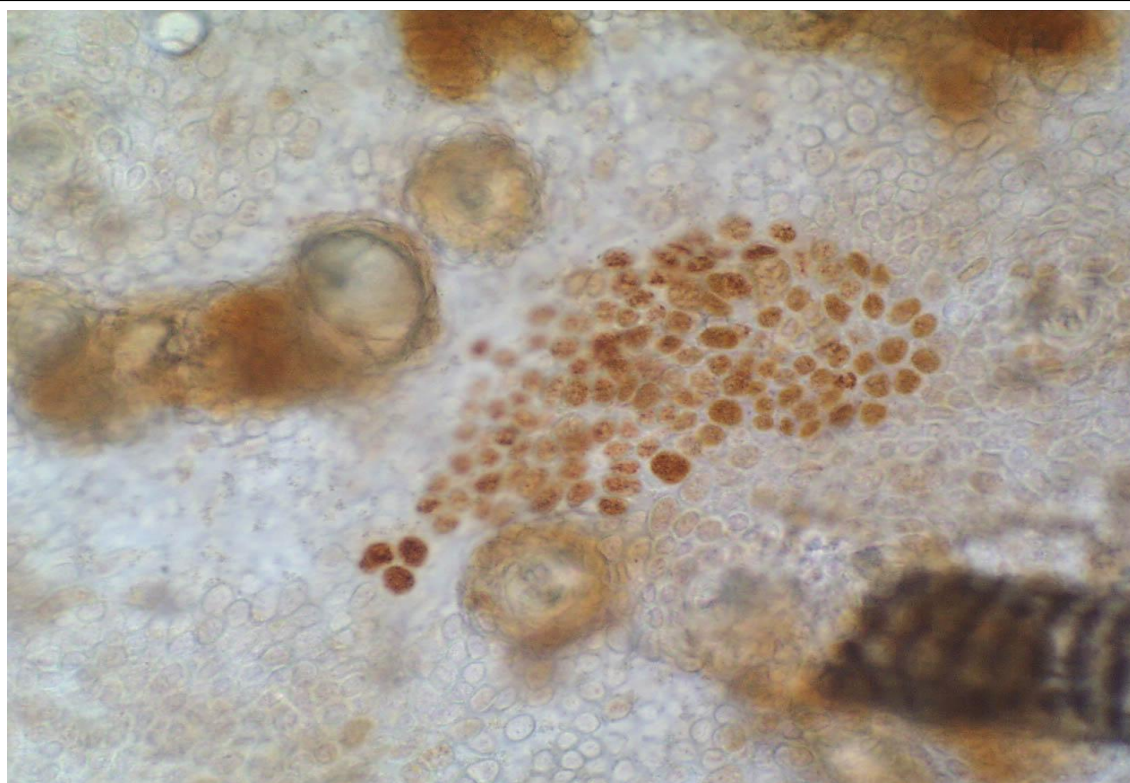
A daganatok kialakulása szempontjából a klonális expanzió kritikus lépés. A mutációk

általában a szervezetben 10^{-5} – 10^{-3} gén/sejt gyakorisággal képződnek, azaz a mindennapokban is folyamatosan számíthatunk mutációk kialakulására [302, 303]. 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 van teleszórva, amelyek potenciálisan később daganatok kiindulási forrásai lehetnek [235]. Ezeket a klónokat egérbőrben is meg lehet találni UVB besugárzás után [304]. 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 az Anyagok és Módszerek fejezetben tárgyalt módon használtunk C57/BL6-os egértörzset, amelyet rendszeresen borotváltunk és hetente 5 alkalommal besugarasztunk.

5.3.1 A Trp53 pozitív klónok méretben és sejtszámban is növekedek krónikus UVB hatására

Munkánk első lépéseként egérbőrre is kidolgoztunk egy olyan módszert, hogy úgynevezett epidermális lemezeket (epidermal sheet) tudtunk leválasztani az egerek egyben eltávolított hátbőréről. A módszer humán mintán már korábban beállításra került, de a humán bőr több tucat sejtsorához képest az egérbőr néhány sejtsorból álló epidermisze komoly technikai kihívást jelentett. 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, ahogy az ábrán demonstráljuk is. A kialakult sejtcsoportokat fénymikroszkóp alatt lehetett számolni, majd a számolás eredményeit az egér hátbőrén 10 négyzetcentiméterre vetítve ábrázoltuk az alábbi ábrákon. 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. Látható, hogy a besugárzás 3-ik, 5-ik, 8-

ik majd 10-ik hetében a kialakult sejtcsoportoknak, klónoknak a mérete is növekszik, illetve észlelhető egy arány eltolódás a nagyobb számú sejtből álló klónok irányába. A vizsgálatokkal nem csak a 10 négyzetcentiméterenként észlelhető klónok számát, hanem az ez által elfoglalt területet is mérhetővé tudtuk tenni. Az 5.3.1 ábrán egy jellemző klón átnézeti képet mutatjuk, melyen jól látható a p53 pozitív sejtek csoportba rendezett jellege.

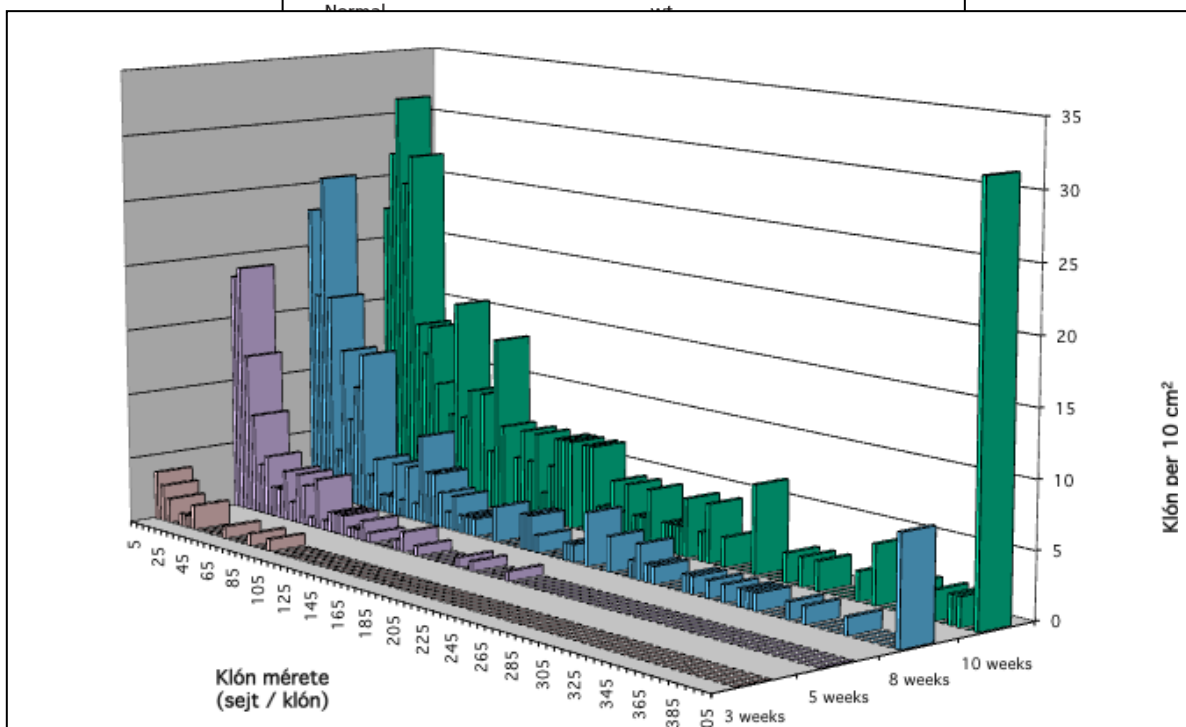


5.3.1. ábra p53 pozitív immunhisztokémiai reakciót adó sejtek csoportja egér epidermális lemez preparátumban. 400X

A klónok növekedési dinamikáját vizsgálva egyértelmű volt, hogy hosszabb UV-kezelés nagyobb méretű klónokat eredményezett és ezen klónok nagyobb számban alakultak ki a felület 10 cm²-ére vetítve (5.3.2. ábra). Ha összehasonlítjuk az eltelt idő függvényében észlelt p53 pozitív sejtcsoportok viselkedését, látható, hogy a kezelés 10-ik hetére a sejtcsoportok mérete elérte a 300 – 500 sejt nagyságot, sőt ezer feletti számú sejtet tartalmazó klónok is észlelhetőek voltak.

Azt is igazolni kívántuk, 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-

Clone number	Codon	Normal sequence	Base change	Amino acid change
Normal			wt	
Normal			wt	
Normal			wt	



5.3.1. táblázat p53 mutációk a mikrodisszekció technikával izolált klónokban. Látható az ismert hotspotként nyilvántartott 270-es kodon gyakori érintettsége és a mutáció UV-kéjegy mutáció jellege: C → T

5.3.2. ábra p53 pozitív immunhisztokémiai reakciót klónok számának változása az idő és a dózis függvényében. 3, 5, 8 és 10 hét UV-kezelés után vizsgáltuk a kialakuló sejtcsoportok méretét (sejt/klón) és az egyes méretű klónok gyakoriságát (klón/10cm²)

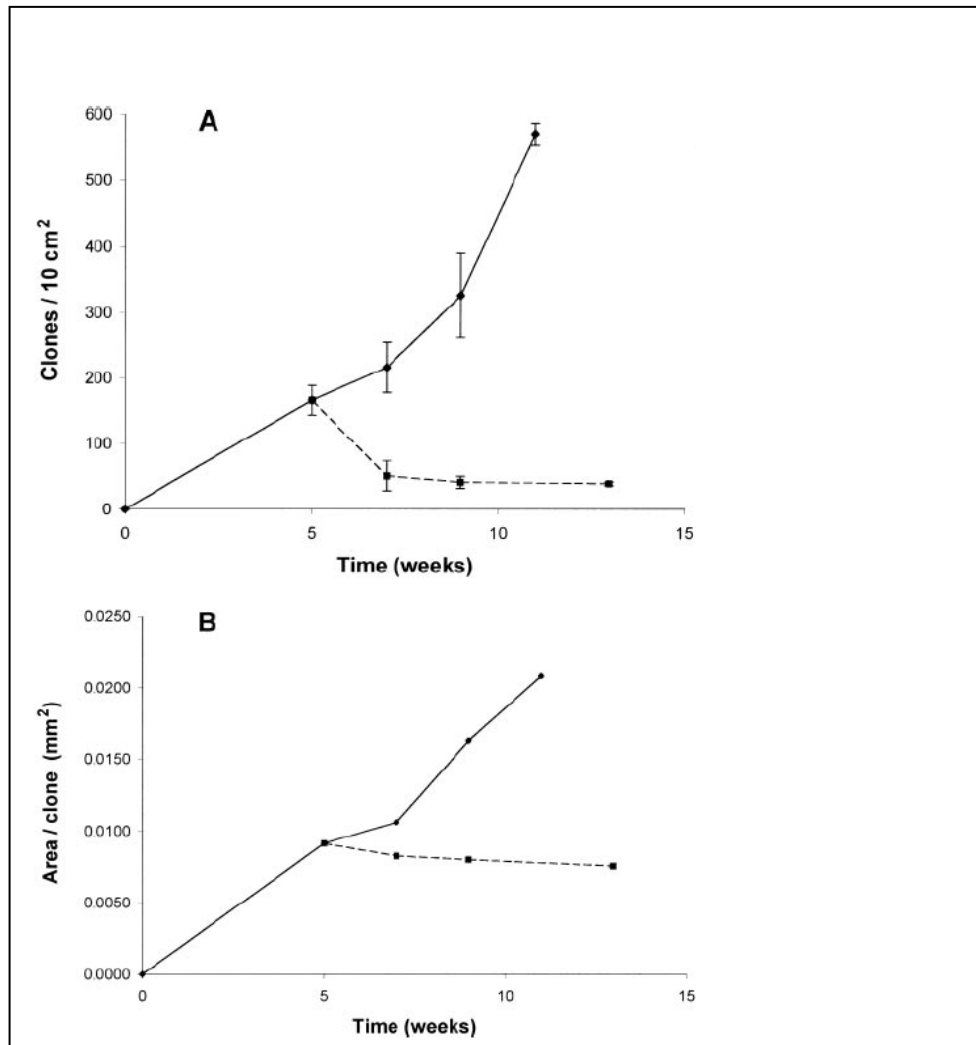
ra jellemző típusos UV-indukált „hotspot” mutációkat. Az 5.3.1 táblázatban mutatjuk be az igazolt mutációkat, amelyek dominálónan C-T mutációk voltak, azaz az UV hatásra jellemző kéjegy típust mutatták.

Fogságba esett klónok

A klónok négyzetcentiméterenkénti száma és az egyes klónok mérete a besugárzás időtartamával arányosan növekedett, azonban kíváncsiak voltunk a besugárzás abbahagyása után történetekre is. Így aztán az ötödik kezelési hét után az UV sugárzást felfüggesztettük az állatok egy csoportjánál, míg egy másik csoportnál folytattuk a

dc_274_11

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 (5.3.3 ábra A panel), de a klónok által elfoglalt terület átlagos mérete nem csökkent (B panel). A klónok úgy viselkedtek, hogy számos klón eltűnt, de amelyek megmaradtak, azok mérete nem változott.



5.3.3. ábra. A panel: A folyamatos UVB besugárzás mellett a klónok növekednek (folyamatos vonal), míg, ha az UV-kezelést felfüggesztjük az ötödik héten, akkor a klónok száma gyorsan csökkenésnek indul (szaggatott vonal) +/- SEM.

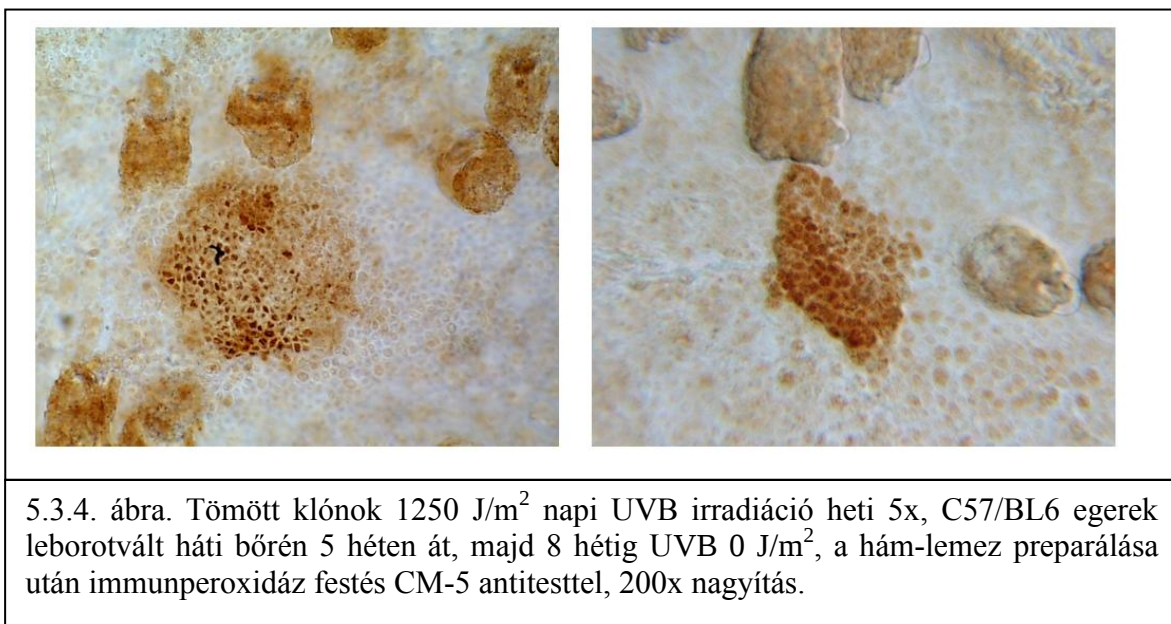
B. panel: a kialakult klónok kb. 20%-a viszont nem mutat regressziót a 13-ik hétig utánkövetve őket. A felfüggesztett UV-kezelés mellett a klónok által elfoglalt terület mérete nem csökkent jelentősen. A két ág közötti különbség statisztikailag szignifikáns ($P: > 0,003$ 9 hétnél és $P: > 0,0002$ 11 hétnél. (Wilcoxon rank sum test two-sided).

A fennmaradt klónokat közelebbről 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 klónok.

Fenti észlelés mellett, mivel a klónokat alkotó sejtek száma ismertté vált az értékelés során, így ennek statisztikai analízisét is el tudtuk végezni. A számokat átnézve világossá vált, hogy a klónokat alkotó sejtek száma egyfajta periodicitást mutat. Az ábrán látható

módon az X tengelyen az egyes klónokat felépítő sejtek számát, míg az Y tengelyen 10 cm^2 -ként előforduló számukat ábrázoltuk.

Ábra: A klónok nagyság (sejtszám/klón) szerinti gyakorisági ábrája periodicitást mutat. (868 klón adatainak feldolgozása, 3 sejtenkénti csoportosításban, 100 sejt/klón-nál



nagyobb adatokat nem tüntettünk fel, mert a sejtek számolása itt már pontatlan).

Az első pillanatra feltűnő periodicitást statisztikailag is verifikálni lehetett, oly módon, hogy a 12-16 közötti sejtszám és annak többszörösei fordultak elő leggyakrabban. Ez annak az elfogadott ténynek az ismeretében, hogy az egérbőr epidermális proliferációs egységekből (EPU) áll, amelyeket 12-14 sejtmaggal rendelkező sejt alkot[305, 306], értelmet nyer.

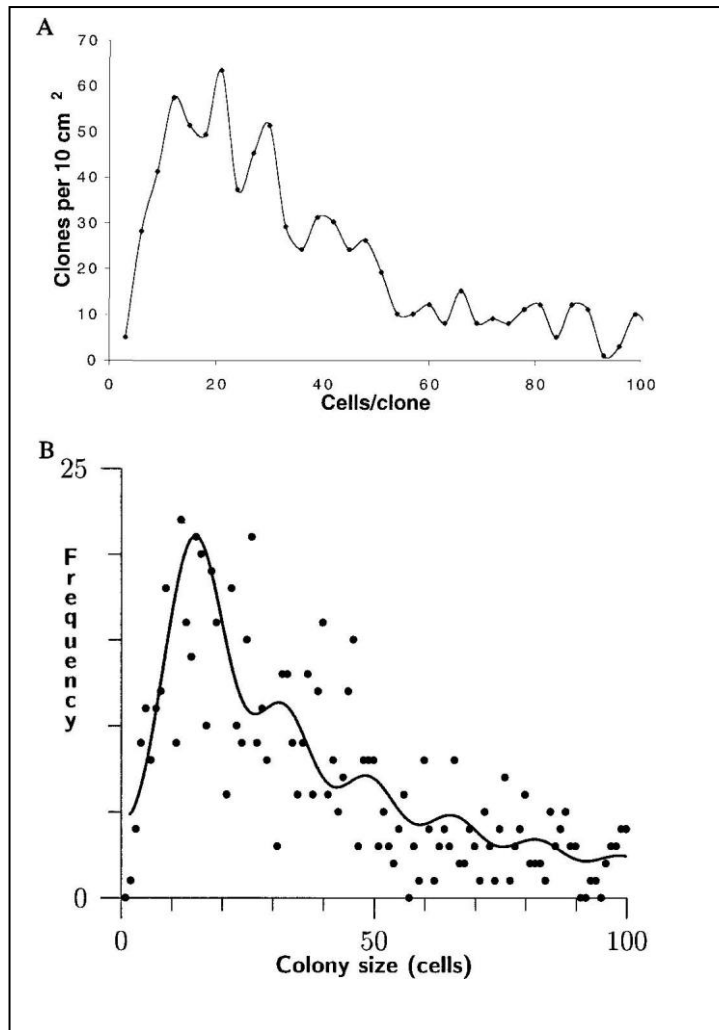
Igazolható volt tehát, hogy az UVB hatására a klónok egy-egy ilyen epidermális proliferációs egységnyi mérettel, azaz 12-16 sejttel szeretnek leginkább növekedni. Folyamatos UVB elegendő volt, hogy a klónok növekedjenek, az UV kikapcsolása után azonban a klónok jelentős része regrediál. A megmaradó klónok 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 jelentős információval gazdagítja a többlépcsős karcinogenitás modelljét, 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 mutációja nem egyedüli eleme egy daganat kialakulásának. A Trp53 mutációt hordozó keratinociták azonban csökkent apoptózis-készségük révén pozitív szelekció alatt állnak. Mivel rezisztensek az apoptózisra, így további DNS-károsodások mellett sem kerülnek eliminálásra, növekedésükben előnnyel bírnak az ép sejtekhez képest, így további mutációkra is nagyobb eséllyel tesznek szert. A növekedés dinamikája nem lineáris, hanem kvantált egységekben történik, egy-egy EPU elfoglalása gyors, majd egy újabb EPU-ba való betörés ismét hosszabb időt vesz igénybe. A prekancerózus sejtcsoport nem egyszerűen egyenként, sejtenként halad, hanem a környező sejtek kiszorításával, egy-egy epidermális egység anektálásával ugrásszerűen történik.

Miután a klónok regrediálnak, kísérleteink azt támasztják alá, hogy a mutáns Trp53-at hordozó keratinociták nemcsak a saját kódolt növekedési képességük miatt szaporodnak fel, hanem az expanziót a környező sejtek megengedik. Ennek a permisszív környezetnek a folyamatos UV-expozíció a motorja. Ha a fokozott proliferációs készség csak a mutáns sejtek belső tulajdonsága lenne, akkor az UV megszűnése után is fokozatosan növekednének a klónok, ha a számuk nem is változna. Vizsgálatunk ezt nem mutatta, bár a Trp53 hiánya összejtszerű aszimmetrikus osztódást eredményezhet[307]. A klónok növekedése, csak folyamatos UV hatás alatt észlelhető és ehhez relatíve alacsony UV-dózis is elegendő. Az UV-indukált tumorokban is szükséges a folyamatos UV hatás a tumorok növekedéséhez[308]. Az EPU, mint a klonális szaporodás fiziológiai barriere szerepel, melyet a folyamatos UV-irradiáció meggyengít.

Hipotetizálható, hogy ebben az UV-indukálta apoptózisnak szerepe van[309]. Vizsgálatunkkal rávilágítottunk a tumorsejtek mikrokörnyezetének jelentőségére a daganatok keletkezésében.



5.3.5. ábra. A Trp53 mutáns klónok kvantált eloszlása A panel: 868 klón analízisével észleltük, hogy ha 3-as osztásokkal ábrázoltuk a klónonkénti sejtszámot, akkor a 12–16 sejtszám közötti méretek fordultak elő leggyakrabban.

B. panel: Statisztikai analízis: A klónméretek aperiodikus eloszlásának analízise Mivel egy EPU az egér bőrében 12–14 maggal bíró sejtből áll, a csúcsok ezen eloszlásnak felelnek meg.

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

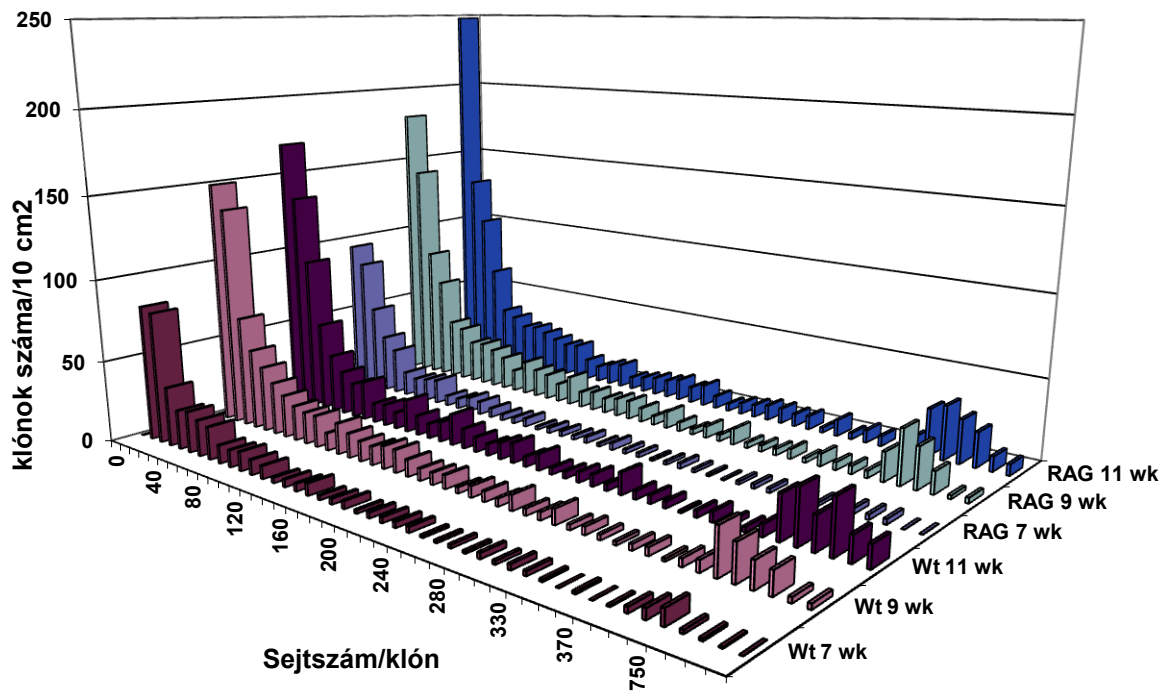
Az immunrendszer és a daganatok között egy igen komplex kapcsolat áll fenn, amelynek számos klinikai aspektusát fent részleteztük. Talán az egyik legfontosabb a spinalioma incidenciájának az emelkedése a különböző okból létrejövő immunszuppresszió eredményeként. Az ultraibolya sugárzás immunrendszerre gátló hatással van, önmagában is tehát immunszuppresszív. A klinikai gyakorlatban ezt a hatást jól ismerjük és a különböző fototerápiás beavatkozásaink során ki is használjuk a páciensek kezelésére[310]. Az UV-sugárzás immunrendszerre gyakorolt negatív hatásairól már a '70-es években születtek közlemények, felismerték, hogy az UVB hatására keletkező daganatok önmagukban immunogének, és az UVB besugárzás immunszuppresszív[311-313]. Az immunszuppresszió elsődlegesen az adaptív immunitást érinti[314].

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. [315, 316] Ezen egerek esetén a V(D)J rekombinációs aktivitási gén RAG-1 kerül inaktiválásra, aminek eredményeképpen a születendő egereknek kisméretű nyirokszervei vannak, amelyek nem tartalmazzak érett B és T-sejteket. A RAG-1 knock-out egerek immunrendszer tehát „non-leaky” SCID (Severe Combined Immunodeficiency) egerekének felel meg, azaz idősebb korában sem mutat antitest-termelő potenciált.

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 sejtszoportokat, a klónokat. Hasonlóan a C576Bl6 egereken végzett kísérletben az eltelt idő alatt mikroszkopikus p53 mutáns klónok voltak kimutathatóak. 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. Amint az várható volt, a hotspot-ként ismert 8-as exonban

dc_274_11

fellelhető volt a vizsgált 24 mintából 22 esetén. A mutációk jellege is megfelelt az UV kézjegy mutációnak.

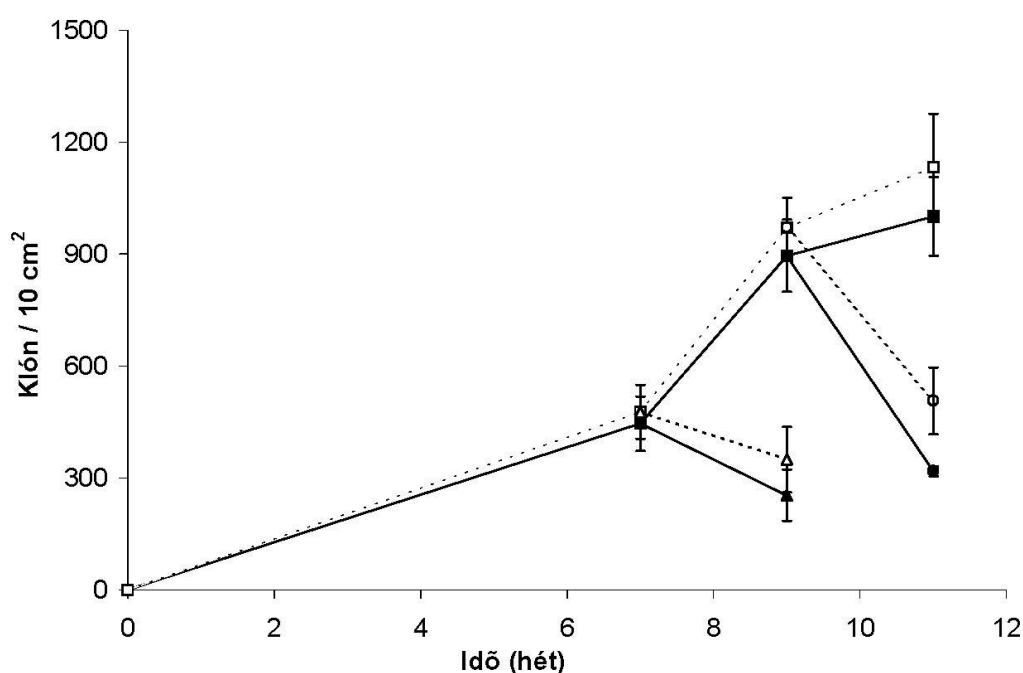


5.4.1 A klónok nagyságának és számának változása az idő függvényében . RAG-1 knock-out és B57/BL6 egerek leborotvált hátbőrét heti 5 alkalommal 750 J/m^2 UVB irradiációnak tettük ki, majd a leválasztott epidermális lemezekben immunhisztokémiai reakcióval azonosítottuk a p53 pozitív sejtcsoportokat és számukat az eltelt idő (hetek) függvényében mutatjuk be.

Az 5.4.1 ábrán megfigyelhető, hogy hosszabb besugárzási idő nagyobb klónokat eredményezett mind a két törzsben. Statisztikailag szignifikáns különbség nem észlelhető a veleszületetten immunhiányos és a vad típusú egerek esetén. Ennek alapján arra következtetünk, hogy az antigén-dependens 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, de az állatokat továbbra is életben hagytuk.



5.4.2 ábra A klónok regressziója az idő függvényében

Vad típusú B57/BL6 egerek (folyamatos vonal) és RAG-1 knock-out (pontosított vonal) leborotvált hátbőrét heti 5 alkalommal 750 J/m^2 UVB irradiációnak tettük ki 7, 9 és 11 hétig. Eutanázia után a leválasztott epidermális lemezekben immunhisztokémiai reakcióval azonosítottuk a p53 pozitív sejtcsoportokat és ábrázoltuk 10 cm^2 -kénti számukat. Két egércsoport besugárzását 7 hétnél (háromszög) és 9 hétnél (kör) abbahagytuk, majd az állatokat további 2 hétig életben hagytuk és ezt követően dolgoztuk fel értékelésre. Adatpontok $\pm$ SEM.

Az UV besugárzás felfüggesztését követően a klónok száma mind a vad, mind a RAG-1 knock-out egerek esetén csökken (5.4.2 ábra), a két előző kísérletünkben látottakkal

egyezően csökkent és nem mutatott szignifikáns különbséget a két egértörzs között. Statisztikailag analizálva az észlelt változásokat, nem lehetett szignifikáns eltérést igazolni a klónok regressziójában ($P_{7wk}=0,89$, $P_{9wk}=0,39$, $P_{11wk}=0,61$, $P_{7+2wk}=0,49$, $P_{9+2wk}=0,16$; t-tesztel analizálva).

Az UV ártalmas hatásai elleni védekezés fontos eleme az a megfigyelés, hogy ismétlődő UV-hatásra az epidermisz megvastagodik, hyperplasia alakul ki. Ebben a folyamatban elsődlegesen a stratum corneum szélesedik ki, de az egész hámréteg több sejtsorból állóvá válik. A növekedés dinamikájára az jellemző, hogy már 48 órával az egyszeri UV-hatás után megindul a hyperplasia, 96h-nál eléri a maximumot és lassan regressziónak indul[317, 318]. Ismétlődő UV-hatás mellett a hyperplasia fennmarad és csak az UV-hatás elhagyása után alakul vissza a hám a normál vastagságúvá. Ennek tükrében nagy jelentősége volt annak, hogy kizárjuk a lehetőségét, hogy a RAG-1 és a C57/Bl6 epidermiszében létrejövő hiperplázia eltérő fokban jelentkezne, mivel vannak közlések, hogy a fokozott hyperplasia esetén fokozottabb a fogékonyság a tumorok képződésére[319]. Az epidermisz a krónikus UV hatásra mindkét állattípusban megvastagodott, de a különbség köztük nem volt jelentős. A hámhyperplázia a 7. héten észleltnél nem volt később sem jelentősebb. Az UV-sugárzás befejezése után 2 héttel a hám vastagsága csaknem teljesen visszatért a besugárzás előtti szintre vad és RAG-1/-/ állatban egyaránt.

A p53 pozitív klónok tanulmányozása a fotokarcinogenezis nagyon korai szakaszának felel meg, amikor az első mutációk keletkeznek és a klonális expanszió elindul. Joggal volt várható, hogy már ebben a korai stádiumban is a hatékony immunfelügyelet detektálja a kezdődő tumorokat. Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy az antigénspecifikus immunitás hiánya nem módosította a klónok kifejlődését és korai regressziójukat sem. Kóros epidermális hyperplasia[319, 320], vagy apoptózis sem volt megfigyelhető[321].

Az eredményt több módon lehet magyarázni. A karcinogenezis nagyon korai szakaszában nem az antigénspecifikus, hanem az veleszületett (innate) immunitásnak van inkább szerepe a megváltozott sejtek eliminálásában. Ez utóbbi fontos elemei az NK-sejtek. A NK-sejt hiányos beige egerekben vagy anti-NK 1.1 antitesttel depletált NK sejttel nem rendelkező állatokban a tumorképződés fokozott[322]. A RAG-1 állatok esetében ugyan az antigénspecifikus immunválasz hiányzik, de az NK-sejtek fejlődéséhez elengedhetetlen T-sejtek jelenléte, illetve az NKT sejtei hiányoznak ezekben az egerekben, így a RAG-1 egerek természetes immunitása nem tekinthető teljesen intaktnak, ennek kísérletes igazolása azonban nem történt meg. Ezek alapján, ha az immunrendszer

eliminációs képességének szerepe lenne a fotokarcinogenezis korai szakában, akkor eltérést várnánk a kísérleti körülményeink között. Feltételezhető, bár kevésbé valószínű, hogy a p53 pozitív sejtek nem immunogének.

További lehetséges magyarázat, hogy a mutáns sejtek antigenitása változik, észlelésre is kerülnek, de az immunválaszt az UV-sugárzás ismert immunszuppresszív hatása megakadályozza. Ekkor is azt észlelnénk, hogy a RAG-1 gén elvesztése nem eredményez a vad egérhez képest eltérést, vagyis a klónok regressziója hasonlóan zajlik mindkét állatcsoportban. Akut UV irradiáció lokális és szisztémás immunszuppressziót, a krónikus UV antigén specifikus immuntolereanciát eredményez[323, 324]. A kontakt hiperszenszenzitivitás gátlásához hasonló háttérű állattörzsön, mint amit a kísérleteinkben használtunk, ehhez magas UV dózisok szükségesek[325]. Ugyancsak magasabb UV dózis adása szükséges egereken a szisztémás immunszuppresszív kísérletekhez is[326]. Az általunk alkalmazott kumulatív dózis ennek hozzávetőleg 40%-a volt. Ez alapján az UV immunszuppresszív hatása nem lenne képes teljesen ellensúlyozni a RAG-1 inaktiválásából fakadó eltéréseket. Ismert hogy, az immunszuppresszió UV után tartós[327]. A fennálló immunszuppresszív hatás ellenére létrejön a klónok gyors regressziója, tehát olyan egyéni faktorok játszhatnak ebben szerepet, amelyek függetlenek az immunrendszer különböző elemeitől. Legvalószínűbb a keratinocita apoptózis, és/vagy a hámlás. Kémiai karcinogén által kiváltott papillomák regressziójának hátterében például bizonyítottan nem immunológiai folyamatok álltak[328, 329] az időbeni lefolyásuk az epidermális turnover rátájával mutatott párhuzamot. A klónok korai gyors regressziójában ez a folyamat mindenképpen jelentős. Emellett szól az is, hogy a hám hiperplázia 2 héttel az UV besugárzás beszüntetése után megszűnik. Az UV proliferatív hatásának megszűnése segít a mikroszkopikus prekancerózus lézióktól való megszabadulásban, a fenntartása azonban elősegíti azok növekedését.

Rekombináció aktiválta gén 1 (RAG1-/-) knock-out egereken UVB besugárzás után nem találtunk különbséget a sunburn-sejt képződés, az epidermális proliferáció és a klónok kifejlődésének, valamint regressziójának dinamikájában.

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

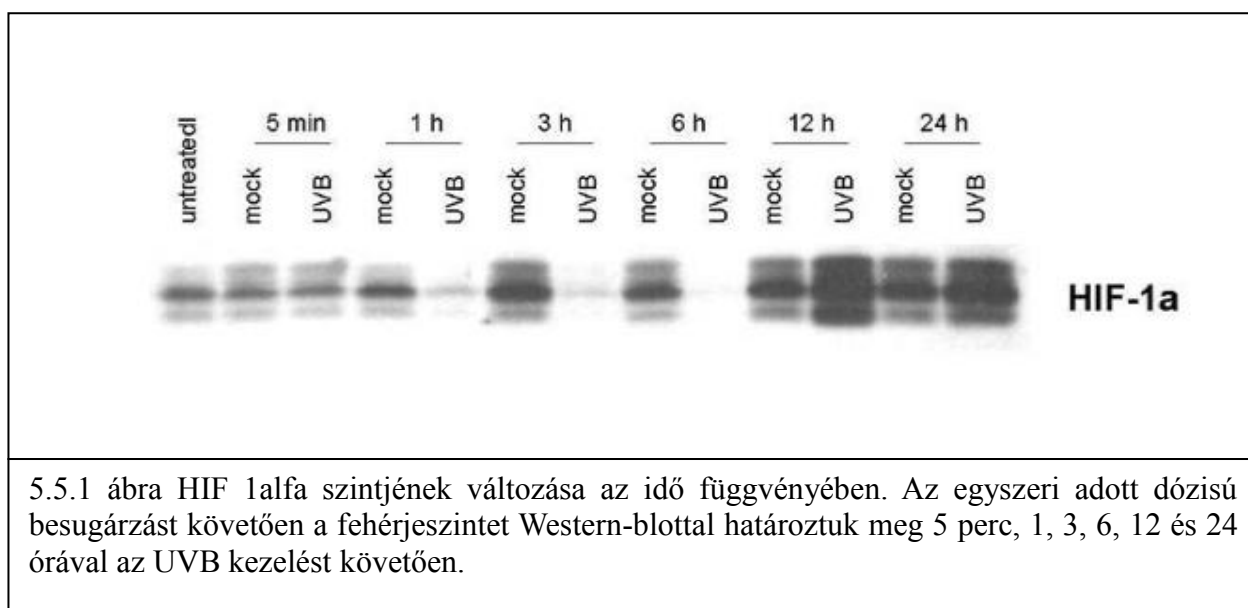
A szervezetben a sejtek és szövetek homeosztázisának fenntartásában nagy jelentőséggel bír az alacsony oxigénkoncentrációhoz való alkalmazkodás. A bőrben a hypoxia számos patológiás történés kapcsán bír jelentőséggel. A teljesség igénye nélkül ezek a folyamatok közé tartoznak a dermisz és az epidermisz és degeneratív folyamatai, a gyulladás, a fotoageing, illetve a daganatok kialakulása. Azok a jelátviteli útvonalak, amelyek ezekben részt vesznek, más fontos funkciókat is ellátnak. Ezek közül legfontosabb a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF). Fenti folyamatokban a VEGF központi szerepet játszik és egyben ennek jól ismert a VEGF UV fény által való indukálhatósága. A hypoxia indukálható faktor-1 (HIF1) szorosan felügyeli a VEGF expresszióját különböző kísérleti körülmények között. Vizsgálataink során azt a célt tűztük ki, hogy vizsgáljuk az UVB hatását a HIF1 szintjére, mint a hypoxia által indukált gének központi regulátorára. A HIF1 alfa expressziója vizsgálatához HaCaT sejteket használtunk, amelyeket adott dózisu UV-val besugarazva kezeltünk, majd a sejteket leszüreteltük és Western-blottal dolgoztuk föl. A downstream célgén expressziójának vizsgálata kvantitatív real-time PCR-el történt. Az UVB hatására azt figyeltük meg, hogy a kezdeti HIF1 alfa csökkenést követően egy gyors emelkedési fázis következik be. Ha a sejteket egy ismételt UVB besugárzással kezeltük, akkor a kezdeti HIF 1 alfa csökkenés újra előidézheto volt, hasonlóan az első besugárzáshoz. Az ilyen módon észlelt változások jól voltak időben és dózis függvényében követhetők. Vizsgálataink szerint a PI3K, AKT útvonal 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 gátlója hatékonyan gátolta az UVB kiváltotta HIF1 alfa emelkedését. A korábbi közlésekkel összhangban mi is azt találtuk, hogy az UVB besugárzás a VEGF és a HEM1 oxigenáz 1 szintjét emelte, amint ezt a real-time PCR-el vizsgálatunk is meghatározta. Következtetésül levonhatjuk, hogy a HIF1 alfa expresszió központi szerepet játszik a VEGF szabályozásában UVB hatására. Emellett az AKT útvonal szerepét is igazoljuk ebben a folyamatban.

Az UVB az általunk alkalmazott dózisban nem volt letális hatású a HaCaT keratinocitákra

Ahhoz, hogy a letális és a szubletális UVB sugarakat meghatározzuk a HaCaT sejteket körülbelül 70 és 90 % közötti konfluenciánál besugaraztuk a széles spektrumú UVB fénnyel. Az alkalmazott dózisok 50 – 67 mJ/cm² között voltak. A sejtek életképességének megítélésére Petri csészék felét 24 órával a kezelés után fénymikroszkóppal vizsgáltuk, amíg a másik felét áramlási citometriával vizsgáltuk, miután propídium jodiddal (PI), majd annexin 5 FLUOS-szal festettük meg. Adataink azt mutatták, hogy az egy perces UVB besugárzás, ami 67 mJ/cm² dózissal felelt meg, minden vizsgált sejt kultúrában a hámsejtek elhalását okozta, ami egyértelműen észlelhető volt, mivel sejtek a Petri csésze alakjáról felváltak.

5.5.1 Az UVB hatására a HIF1 alfa szintje az időben dinamikusán változik

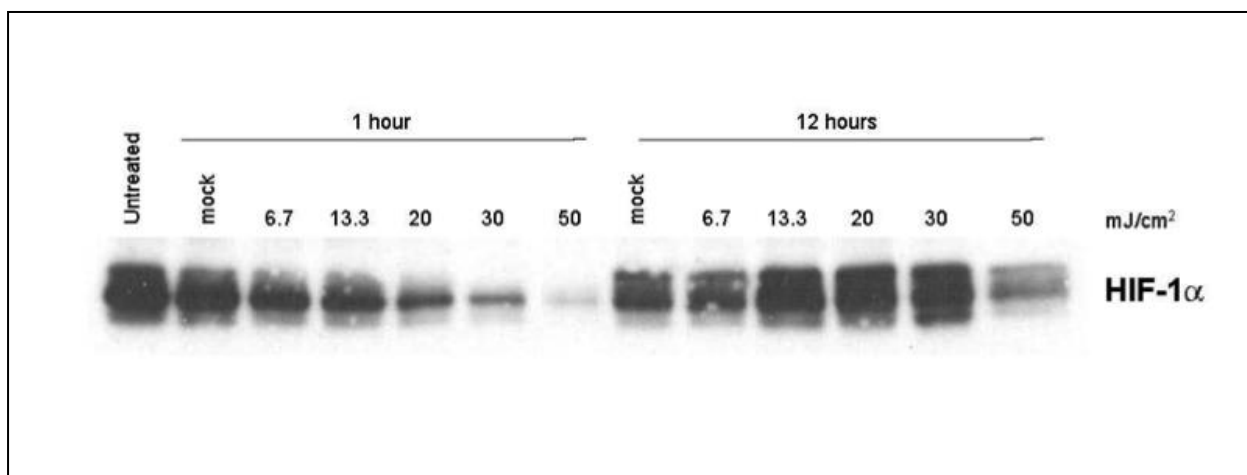
A HaCaT sejteket 20 mJ/cm²-es UVB dózissal besugaraztuk, 1 és 24 óra közötti időszakban több időpontnál leartattuk a sejteket, majd a HIF1 alfa protein szintjét Western-blottal határoztuk meg. A kapott eredményt az 5.5.1 ábrán demonstráljuk. A méréseink azt mutatták, hogy az UVB hatás után 5 perccel még jelentős fehérjeszint gyors csökkenésnek indul, 1, 3 és 6 órával a besugárzást követően a HIF-1 alfa protein szintje a kezdeti értékhez képest jelentősen lecsökkent, egy csaknem alig detektálható szintet ért el. Ezután azonban



egy jelentős emelkedés 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 valamelyest a 24 órás időpontban már a 12 órás érték alá esik.

5.5.2 A HIF1 alfa szintje az UVB dózistól függően változik

A HIF-1alfa hatás dózis függését 6,7 – 50 mJ/cm² közötti UVB dózisok használatával vizsgáltuk, ahogy ezt az 5.5.2 ábrán mutatjuk. Ebben a kísérletben a kezdeti 1 órás HIF-1alfa szint csökkenés mindegyik dózisonál észlelhető volt, legmarkánsabban az 50 mJ/cm²-es besugárzás után jelentkezett. Ennél a legmagasabb dózisonál azonban a második lépésként észlelt emelkedés nem következett be, ami vélhetőleg a túlságosan magas besugárzás dózisnak és a következményképpen kialakuló sejtelhalásnak volt köszönhető.



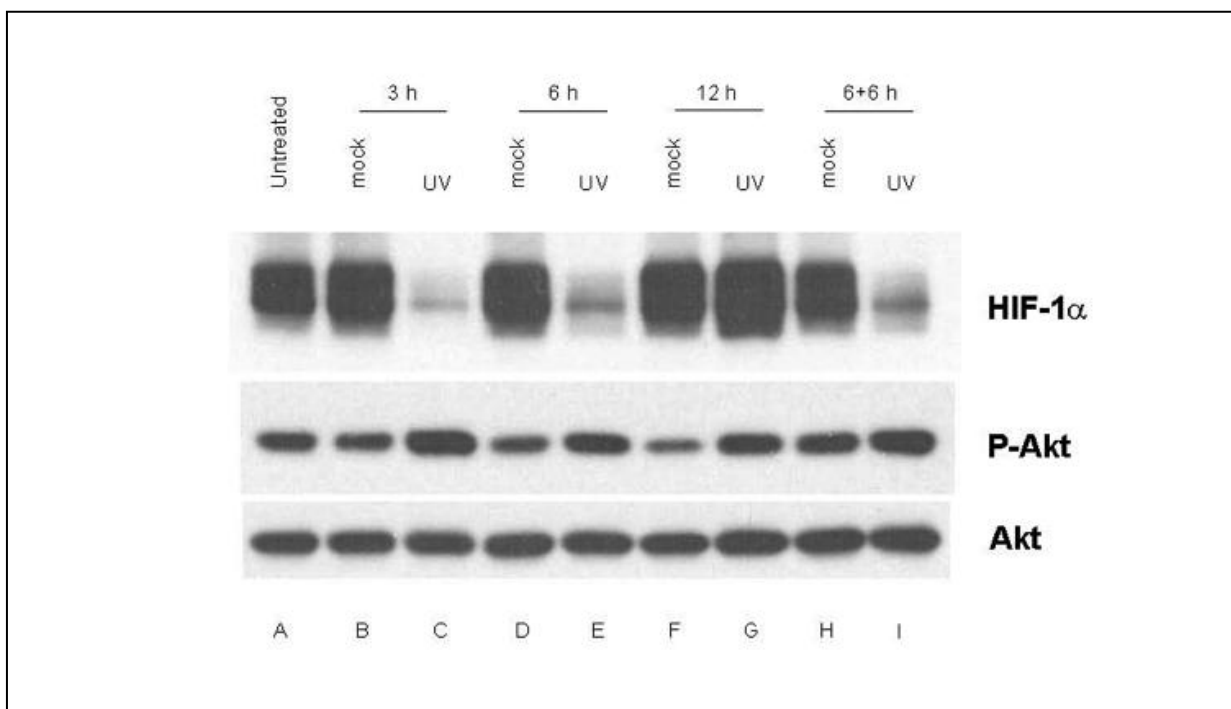
5.5.2 ábra HIF 1 alfa szintjének változása az UVB dózisának függvényében. Az egyszeri adott dózisú besugárzást követően a fehérjeszintet Western-blottal határoztuk meg 1 és 12 órával az UVB kezelést követően.

Ennek megfelelően a legjobb kompromisszum 20 mJ/cm² dózis alkalmazása volt, amelyik tulajdonképpen a bazális keratinociták *in vivo* napfény expozíciója után elszenvedett UV-dózisnak felel meg[330, 331].

5.5.3 Az UVB hatásával előidézett HIF1 alfa szintcsökkenés ismételt UVB besugárzással újraindítható

Az UVB besugárzás megismétlése kapcsán a HIF1 és az AKT foszfolizációját is

vizsgáltuk. A dinamika pontos megértéséhez egy olyan kísérletet végeztünk, amely során 6 órával a kezdeti besugárzást követően a sejteket újra besugaraztuk és további 6 óra elteltével leszüreteltük. Emellett szintén leszüreteltünk egy 12 órával a kezdeti besugárzás után lévő kultúrát is. Amint azt az 5.5.3 ábrán látható, azt tapasztaltuk, hogy a 6+6 órás besugárzás után észlelt protein expresszió nem a 12 órás értéknek, hanem a 6 órás értéknek felelt meg, azaz a HIF 1alfa szintjének változása az ismételt UV besugárzás után újraindult, a 12 óránál várható szintemelkedést az ismételt irradiáció kivédte. Az AKT szintje minden időpontban lényegében megegyezett a kontrolléval és nem mutatott érdemi változást az idő függvényében. Sokkal inkább dinamikusan változott a foszforilált AKT szintje (P-Akt). Az Akt foszforilációját egy specifikus anti-F-Aktin antitest segítségével vizsgáltuk, amely azt igazolta az UV kezelt mintákban, hogy emelkedett foszforilált AKT-ot lehetett találni.



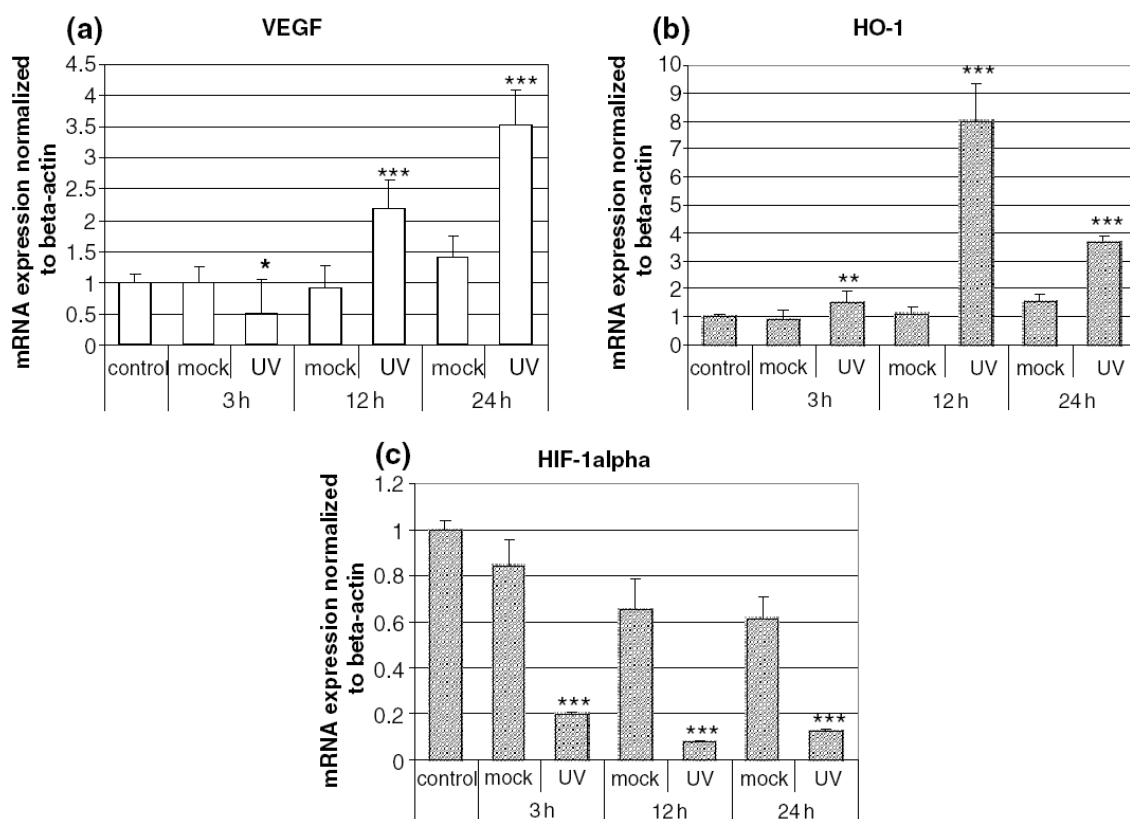
5.5.3 ábra HIF 1alfa szintjének változása az időben egyszeri 20 mJ/cm² UVB besugárzás után. A kezdeti besugárzást követően a 6+6 h jelzésű sejteknél egy ismételt UVB sugárzást végeztünk 6 órával az eredeti kezelés után. A fehérjeszintet Western-blottal határoztuk meg. Az össz Akt szintet és a foszforilált Akt szintet (P-Akt) külön mértük.

5.5.4 Az UVB hatása a HIF1 alfára, VEGF, HO1-re mRNS szinten

A HIF1 alfa protein szintű változásával párhuzamban real-time kvantitatív PCR-rel tanulmányoztuk a VEGF és a HO1 mRNS expresszióját, amely két jól ismert HIF1 alfa

célgén. Fentiek mellett tanulmányoztuk továbbá a HIF1 alfa mRNS szintű változásait is. Kísérleteink során a béta-aktin expressziós szint volt a normalizáláshoz használt érték.

Az 5.5.4.-es ábrán látható, hogy az UVB kezelés hatására VEGF és a HO-1 mRNS szint is

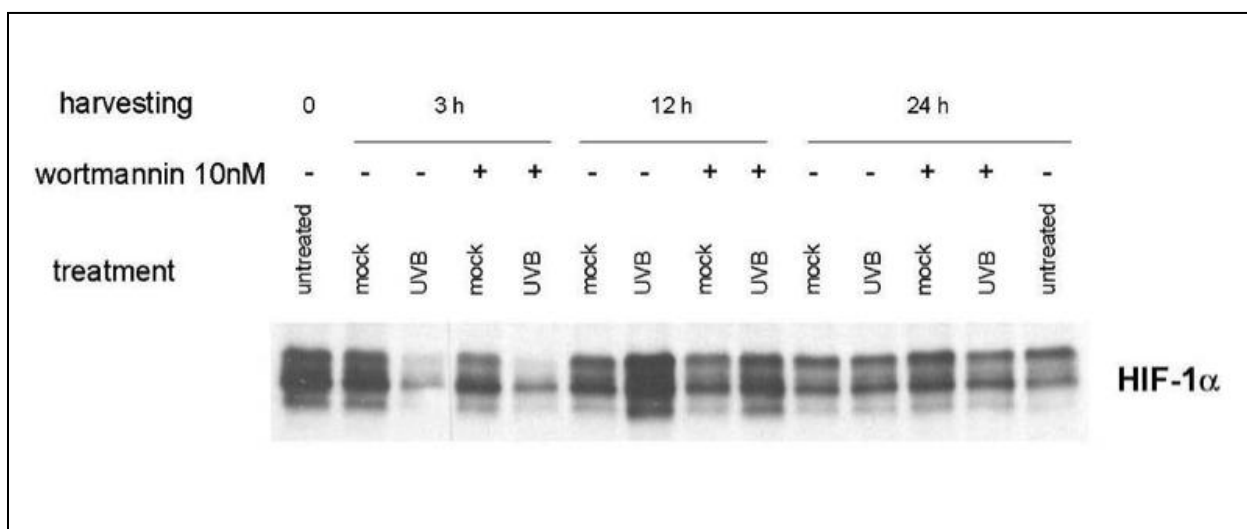


5.5.4 ábra A VEGF és HO-1 szintjének változása az idő függvényében. Konfluens sejtkultúrákat sugaraztunk be 20 mJ/cm² dózisú UVB-vel és arattuk le 3, 12 és 24 óra elteltével. Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF – a panel), hem-oxigenáz 1 (HO-1, b panel), és HIF 1alfa (c panel) mRNS szintű meghatározás történt kvantitatív real-time PCR-rel.*:marginálisan szignifikáns (P<0,05), **:szignifikáns (P<0,01), magasan szignifikáns (P<0,001) különbség

emelkedett 12 és 24 órával a besugárzás után, mint azt az összes ábrán mutatjuk. A fentebb leírt HIF1 alfa proteinszintű csökkenése 3 órával a besugárzást követően a VEGF csak egy nagyon enyhe mRNS szintű csökkenésben nyilvánult meg, míg a HO-1 szint csökkenést nem is lehetett látni. Emellett azonban a HIF1 alfa mRNS jelentős csökkenést mutatott a besugárzást követő 3 – 12 – 24 óra elteltével.

5.5.5 A PI3K gátlása csökkenti a HIF1 emelkedését az UVB expozíció után.

Korábbi vizsgálatokkal igazolták, hogy a PI3K szabályozása egy fontos pozitív regulátora a HIF1 alfa résznek különböző modellekben. UV besugárzásról pedig leírták, hogy PI3K szintjének emelkedéssel jár együtt. Emiatt aztán kísérleteinkben wortmannin alkalmazását kezdtük el, amely egy ismert specifikus PI3K enzim inhibitor. A kísérletekben a sejt szuszpenzióhoz közvetlen az UV besugárzás után wortmannint adtunk, majd a korábban leírt módon a sejteket 3, 12, 24 óra elteltével leszüreteltük. Western-blot vizsgálattal tanulmányoztuk a wortmannin gátló hatását a HIF1 alfa protein szintjére. A wortmannin képes volt kivédeni HIF1 alfa szint emelkedését 12 órával a besugárzást követően, ezzel a PI3K-AKT útvonal szerepére utalt (5.5.5 ábra).



5.5.5 ábra A PI3K-AKT útvonal szerepét igazoltuk a HIF 1alfa szintjének változása mögött. A korábbiakhoz hasonlóan 20 mJ/cm² UVB kezelés után a jelzett 3, 12 és 24 óra elteltével vizsgáltuk a HIF 1alfa szintjét Western-blottal. Wortmannin hozzáadása nem védte ki a 3 óránál észlelt szintcsökkenést, de az utána jelentkező 12 óránál várható szintemelkedés nem következett be.

Az UVB besugárzás az egyik legfontosabb környezeti stressz faktor, amely az epidermiszt éri. A széles körben tanulmányozott mutagén hatásán kívül ismert, hogy befolyásolja az epidermális lipid szintézist, a lamelláris testek szekrécióját és károsítja az epidermális lipid barriert is. Bár az UV besugárzás utáni vaszkuláris és gén expressziós változások (VEGF, HMOX1) arra utaltak, hogy a hypoxia szignalizációnak szerepe lehet az UV válaszban, de erre vonatkozó bizonyítékok hiányoztak. Munkánk során a HIF-1alfa, a legfontosabb hypoxia szignalizációs molekula bifázisos válaszát mutattuk ki UVB hatására keratinocitákon. A HIF-1alfa szint változása időben jól modellezhető volt és dózis-dependens jelleget mutatott. A HIF-1 alfa upregulációja egybeesett a VEGF és HMOX1 mRNS transzkripcionális felszabályozásával, bizonyítva a HIF-1alfa szerepét az UVB válasz szabályozásában. A wortmannin hatékony inhibitornak mutatkozott a második fázisban észlelhető HIF-1alfa szint emelkedés kivédésében, ami a folyamat PI3K-AKT általi regulációját veti fel. A HIF-1alfa célgének transzkripciójában észlelt változás potenciális lehetőséget ad a HIF1 alfának a celluláris metabolizmusok energia gazdag oxidatív formából alacsony energiájú hypoxiás állapotba történő átállítására. Továbbá feltételezhető, hogy a hypoxia rendszer szerepet játszik UVB-hatás után a lipidek magas energiájú és oxigén-dependens celluláris metabolizmusának a leszabályozásában is, és így magyarázatul szolgálhat a napsugárzás után észlelt epidermális lipid barrier változások egy részére is. HIF1alfha később akár terápiás célmolekula lehet az UV besugárzás után észlelt epidermális hatások minimalizálására.

5.6 Egyes újonnan azonosított szfingolipid derivátumok a keratinocita differenciációt fokozzák

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[332]. A nem-korneocitához kötött ceramidoknak 9 fő osztálya ismert, míg a kovalensen kötött ceramidokat négy osztályba soroljuk[333, 334]. Főként ez utóbbiak azok, amelyek nemcsak építőelemként működnek, hanem sejtfunkciók szabályozásában is részt vesznek[335-345]. A ceramidok és az apoptózis összefüggésének további érdekessége, hogy ebben a folyamatban a p53 is meghatározó szerepet játszik[346].

Jelen munkánkban egy konfluencia-indukálta differenciációs modellben vizsgáltuk normál

humán keratinociták viselkedését pro- és anti-differenciációs anyagok hozzáadása után.

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

A vizsgálatokban használt a vegyületeket az 5.6.1 táblázatban ismertetem a rövidítések értelmezésének megkönnyítésére.

5.6.1. A szfingolipid vegyületek citotoxicitásának meghatározása

A keratinociták differenciációjának befolyásolása, mint potenciális gyógyszer célpont, hatalmas gyakorlati jelentőséggel bír. Az általunk beállított konfluencia-indukálta differenciációs modell alkalmasnak kínálkozik szfingolipid vegyületek hatásának vizsgálatára. A szfingolipidek differenciációra gyakorolt hatásának vizsgálata előtt elsőként a vegyületek citotoxikus hatására voltunk kíváncsiak. A tenyésztett humán keratinociták 1 μ M, 5 μ M és 25 μ M koncentrációjú szfingolipid származékokkal kezeltük, hidrogén peroxid, mint oxidatív stresszor és Na-laurilszulfát, mint membrán károsító anyag szolgált pozitív kontrollként. A 25 μ M koncentrációjú kezelés eredményeit mutatjuk be az 5.6.2 táblázatban.

Egységesen fellépő citotoxikus efféktust egyetlen vegyületnél sem lehetett észlelni még a legmagasabb 25 μM koncentráció esetén sem. A pozitív kontrollok viszont hatékony

Rövidítés	Kémiai név
Ret	Retinol
D3	Calciferol
PS	Phytosphingosine
SO	Sphingosine
SA	Sphinganine
SLC	Salicylat
PS-C6	Hexanoyl-Phytosphingosine
SO-C6	Hexanoyl-Sphingosine
SA-C6	Hexanoyl-Sphinganine
PS-C18	Stearoyl-Phytosphingosine
SO-C18	Stearoyl-Sphingosine
SA-C18	Stearoyl-Sphinganine
SO-SLC	Sphingosine-Salicylate
SA-SLC	Sphinganine-Salicylate
PS-SLC	Phytosphingosine-Salicylate
C12	C12-Alkylamine
C12-SLC	C12-Alkylamine-Salicylate

5.6.1. táblázat A vizsgálatokhoz használt szfingolipid vegyületek és a kontrollként használt retinol és D3-vitamin, calciferol. A retinol potens differenciáció gátló, míg D3-vitamin differenciáció-indukáló hatással bír.

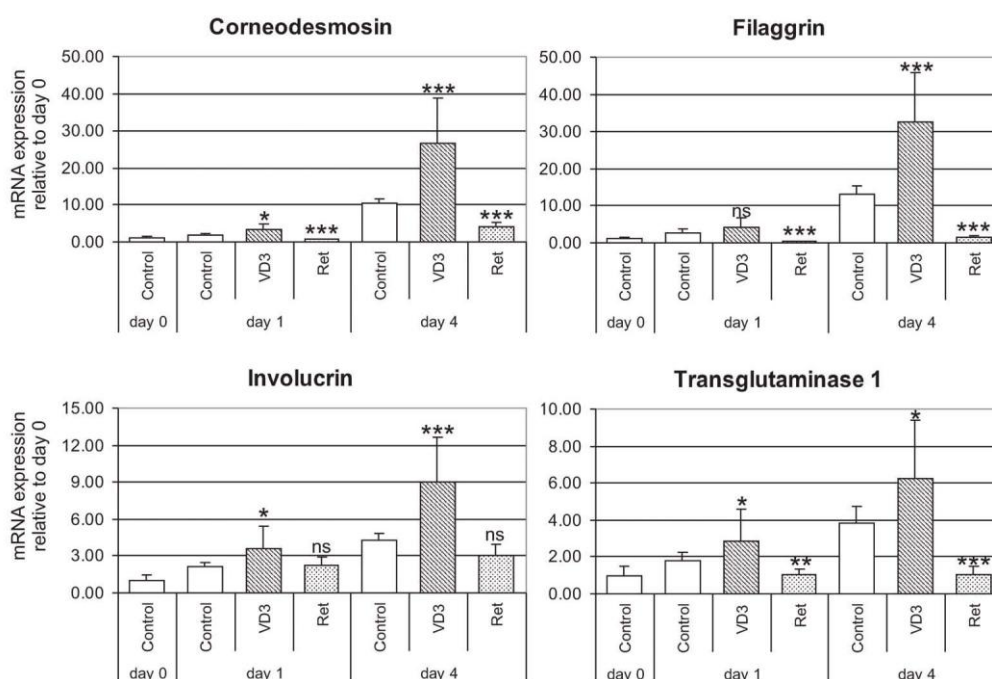
toxikus hatással bírtak rendszerünkben is. Egyes vegyületek azonban okoztak sejtkárosodásra utaló eltéréseket: a PS emelkedett LDH felszabadulást idézett elő, Ret, SA, SO-C18, PS-SLC, SLC, és a C12 emelte a felülúszóban az adenilát kináz (AK) szintet. A hámsejtek kezelése SA-SLC-vel csökkentette az ATP koncentrációját a sejtekben. A 4 napig tartó magas, 25 μM koncentrációjú inkubálás jelentős sejtkárosító hatást volt képes előidézni az alábbi vegyületeknél: SA-SLC, PSSLC alkalmazása jelentős LDH, AK és ATP szint változással járt, míg C12-SLC az AK és az ATP jelentősebb változását idézte elő. Az alacsonyabb, 1 μM és 5 μM koncentráció azonban ezek esetén sem okozott a 4 napos inkubálás során sem jelentős károsodást (ábrát nem mutatjuk). Ennek megfelelően tehát a szalicilát és szalicilát tartalmú többi ágenst csak az 1 napos kísérletben használtuk magas, 25 μM dózisban. A 4 napos kísérletben 5 μM koncentrációban adtuk a sejtekhez..

tested compounds	day 1			day 4		
	LDH release	Adenylate-kinase release	ATP levels in cells	LDH release	Adenylate-kinase release	ATP levels in cells
H ₂ O ₂						
SDS						
Ret						
VD3						
SLC						
PS						
SO						
SA						
PS-C6						
SO-C6						
PS-C18						
SO-C18						
SA-C18						
SO-SLC						
SA-SLC						
PS-SLC						
C12-SLC						

5.6.2 táblázat A vizsgált vegyületek citotoxicitása. A vizsgált anyagok citotixicitását 25 μ M koncentráció mellett vizsgáltuk, pozitív kontrollként Na-laurilszulfátot (SDS, 25 μ M) és hidrogén peroxidot (H₂O₂, 1mM) alkalmaztunk. A citotoxikus hatás a színek sötétetbbé válásával jellemeztük: fehér = nincsen hatás, világos szürke = alacsony, sötétszürke = közepes hatás, fekete = magas fokú citotoxicitás.

5.6.2. A konfluencia-indukált differenciáció megfelelő hatékonysággal használható kísérletes modellként

Négy jól ismert keratinocita differenciációs marker mRNS expresszióját vizsgáltuk, ezek az alábbiak voltak: transzglutamináz 1, filaggrin, involucrin, és korneodesmosin. Mindegyik esetén a 4-ik napon expresszió fokozódást lehetett észlelni a konfluencia-



5.6.1. ábra Normál humán keratinociták differenciációs marker génjeinek expressziójának változása 4 napos konfluencia-indukált differenciáció során TaqMan® real-time RT-PCR-rel vizsgálva. 25 µM retinol vagy 50 nM kalciferol (VD3) hozzáadása történt a 0-ik napon az 1 napos mérésnél, és a 0-ik és 3.ik napon a 4 napos mérésnél. Az adatok a átlag + SD. (Statisztikai szignifikancia *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$, ***: $p < 0.0001$).

indukálta differenciációs rendszerünkben. (5.6.1. ábra) Vizsgálatainkban két ismert keratinocita differenciációra jelentős hatással bíró anyagot használtunk, a retinolt és a kalciferolt (VD3). A retinol a keratinociták differenciációját hatékonyan gátló anyag, vizsgálatainkban is hasonlóan működött, gátolta a transzglutamináz 1, a filaggrin, a 10-es keratin és a korneodesmosin indukcióját. A kalciferol viszont egy ismert keratinocita

dc_274_11

differenciációt előidéző anyag, a modellrendszerünkben amúgy is előidézett differenciációt tovább fokozta, amint azt a 4 differenciációs markerként használt gén expressziója igazolta.

Az irodalom áttekintésekor 150 keratinocita differenciációhoz társuló gént lehetett a közölt cikkek alapján fellelni. Ezeket vizsgálva 53 gén esetén találtunk legalább 1,9-szeres változást 4 nappal a differenciáció indukciója után. Ebből az 53 génből összesen csak 2 volt downregulált és 51 volt upregulált, amint azt a 5.6.3 táblázatban bemutatjuk.

UniGene	Gén neve	Rövid név	Affymetrix	Fold
Hs.250236	late cornified envelope 1E	LCE1E	1559224_at	69.5
Hs.234766	late cornified envelope 2B	LCE2B	207710_at	57.9
Hs.707	Keratin 2A	KRT2A	207908_at	36.8
Hs.80828	Keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	KRT1	205900_at	35.5
Hs.302034	phospholipase A2, group IIF	PLA2G2F	221416_at	32.3
Hs.25333	interleukin 1 receptor, type II	IL1R2	205403_at	30.6
Hs.432416	Trichohyalin	THH	213780_at	27.9
Hs.375103	late cornified envelope 1B	LCE1B	1560531_at	27.3
Hs.251680	Loricrin	LOR	207720_at	26.1
Hs.516420	Skin-specific protein	xp33	216718_at	22.8
Hs.139389	cystatin E/M	CST6	206595_at	22.2
Hs.201877	DESC1 protein	DESC1	220431_at	17.1
Hs.433629	small proline rich protein 4	SPRR4	1552620_at	16.6
Hs.520006	Corneodesmosin	CDSN	206192_at	14.0
Hs.490253	small proline-rich protein 2G	SPRR2G	236119_s_at	13.1
Hs.297413	matrix metalloproteinase 9	MMP9	203936_s_at	12.0
Hs.531478	Filaggrin	FLG	215704_at	11.7
Hs.407618	desmoglein 4	DSG4	1561330_at	11.5
Hs.112408	S100 calcium binding protein A7 (psoriasin 1)	S100A7	205916_at	11.4
Hs.105924	defensin, beta 4	DEFB4	207356_at	11.0
Hs.148641	cathepsin H	CTSH	202295_s_at	10.2
Hs.151254	kallikrein 7 (chymotryptic, stratum corneum)	KLK7	205778_at	8.6
Hs.19413	S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C)	S100A12	205863_at	7.4
Hs.148590	Cornifelin	CNFN	224329_s_at	7.0
Hs.2633	desmoglein 1	DSG1	206642_at	6.8
Hs.2022	transglutaminase 3	TGM3	206004_at	6.3
Hs.129719	transglutaminase 5	TGM5	207911_s_at	6.3
Hs.282997	glucosidase, beta; acid (includes glucosylceramidase)	GBA	209093_s_at	5.9
Hs.406998	sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1	SULT2B1	205759_s_at	5.9
Hs.550492	phospholipase A2, group IVB (cytosolic)	PLA2G4B	219095_at	5.5
Hs.376144	Repetin	RPTN	1553454_at	5.3
Hs.2421	small proline-rich protein 2C	SPRR2C	220664_at	4.8
Hs.139322	small proline-rich protein 3	SPRR3	218990_s_at	4.7
Hs.76171	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	CEBPA	204039_at	4.3
Hs.57771	kallikrein 11	KLK11	205470_s_at	3.7
Hs.285671	bone morphogenetic protein 6	BMP6	206176_at	3.4
Hs.514913	serine or cysteine proteinase inhibitor, clade B, member 2	SERPINE2	204614_at	3.4
Hs.112341	protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	PI3	203691_at	3.2
Hs.59403	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	SPTLC2	203127_s_at	3.1
Hs.508950	transglutaminase 1	TGM1	206008_at	3.1
Hs.519689	peroxisome proliferative activated receptor, delta	PPARD	208044_s_at	3.0
Hs.331555	serine protease inhibitor, Kazal type 5	SPINK5	205185_at	3.0
Hs.50915	kallikrein 5	KLK5	222242_s_at	2.9
Hs.32949	defensin, beta 1	DEFB1	210397_at	2.6
Hs.272373	interleukin 20	IL20	224071_at	2.6
Hs.500635	Envoplakin	EVPL	204503_at	2.5
Hs.415702	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	SLC27A4	225779_at	2.5
Hs.516439	Involucrin	IVL	214599_at	2.4
Hs.2062	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	VDR	204253_s_at	2.4
Hs.79876	steroid sulfatase (microsomal), arylsulfatase C, isozyme S	STS	203767_s_at	2.3
Hs.546248	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	CTSD	200766_at	2.1
Hs.429052	integrin, beta 1	ITGB1	1553530_a_at	-1.9
Hs.529618	transferrin receptor (p90, CD71)	TFRC	207332_s_at	-2.5

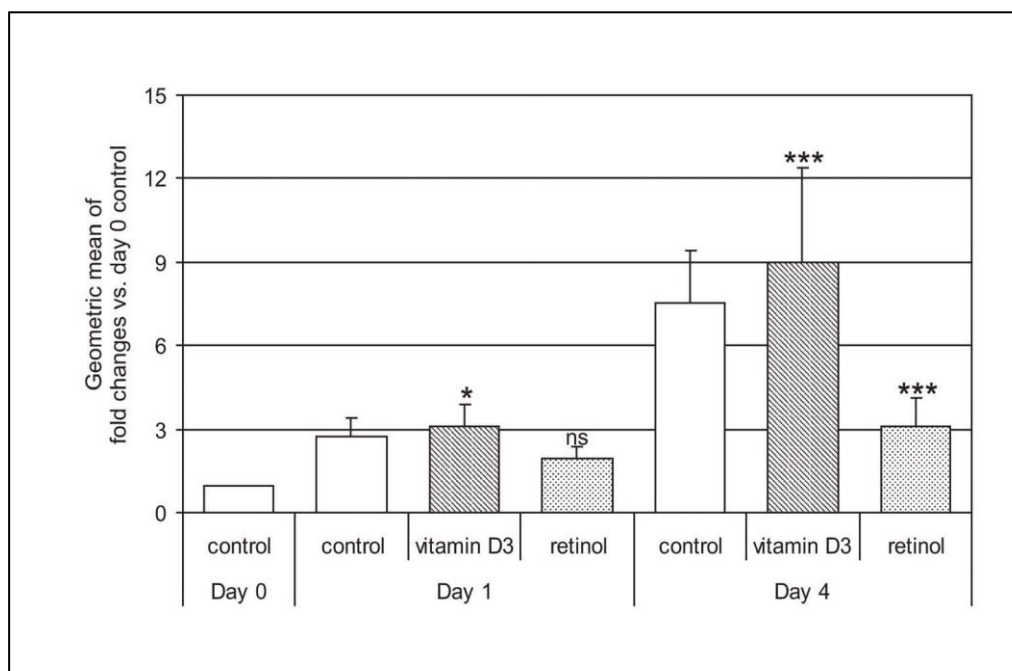
5.6.3. táblázat Az 53 elemből álló differenciációs marker gén csoport egyes elemeinek változása a konfluencia-indukálta differenciáció indukálta modellrendszerünkben. Az utolsó oszlop jelzi, hogy az illető gén hány-szoros változáson ment át a 4-ik és 0-ik napot összehasonlítva. (Affymetrix GeneChip adatok)

5.6.3. Az átlagos génexpresszió változás több gén expressziójának változását vizsgálva jól tükrözi a differenciációra hatással lévő anyagok hatékonyságát

A fentebb azonosított 53 gén expressziójában fellépő változás alkalmas volt arra, hogy a keratinocita differenciációját elősegítő változásokat mérjük és így összehasonlítsuk a hámsejtek differenciációjában bekövetkező változásokat az egyes vegyületek hatására.

A retinol és a D3-vitamin egyértelműen módosították ezeknek a géneknek az expresszióját a tőlük elvárható módon, azaz a retinol gátolta, a D3-vitamin elősegítette (5.6.2. ábra).

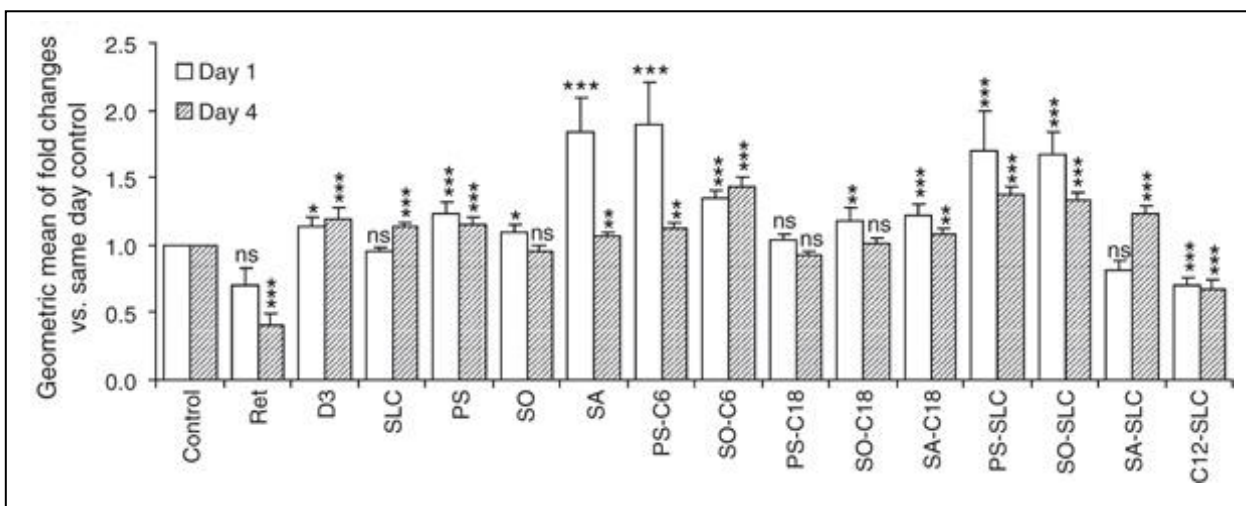
A génexpressziós változásoknak mértani közepe a retinol hatására 29,38 %-ot mutatott ($P=0,0995$) és 59,04 % ($P<0,0001$) csökkenést az első és a negyedik napon. Míg a D-vitamin kezelés emelkedett differenciációs változásokban nyilvánult meg, az első napnál 13,76% ($P=0,015$) a negyedik napnál 19,77% ($P<0,001$).



5.6.2. ábra A kiválasztott 53 differenciációs marker gén összesített expresszióváltozása 4 napos konfluencia által előidézett differenciáció után mérve Affymetrix gene array assay-vel. A mérésekhez az interindividuais eltérések minimalizálására három összegyűjtött keratinocita kultúrát használtunk. 25 μ M retinol vagy 50 nM D3-vitamin hozzáadása történt a 0-ik napon az 1 napos kísérlethez, illetve a 0-ik és 3-ik napon a 4 napos kísérlethez. Az adatok mértani közepek +SEM. (Szigifikáns eltérés a kontrollokhoz *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$, ***: $p < 0.0001$). Minden 1. és 4. napos eredmény szignifikáns volt ($p < 0.001$) a 0-ik napos kontrollhoz képest.

5.6.4 Szfingolipid származékok keratinocita differenciációt moduláló hatása

Az átlagos gén expresszió változás mértékét az 53 keratinocita differenciációs marker gén esetén úgy számoltuk ki, hogy a differenciáltatott, de kezeletlen kontroll sejteket összehasonlítottuk a kezelt sejtekkel azonos időpillanatokban. A kezelés első napja után a PS-C6, SA, PS-SLC és az SO-SLC bírtak a leghatékonyabb differenciáció-indukáló hatással. A kezeletlen kontrollhoz képest a különbség nem volt ennyire egyértelmű 4 nap kezelés után, különösen a PS-C6 és az SA esetén, de a differenciációval társuló génexpresszió-fokozódás még mindig szignifikáns mértékű volt. Kevésbé kifejezett expresszió változás hasonló kinetikával szintén megfigyelhető volt a PS, SO és az SA-C18



5.7.3. ábra A szfingolipid vegyületek különbözőképpen szabályozzák az 53 gént figyelő modell rendszerünkben észlelhető expresszió-változását. Az expresszió változásának mértani közepét tüntettük fel a kezelést követő 1 és 4 nap múlva. Minden vegyület hatását az azonos időpillanatban konfluencia-indukálta génexpresszió változáshoz hasonlítjuk. Az 1-nél kisebb értékek gátlást jelentenek, 1-nél nagyobb értékek a differenciáció fokozását jelentik. (szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$, ***: $p < 0.0001$). A SEM értékeket tüntettük fel.

esetén, amik közül az SO nem szignifikáns csökkenést mutatott a 4-ik napon a kontrollhoz képest. Az SO-C6, SA-SLC az SLC kezelést különböző kinetikával mutattak növekedést az első és a negyedik nap között. Nem volt szignifikáns hatékonysága a keratinocita differenciációra a PS-C18, SO-C18 vegyületeknek, ellentétben a C12-SLC-vel, amely az egyetlen anyag volt, amely negatívan befolyásolta az asszociált

differentiációs génexpressziókat. Érdekes módon az SO-C6, PS-SLC, és az SO-SLC képesek voltak még a pozitív kontrollként használt D3-vitaminnál is hatékonyabban promotálni a keratinocita differenciációt, mind az első, mind a negyedik napon. Emellett az ellentétes póluson a CL-12 SLC megbízhatóan gátolta a keratinocita differenciációs géneket a kísérleti rendszerünkben, amely gátló hatás csaknem elérte a retinol differenciáció gátló hatását.

5.6.5 A vegyület-specifikus promoter modellek összehasonlítása

Hat vegyület-specifikus összetett promoter modellt (CPM) hoztunk létre azért, hogy a 6 vizsgált vegyülettel (PS, PSC6, PS-SLC, SO-SOC6 és az SO-SLC) kezelt sejtekben tanulmányozzuk az egy nap után upregulált gének promotereit. A CPM részleteit az Anyagok és Módszerek fejezetben tárgyaltuk.

Kompozit promoter modell (CPM) előállítás

CPM megalkotásához a CMA szoftvert használtuk. Maga a modell olyan PWM párokból áll, amelyek adott távolságra és irányultsággal bírtak, és a számítógép azonosította őket. A fellelhető PWM párok egy jellegzetes TF-kötőhely kombinációt adnak meg, amelyek az adott szfingolipid vegyület által upregulált gének promotereiben közös.

A vizsgálatokkal azonosítható transzkripciós faktorok sokfélék voltak, csak néhány közös a az egyes vegyület-specifikus promoter modellben. Ezek az alábbi gének termékei voltak: GR, PAX8, TCF12 és FOS (5.6.4. táblázat). Kiemelendő, hogy a vizsgált vegyületekre egyértelműen lehetett egy specifikus mintázatot észlelni, és ezek között olyan gének, pl. NFkB1, GATA6, GATA3, ETS2, SOX9 is előfordultak, amelyek a sejt differenciáció szabályozásban ismertén részt vesznek, annak során különböző extracelluláris szignálok hatására stimulálódnak.

Összegezve a fentieket, nyilvánvaló, hogy ha a keratinocita differenciáció folyamatát különböző anyagokkal befolyásolni tudjuk, annak egyértelmű bőrgyógyászati és kozmetológiai jelentősége van. Abból a célból, hogy hatékonyan tesztelhessünk 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-indukált keratinocita differenciációs modell alkalmas választás ezeknek az anyagoknak a differenciációra kifejtett hatását tanulmányozni. Számos publikációban lehet találni néhány keratinocita differenciációs gént, amit vizsgáltak, aztán a szabályozás függvényében, vagy pro-, vagy anti-differenciációs hatásúnak véleményezték azt[347, 348]. A hagyományos technikákkal nem lehetett kvantitatíve összevetni különböző vizsgálati anyagok hatását. A microarray kísérletek azonban egyértelműen igazolták használhatóságukat az expressziós szintek megítélésében különböző gének esetén nagy pontossággal, s emellett a különböző differenciációs gének között egy kombinált analízis lehetősége is rendelkezésre áll. Az általunk használt keratinocita modellben, melyben a konfluencia elérése indukált differenciációt, a 150 kérdéses gén közül 53 gén mutatott 1,9-szeresnél nagyobb változást.

Modellünk alkalmasnak bizonyult tehát gének expressziójának vizsgálatára, mint azt az egyenként vizsgált génekkel (transzglutamináz-1, filaggrin, keratin 10, és korneodezmozin, l. 5.6.1 ábra) is igazolni lehetett. A különböző szfingolipid vegyületek vizsgálatakor azt észleltük, hogy a szalicilát hozzákapsolása jelentősen megváltoztatja az egyes szfingolipidek differenciáció-indukciós potenciálját. A fitoszfingozin hatékonyabbá vált a szalicilát hozzákapsolásával, míg a szfingozin, amelynek önmagában nem volt jelentős hatása a keratinocita differenciációra, a szalicilát hozzákapsolásával potens differenciáció-indukáló ágenssé vált. A szalicilát szerepe a vegyületek apoptózist elősegítő képességének a fokozásában is megnyilvánult. A különböző szfingolipid vegyületek közül a fitoszfingozin-szalicilát és a szfingozin-szalicilát tűnik leginkább alkalmasnak bőrgyógyászati és kozmetológiai felhasználásra.

A fitoszfingozinnak kimutatták in vivo kísérletekben a kollagén és fibrillin szintézist indukáló, és matrix metalloproteáz I gátló hatását[349].

A promoter analízises vizsgálatban kerestük a szaliciláttal történő módosítás hatását a komplex transzkripcionális hálózatra, amely során arra találtunk igazolást, hogy a szalicilát nem csak a differenciáció-indukció hatékonyságát, hanem annak transzkripcionális profilját is megváltoztatja, így további vizsgálatok számára bírhat jelentőséggel.

dc_274_11

TF symbol	PS	PS-C6	PS-SLC	SO	SO-C6	SO-SLC	Sum (+)	Gene name
NR3C1(GR)	+	+	+	+	+	+	6	
PAX8	+	+	+	+	+	+	6	Paired box gene 8
TCF12	+	+	+	+	+		5	Transcription factor 12 (HTF4)
JUND	+	+	+		+	+	5	jun D proto-oncogene
JUNB	+	+	+		+	+	5	jun B proto-oncogene
FOSL2	+	+	+		+	+	5	FOS-like antigen 2
JUN	+	+	+		+	+	5	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)
FOS	+	+	+		+	+	5	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CEBPB			+	+		+	3	CCAAT fenhancer-binding protein (C fEBP), beta
CEBPD			+	+		+	3	CCAAT fenhancer-binding protein (C fEBP), delta
CEBPA			+	+		+	3	CCAAT fenhancer-binding protein (C fEBP), alpha
CEBPG			+	+		+	3	CCAAT fenhancer-binding protein (C fEBP), gamma
RELA				+	+		2	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
NFKB1				+	+		2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer
SREBF1				+	+		2	Sterol regulatory element binding transcription factor
NFE2L2		+		+			2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
MAFB		+		+			2	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
NFE2L1		+		+			2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1
MAFF		+		+			2	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
BACH1		+		+			2	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper
MAF		+		+			2	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MAFK		+		+			2	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
STAT6	+			+			2	Signal transducer and activator of transcription 6
CBFB	+			+			2	Core-binding factor, beta subunit
HMGA2	+					+	2	High mobility group AT-hook 2
HMGA1	+					+	2	High mobility group AT-hook 1
HSPA1A	+				+		2	Heat shock 70-kDa protein 1A
FOXO3A	+				+		2	Forkhead box O3A
WDR45L	+				+		2	WDR45-like
FOXP1	+				+		2	Forkhead box P1
HTLF	+				+		2	Human T-cell leukemia virus enhancer factor
ELK3		+					1	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)
ETS1		+					1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
GATA3		+					1	GATA-binding protein 3
SMAD5		+					1	SMAD, mothers against DPP homolog 5 (Drosophila)
ELF1		+					1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor
SMAD2		+					1	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)
ETS2		+					1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
RFX1		+					1	Regulatory factor X, 1
GTF2I					+		1	General transcription factor II, I
SOX9						+	1	SRY (sex-determining region Y)-box 9
TFAP2A				+			1	Transcription factor AP-2 alpha
TFAP2C				+			1	Transcription factor AP-2 gamma
ATF4	+						1	Activating transcription factor 4
EGR1	+						1	Early growth response 1
STAT3	+						1	Signal transducer and activator of transcription 3
TFDP1	+						1	Transcription factor Dp-1
XPB1	+						1	X-box binding protein 1
STAT1	+						1	Signal transducer and activator of transcription 1
RXRA	+						1	Retinoid X receptor, alpha
VDR	+						1	Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor
EGR3	+						1	Early growth response 3
ATF3	+						1	Activating transcription factor 3

5.6.4. táblázat A 6 vegyület-specifikus promoter modellben vizsgált transzkripció faktorok listája.
+ jelzi az adott transzkripció faktor jelenlétét a modellben.

5.7. Egész-genom transzkripcionális profilanalízis segítségével új differenciáció-regulált gének azonosíthatóak keratinocitákban

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 differenciáció szerepét a bevezetésben részletesen tárgyaltuk.

A keratinocita differenciációban résztvevő gének ismerete ezen betegségek jövőbeni 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 módszerrel, microarray technikával tenyésztett normál humán keratinocitákon vizsgáltuk a konfluencia-indukálta differenciációt a célból, hogy új, a differenciációhoz társuló géneket találjunk.

Jelen vizsgálatsorozatban arra kerestünk választ, hogy a korábbi kísérletek során használt 4 napos konfluencia-indukálta modellben talált gének hosszabb idővel is upregulálódnak találtak-e. Vizsgáltuk továbbá, hogy az azonosított gének *in vivo* is bírnak-e jelentőséggel.

Kísérletes rendszerünkben normál humán keratinocitákat vizsgáltunk olyan módon, hogy a sejteket konfluencia-indukálta differenciációnak tesszük ki, a teljes genom génexpresszió változásokat vizsgáltuk mRNS szinten, RNS izolátumon, a korábban részletezett módszert alkalmazva[350]. Az up- és downregulált expresszió-változások validitását BiNGO analízisnek vetettük alá, illetve a psoriasisban észlelt génváltozásokkal vetettük össze.

A rendszerünk olyan irányú képességét, hogy új keratinocita differenciációs gének azonosítson, 12 potenciális keratinocita differenciációs génnel vizsgáltuk. Kvantitatív PCR mellett immunhisztokémiai vizsgálata a potenciálisan új keratinocita differenciációs géneknek fehérjeszintű vizsgálatokra is kiterjesztettük. Az azonosítottakkal rokon gének

expresszióját is vizsgáltuk, amely által új biokémiai útvonalak szerepét próbáltuk feltérképezni.

5.7.1 A keratinocita differenciáció nagyszámú gén expresszióját változtatja

A keratinocita differenciációhoz konfluencia-indukálta differenciációt használtunk. Vizsgálatunk első körben 932 fel- és 629 leszabályozott gént azonosított, ha a változást minimum 2,5-szeresben határoztuk meg. Az 5.7.1-es táblázatban a legmagasabban felszabályozott gének listáját mutatjuk be. A táblázatban ábrázoltuk, hogy hány-szoros változás történik az egyes géneknél 4 napos konfluencia-indukálta keratinocita differenciáció esetén mikroarray technikával. A tábla A panelében a legalább 20 szoros változásokat mutató géneket, a „B” részletben a 8-nál többszörös down-regulációval mutatjuk be. Míg a „C” szekcióban a kevesebb, mint 20 szoros upregulációt mutató géneket mutatjuk be, amelyeket utána real-time kvantitatív PCR méréssel is vizsgáltunk. BiNGO analízisnek alávetve a teljes listából a legalább 2,5-szeres változást mutató géneket az epidermális differenciációhoz társuló gének jelentősen felülreprezentálva voltak.

További megerősítésként végeztünk egy olyan összehasonlítást, mikor psoriasisban észlelt génexpressziós változásokkal[351] vetettük össze a mi listánkat, hiszen a psoriasis egy ismertén megváltozott keratinocita differenciációval 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 psoriasis azonban ismertén jelentős fokban a keratinocita differenciáció zavarával jár együtt, ezért a psoriasis vizsgálata során észlelt génexpresszió változások adatai jól használhatóak voltak. Az adatok a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisból származtak[352]. A GDS2518 elérhetőségi számú kísérlet adatai voltak ismételtén feldolgozva a mikroarray szignifikancia analízis (SAM) szoftverrel. [351]. Ha 2-szeres változás 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 génei szintén túlnyomó többségben jelen

dc_274_11

voltak a psoriasisban változó gének listáján is ($P < 0.0001$).

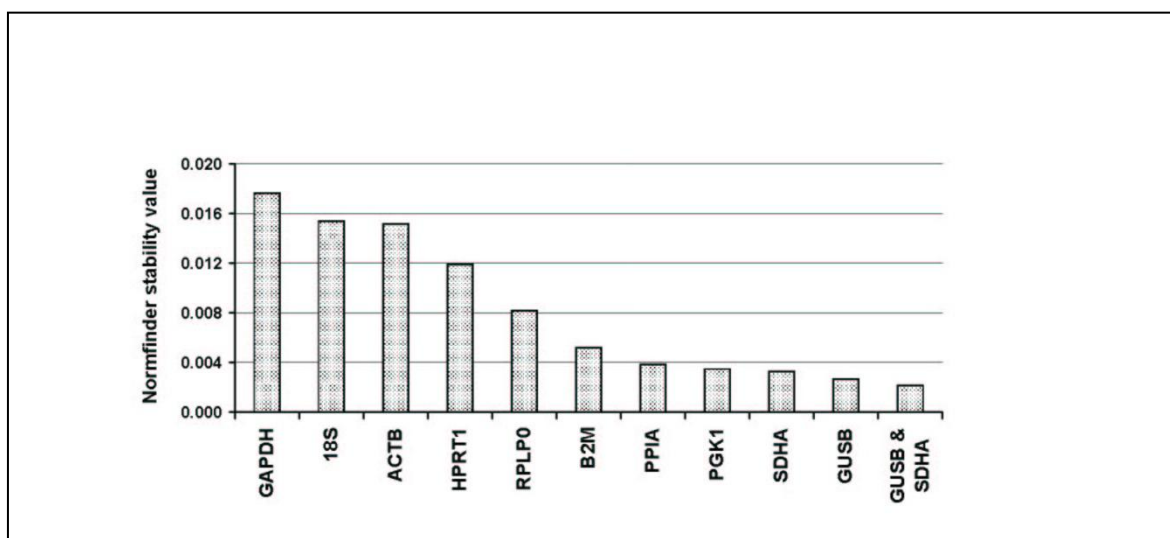
Emellett szignifikánsan felülreprezentáltak voltak ($P < 0.001$) a downregulált keratinocita probe-ok, a psoriasis listán szereplőkkel összevetve. Ezzel a kontroll rendszerrel a keratinocita downregulált génlista is validálhatóvá vált.

Probe set ID	UniGene ID	Gene symbol	Gene name	Fold change
A. More than 20-fold up-regulated genes				
216935_at	Hs.516420	C1orf46	Chromosome 1 open reading frame 46	142,02
220108_at	Hs.126715	GNA14	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 14	115,36
221470_s_at	Hs.166371	IL1F7	Interleukin 1 family, member 7 (zeta)	76,11
207710_at	Hs.234766	LCE2B	Late cornified envelope 2B	55,72
240388_at	Hs.59363	KRT27	Keratin 27	51,98
218454_at	Hs.131933	FLJ22662	Hypothetical protein FLJ22662	45,25
220413_at	Hs.175783	SLC39A2	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 2	42,22
207908_at	Hs.707	KRT2	Keratin 2 (epidermal ichthyosis bullosa of Siemens)	36,76
205900_at	Hs.80828	KRT1	Keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	35,51
206628_at	Hs.1964	SLC5A1	Solute carrier family 5, member 1	35,51
236536_at	Hs.470277	GALNT13	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 13	34,30
206643_at	Hs.190783	HAL	Histidine ammonia-lyase	34,30
233340_at	Hs.483771	SPINK5L3	Serine protease inhibitor	33,13
221416_at	Hs.302034	PLA2G2F	Phospholipase A2, group IIF	32,00
213307_at	Hs.268726	SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2	32,00
1553602_at	Hs.348419	SBEM	Small breast epithelial mucin	30,91
239430_at	Hs.546554	IGFL1	Insulin growth factor-like family member 1	29,86
1553973a_at	Hs.334274	SPINK6	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 6	29,86
223484_at	Hs.112242	C15orf48	Chromosome 15 open reading frame 48	28,84
223720_at	Hs.244569	SPINK7	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative)	28,84
209309_at	Hs.546239	AZGP1	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	27,86
1558378_a_at	---	C14orf78	Chromosome 14 open reading frame 78	27,86
205403_at	Hs.25333	IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II	26,91
1560531_at	Hs.375103	LCE1B	Late cornified envelope 1B	26,91
230983_at	Hs.434133	FAM129C	Family with sequence similarity 129, member C	26,91
207720_at	Hs.251680	LOR	Loricrin	25,99
206605_at	Hs.997	P11	26 serine protease	25,11
231930_at	Hs.495779	ELMOD	ELMO (engulfment and cell motility) domain containing 1	24,25
210613_s_at	Hs.216226	SYNGR1	Synaptogyrin 1	23,43
202888_s_at	Hs.1239	ANPEP	Alanine (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, CD13)	23,43
207192_at	Hs.103503	DNASE1L2	Deoxyribonuclease I-like 2	22,63
207367_at	Hs.147111	ATP12A	ATPase, H ⁺ /K ⁺ transporting, non-gastric, alpha polypeptide	21,86
219391_at	Hs.406134	BPNT1	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1	21,86
206595_at	Hs.139389	CST6	Cystatin E/M	21,86
210619_s_at	Hs.75619	HYAL1	Hyaluronoglucosaminidase 1	21,86
204540_at	Hs.433839	EEF1A2	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	21,10
B. More than 8-fold down-regulated genes				
205569_at	Hs.518448	LAMP3	Lysosomal-associated membrane protein 3	-25,11
231856_at	Hs.189825	KIAA1244	KIAA1244	-21,11
229372_at	Hs.532401	GOLT1A	Golgi transport 1 homolog A (Saccharomyces cerevisiae)	-16,00
215123_at	Hs.632865	LOC23117	KIAA0220-like protein /// similar to nuclear pore complex interacting protein	-13,45
207877_s_at	Hs.497867	NVL	Nuclear valosin-containing protein-like	-12,55
204979_s_at	Hs.473847	SH3BGR	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein	-12,55
203293_s_at	Hs.465295	LMAN1	Lectin, mannose-binding, 1	-11,71
216264_s_at	Hs.439726	LAMB2	Laminin, beta 2 (laminin S)	-11,31
236355_s_at	Hs.36190	LOC728190	Hypothetical protein LOC728190	-10,56
212621_at	Hs.591040	KIAA0286	KIAA0286 protein	-10,20
227674_at	Hs.390568	ZNF585A	Zinc finger protein 585A	-10,20
224163_s_at	Hs.8008	DMAP1	DNA methyltransferase 1 associated protein 1	-9,85
220738_s_at	Hs.368153	RPS6KA6	Ribosomal protein S6 kinase, 90 kDa, polypeptide 6	-9,85
214774_x_at	Hs.460789	TNRC9	Trinucleotide repeat containing 9	-9,51
203771_s_at	Hs.488143	BLVRB	Biliverdin reductase A	-9,19
221501_x_at	Hs.648395	LOC339047	Hypothetical protein LOC339047	-9,19
242626_at	Hs.567973	875H10.1	SAM (sterile alpha motif) domain containing 1	-8,88
210103_s_at	Hs.155651	FOXA2	Forkhead box A2	-8,57
229000_at	Hs.38004	ZNF77	Zinc finger protein 77	-8,57
226670_s_at	Hs.641481	C20orf119	Chromosome 20 open reading frame 119	-8,57
226978_at	Hs.103110	PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	-8,00
C. Genes included in the quantitative PCR validation experiment				
203665_at	Hs.517581	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	17,75
227410_at	Hs.435080	FAM43A	Family with sequence similarity 43, member A	10,93
219916_s_at	Hs.121178	RNF39	Ring finger protein 39	9,51
60528_at	Hs.198161	PLA2G4B	Phospholipase A2, group IVB (cytosolic)	7,73
227454_at	Hs.631758	TAOK1	Thousand and one amino acid protein kinase 1	5,86
206662_at	Hs.28988	GLRX	Glutaredoxin (thioltransferase)	5,28
231733_at	Hs.56279	ICEBERG	ICEBERG caspase-1 inhibitor	4,76
209873_s_at	Hs.534395	PKP3	Plakophilin 3	4,29
227475_at	Hs.591352	FOXQ1	Forkhead box Q1	3,73
226926_at	Hs.417795	DMKN	Dermokine	3,48
41469_at	Hs.112341	PI3	Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	3,03

206008_at	Hs.508950	TGM1	Transglutaminase 1	3,03
-----------	-----------	------	--------------------	------

5.8.1. táblázat Génexpresszió változása 4 napos konfluencia-indukált hámsejt differenciáció során microarray eredmények alapján.

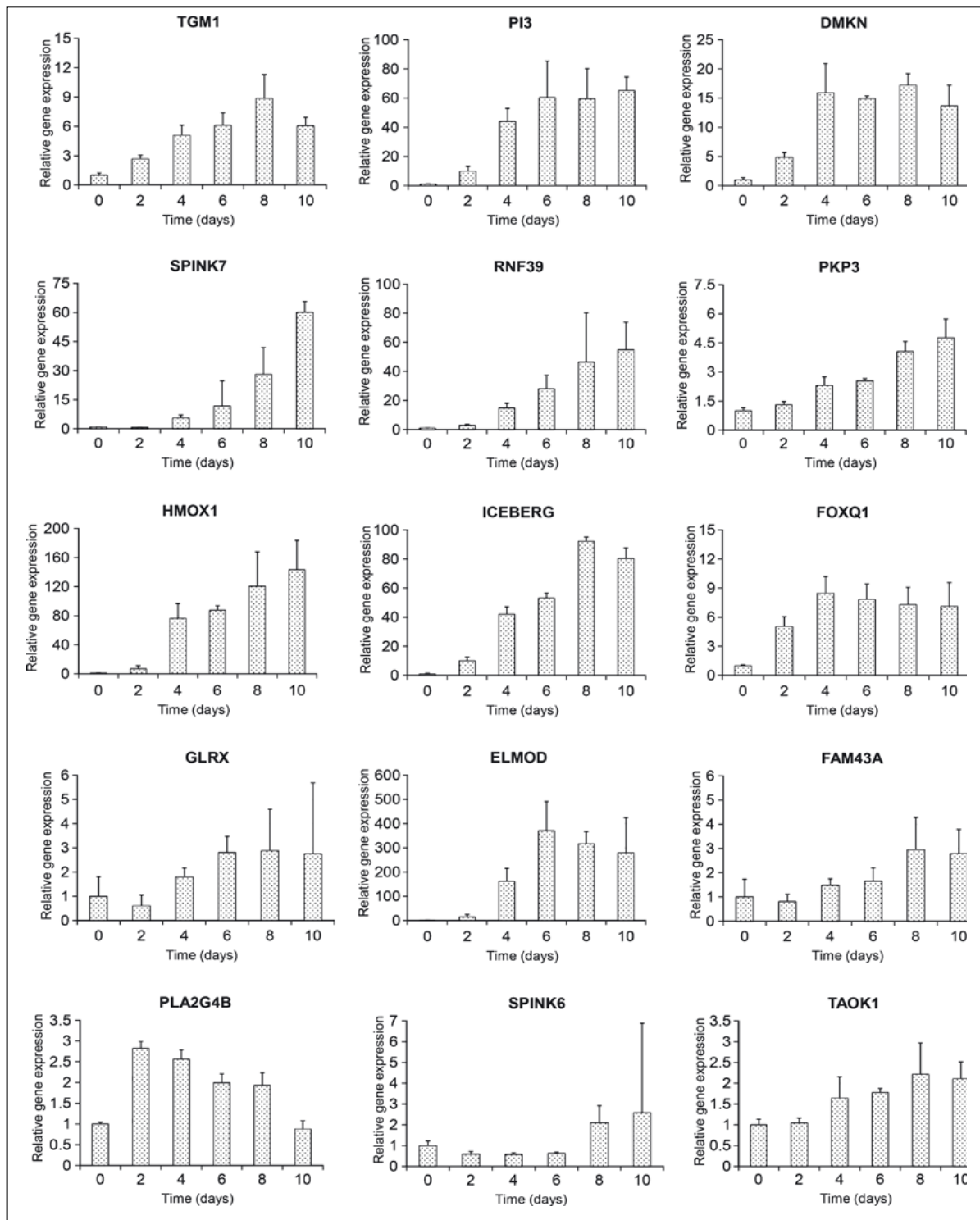
Annak megállapítására, hogy a konfluencia-indukált differenciációs modell valójában képes-e új keratinocita génexpressziókat detektálni, 12 újonnan azonosított gén elemzését végeztük egy hosszabb kísérletben. Ekkor 10 napon keresztül a sejteket 1,2mM Ca^{2+} -mal kezeltük, ilyen módon indukálva terminális differenciációt. A génexpresszió változását 12 potenciálisan jelentős gén és 3 kontroll gén vizsgálatával végeztük. Első lépésként Normfinder analízissel megkerestük a normalizáláshoz legalkalmasabb housekeeping géneket. A real-time kvantitatív PCR mérések szerint ezek a béta-glükoronidáz (GUSB) és a szukcinát dehidrogenáz komplex A alegysége (SDHA) voltak, mint azt az 5.7.1. ábrán mutatjuk be.



5.8.1. ábra. A housekeeping gének mRNS expressziója. Normfinder szoftver igazolta, hogy GUSB a legjobb housekeeping gén és GUSB + SDHA a legjobb kombináció a 10 napos Ca^{2+} -indukálta keratinocita differenciációs modellben a génexpresszió normalizálására.

5.7.2 Szelektált gének expressziójának verifikálása kvantitatív PCR-rel

Ezután 12 teszt és 3 kontroll gént vizsgáltunk Ca^{2+} -indukálta differenciációs modellben, a vizsgált 12-ből nyolcat jelentősen upreguláltak találtunk. Ezek az alábbi gének voltak:



5.8.2. ábra A génexpresszió változásokat mutatjuk 10 napos kalcium indukálta keratinocita differenciáció esetén. Az átlagos génexpressziós változások normalizálása kerültek a GUSB, SDHA, Housekeeping gének szintjére és a 0. napi értékhez voltak viszonyítva. Az SEM-t feltüntettük. Upregulációt akkor véleményeztük, mikor legalább 2,5-szeres volt a változás legalább két időpillanatban kezdő differenciáció indukció után.

Serine peptidase inhibitor, Kazal type 7, RNF39, Plakophilin 3 (PKP3), heme oxygenase 1 (HMOX1), ICEBERG, forkhead box Q1 (FOXQ1), Glutaredoxin (GLRX), ELMO / CED-12 domain containing 1., az eredményeket az 5.7.2 ábrán mutatjuk.

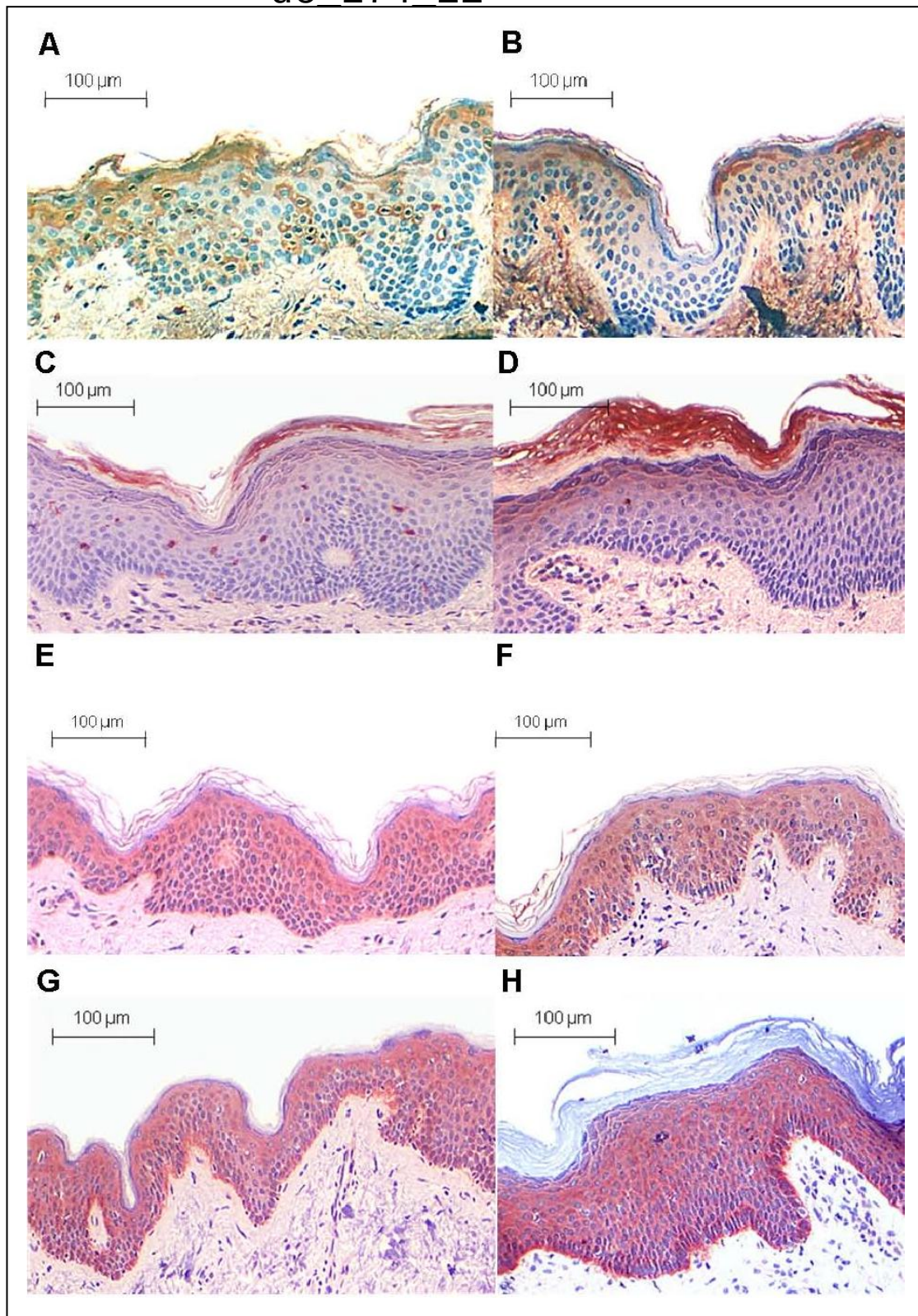
5.7.3 Szelektált gének expressziójának verifikálása immunhisztokémiai módszerrel

Kereskedelmi forgalomban a 8 gén terméke közül 4 ellen volt antitest elérhető (plakophilin-3 (PKP3), hem oxigenáz-1 (HMOX1), forkhead box Q1 (FOXQ1), glutaredoxin (GLRX)), így ezekkel végeztük el az immunhisztokémiai vizsgálatot. Az eredményeket az 5.7.3 ábrán mutatjuk be.

A hem oxigenáz-1 az epidermisz felső rétegeiben volt kifejezettebben expresszáva, mint azt a kvantitatív PCR eredményekből várni lehetett. Megfigyelhető volt a pozitív sejtek egyfajta sajátos csoportos elrendeződése (5.7.3. ábra A panel). Gyulladásos epidermiszben inkább a subcorneális területen volt festődés megfigyelhető (5.7.3. ábra B panel) A GLRX1 expressziójára foltos jelleg volt észlelhető (5.7.3. ábra C panel), míg a gyulladás esetén ehhez egy diffúz festődés társul az epidermisz felső rétegében és a stratum corneumban (5.7.3. ábra D panel). D) A FOXQ1 expressziójára inkább diffúz jelleg a jellemző, a felsőbb rétegek felé kifejezettebb festődéssel (5.7.3. ábra E panel). Gyulladás esetén a jelleg nagyon hasonló, a festődés intenzitása erőteljesebb (5.7.3. ábra F panel).

A PKP3 kifejeződése inkább a bazális rétegre jellemző, és a stratum corneum felé ismételten erősödik (5.7.3. ábra G panel). A gyulladásos bőrön ez az erős bazális, gyenge közép, erős felső epidermisz festődéses jelleg kifejezettebben figyelhető meg (5.7.3. ábra H panel).

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.



5.8.3. ábra A-B: hem oxigenáz-1 (HMOX1), C-D: glutaredoxin (GLRX), E-F: forkhead box-Q1 (FOXQ1), G-H: plakophilin-3 (PKP3) expresszió normál és inflammatorikus humán epidermiszben.

5.7.4 A génexpressziós vizsgálatok gyakorlati aspektusai –új útvonalak feltérképezése

Az újonnan azonosított gének közül néhányat olyan módon próbáltunk értelmezni, hogy regulációs útvonalakat térképezzünk fel segítségükkel. 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 downreguláltnak találtuk a differenciáció során, amely arra utalt, hogy a hámban alacsony a biliverdin redukciója bilirubinná.

Ezt megmagyarázza a biliverdin UV-iránti érzékenysége, amely miatt lehet szükséges az epidermiszben alternatív expressziót kialakítania 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 deglutationizilációért, amelyben egy cisztein aminosav jelenlétére van szükség.

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

Az ICEBERG jelentős upregulációja, amely a kaszpáz-1 (IL-1béta 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 agonistát, a IL-1Rrp2 receptort találtuk 13-szorosan upreguláltnak, így az egyensúly a szuppresszió felé billen. 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 elmondható, hogy vizsgálatainkkal egy részletes listát tudtunk összeállítani

azokról a génekről, amelyek a keratinocita differenciáció során indukálódnak és potenciálisan részt vesznek azon sejt folyamatokban, 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 új regulációs mechanizmusok felismeréséhez vezetett, mint a hemoxigenáz-1 (HMOX1), a glutaredoxin (GLRX), amelyek a potenciális új redox signaling útvonalat jeleznek a differenciáció alatt álló hámsejtekben. Egyéb gének változásai azt mutatták, hogy egy egyértelmű interleukin-1 szignálút vonal downreguláció is megfigyelhető. Azt reméljük, hogy ezek az újonnan azonosított gének egy sokkal összefogottabb áttekintéshez vezetnek a bonyolult differenciációs folyamat megértéséhez és ez által bőrgyógyászati kórképek hátterének alaposabb megismeréséhez.

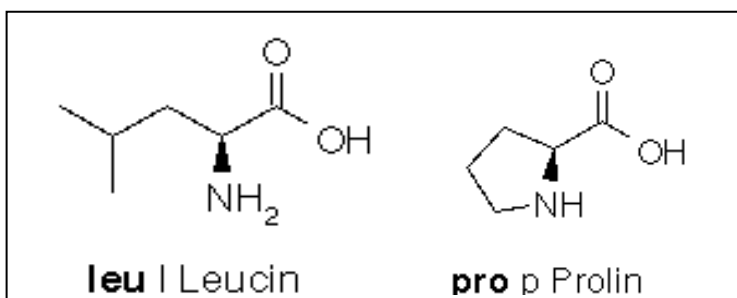
A génexpressziós vizsgálatokkal ilyen módon létrehozott adatbázisok eszközként szolgálhatnak a homeosztázis folyamatainak jobb megértéséhez. Az epidermális barrier kialakulásáért felelős gének feltárása további terápiás targetek azonosításában lehet segítségünkre, hogy végső soron a bőrbetegségeket hatékonyabban kezelhessük.

5.8 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. Szisztémás alkalmazásként vismodegib néven jelenleg fázis III.-as klinikai vizsgálatot is már sikeresen abszolvált ez a molekula irrezekábilis basaliomák esetén.

Vizsgálataink során a PTCH gén egy potenciálisan releváns polimorfizmusára figyeltünk fel szokatlan klinikai jellemzőkkel bíró basaliomás páciensek vizsgálatakor. Ez a polimorfizmus egy aminosav cserével jár, amely során Prolint vagy Leucint kódoló szekvenciákat lehet észlelni a PTCH1 gén 27-es (korábban 23-as) exonjában a 1315 kodonban. Ennek a kodonnak a polimorfizmusát duktális emlő carcinoma kifejlődésével is összefüggésbe hozták, orális antikoncipienst szedő páciensek esetében. Itt azonban a Leucint kódoló allél jelenlétéhez kapcsolták a hormon-indukálta emlő carcinoma kialakulását[353].

A PTCH gén 27-es exonján elhelyezkedő 1315-ös kodon második nukleotidjának polimorfizmusát korábban közölték.[354] 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 fehérje szerkezete jelentősen eltér egymástól, így feltételezhető, hogy ennek a cserének a hatására változik a PTCH gén tumor szuppresszor aktivitása.



5.6.1 ábra: a Leucin és a Prolin szerkezete, amíg a Leucin hidrofób, alifás, addig a Prolin hidrofób neutrális

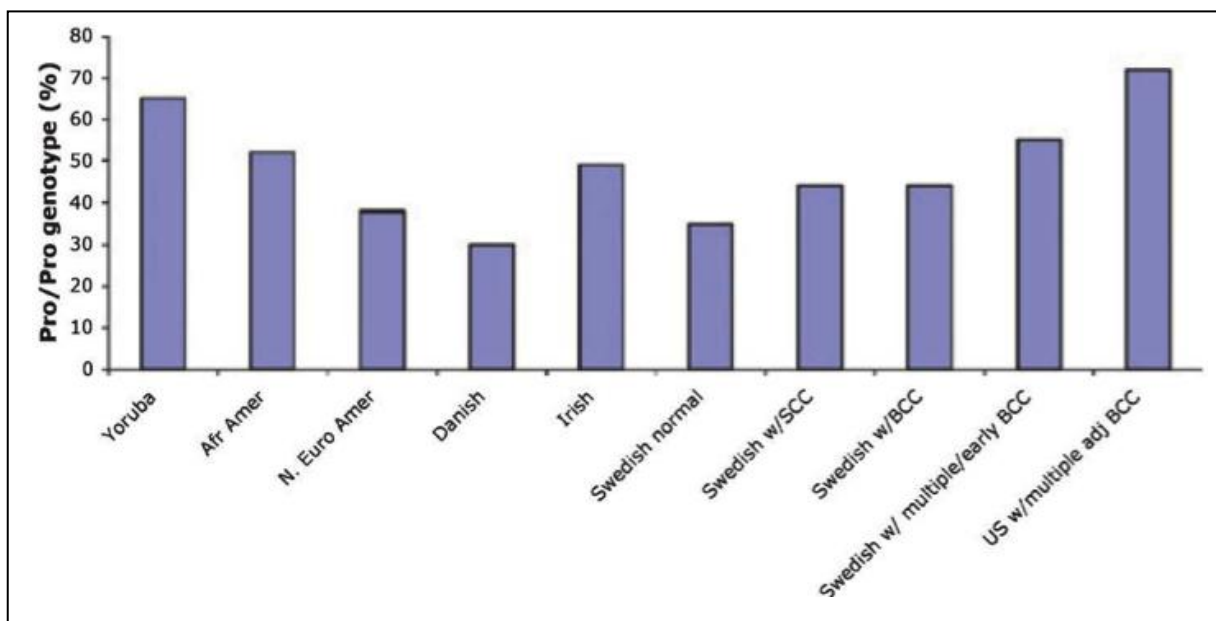
13. ábra: A PTCH protein aminosav sorrendje, a polimorfizmus a 1315-ös kodonnál található

2006-ban a melanocortin 1 receptor variánsainak és a PTCH gént érintő két polimorfizmusnak – köztük a 1315-ös kodon polimorfizmusának - basaliomára hajlamosító hatását vizsgálták a francia populációban. 151 kontroll páciens DNS-ét hasonlították 126 basaliomás beteg DNS szekvenciájához. A beteg csoportba a következő kritériumoknak megfelelő pácienseket választották be: multiplex és/vagy familiáris basaliomában szenvedő beteg; fiatal korban, 40 év alatt és/vagy egyéb tumorral együtt manifesztálódó basaliomában szenvedő beteg. A kutatás emelkedett rizikót mutatott ki a tumor kifejlődésére vonatkozóan a melanocortin 1 receptor variánsai, továbbá a PTCH gén 1315-ös kodonjának Prolint kódoló variánsa esetén[355].

Az a tény, hogy a PTCH gén 1315-ös kodonjának polimorfizmusára nézve heterozigóta egerekben - tehát amelyekben egy Leucint és egy Prolint kódoló allél található a polimorfizmus helyén – a Leucint kódoló allél kiütése (knock-out) után trichoblastoma-szerű tumor kifejlődése volt megfigyelhető, vetette fel a PTCH gén érintettségének lehetőségét humán trichoblastoma kifejlődésében. 11 trichoblastoma vizsgálata esetén nem volt kimutatható mutáció a PTCH génben, ami arra utal, hogy a PTCH gén mutációk valószínűleg nem játszanak szerepet sporadikus trichoblastomák patogenezisében, szemben a basalsejtes carcinomával és a trichoepitheliomával[356].

5.8.1 A fehérebb bőrtípusokhoz a Pro/Pro allél kisebb aránya társul

Fenti adatok alapján tűztük ki célul, hogy az egyes populációkban vizsgáljuk a kodon státusza és az illető embercsoportban kialakuló non-melanoma bőrtumorok és erre hajlamosító kockázati tényezők, leginkább a bőrszín összefüggését. Ha 6 különböző humán populációt vizsgálunk, a Pro/Pro genotípus gyakoriságának a tekintetében, akkor 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 mutatkozott ($P=0,020$) a nyugat-afrikai yoruba bőrtípustól az ír felé haladva. A pigmentáltság világosabbá válása az eumelanin csökkenése 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[357]. Érdekesnek találtuk, hogy az ír populáció kivételt jelentett a nyilvánvaló trend alól, ahogy az 5.8.2. ábrán is látható. Ez a tény különösen annak fényében figyelemre méltó, hogy az írek között is magas a non-melanoma bőrtumorok incidenciája[358]. A svéd normál kontrollok a Pro/Pro allélvariáció gyakorisági lista végén helyezkedtek el, hasonlóan a dán populációhoz.



5.6.2 ábra 6 különböző etnikai háttérrel és bőrszínnel bíró embercsoport összehasonlítása. Vizsgált mintaszámok: yoruba (nyugat-afrikai): 79, amerikai fekete bőrű: 86, észak-nyugati amerikai: 90, dán: 27, ír: 94, svéd: 96, svéd spinaliomás: 55, svéd basaliomás: 88, svéd multiplex vagy fiatalkori basaliomás: 20, amerikai mpx, egy testtáját érintő: 7. A trend szignifikánsan csökkenő a yoruba-ír irányba ($P=0,020$) és a svéd-amerikai mpx egy testtáját érintő irányba ($P=0,027$) χ^2 teszt

5.8.2 A PTCH 1315-ös kodonja Prolin kódolása önmagában nem hajlamosít basaliomák kialakulására

Ahhoz, hogy a 1315-ös kodon Prolin allélváltozatának a bőrtumороk 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 (5.8.1. táblázat)

	Pro/Pro (CCC)	Pro/Leu (CCC /CTC)	Leu/Leu (CTC)	Mintaszám
Kontroll	34 (35,4%)	46 (47,9%)	16 (16,7%)	96
Solaris keratosis	3 (17,6%)	11 (64,8%)	3 (17,6%)	17
NMSC	63 (44%)	61 (42,7%)	19 (13,3%)	143
SCC	24 (43,6%)	25 (45,5%)	6 (10,9%)	55
BCC	39 (44,3%)	36 (40,9%)	13 (14,8%)	88

5.6.1 táblázat A 1315-ös kodon lehetséges allél változatainak eloszlása non-melanoma bőrtumoros svéd páciensek és kontrollok között P = 0,182 χ^2 teszt of 2X3 kontingencia táblázat.

Főként nem lehetett megtalálni a PTCH prolin allél felülreprezentáltságát az NMSC csoportban. Emellett azonban 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 (CCC)	Pro/Leu (CCC/CTC)	Leu/Leu (CTC)	Mintaszám
Kontroll	34 (35%)	46 (48%)	16 (17%)	96
BCC, mpx	4 (50%)	2 (25%)	2 (25%)	8
BCC,korai	7 (58%)	3 (25%)	2 (17%)	12
BCC, korai és mpx	11 (55%)	5 (25%)	4 (20%)	20

5.6.2 táblázat A 1315-ös kodon lehetséges allél változatainak eloszlása a basalioma különböző klinikai formái esetén.

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).

A relatív alacsony mintaszám miatt mindezek mellett nem lehetett kizárni fals negatív észlelés lehetőségét, illetve ebből arra a biztos következtetésre jutni, hogy nincs

egyértelmű összefüggés a prolin hordozása és a bőrtumorok között.

Korábban az amerikai páciensek között genotipizáltuk 7 páciens mintáit, akinek a kórtörténetében nagyon nagyszámú egymástól függetlenül, de egy testtájon jelentkező basalioma volt észlelhető. 5 ezen páciensek közül prolint kódoló genotípussal bírt. Egy olyan nagyon diverz populációban, mint az amerikai, nincsen ideális normál kontroll, amellyel össze tudnánk vetni ennek az allélnek az 5/7 (71%) reprezentáltságát, 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 6 normál populációval vetettük össze (5.8.2. ábra). 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 páciens-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.

5.8.3 A heterozigótaság elvesztése non-melanoma bőrtumorokban

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)[54]. 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 gén esetén gyakran fordult elő, az esetek 67%-ban, de nem láttuk a leucin allél preferenciális elvesztését, mint azt a 5.8.2-es táblázat mutatja. A spinaliomák esetén az LOH 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 nyílt LOH

	LOH gyakoriság	Pro	Leu
Solaris keratosis	0/9 (0%)	-	-
NMSC	24/52 (46%)	11 (46%)	13 (54%)
SCC	4/22 (18%)	2 (50%)	2 (50%)
BCC	20/30 (67%)	9 (45%)	11 (55%)
BCC – korai v. mpx	4/4 (100%)	3 (75%)	1 (25%)

5.6.3 táblázat LOH gyakorisága non-melanoma bőrtumzorokban és előalakjaiban.

vizsgálatra lehetőségünk. Ennek a páciensnek 20 különböző tumorát vizsgáltunk 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).

Ezek az eredmények 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 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. Ha a prolin allél hordozása a daganat szempontjából jelentőséggel bír a világos bőrű csoportokban, az

mindenképp kiszelektálnódna, s így a gyakorisága alacsony lenne ezekben a közösségekben. Világos bőrrű populációkban megmaradó magas prolin/prolin gyakoriság, ami például az ír – kelta populációban megfigyelhető, magyarázat lehet az emelkedett non melanoma bőrrák kockázatra. A prolin leucinra cserélődése úgy magyarázható, hogy a prolin az ősi allél, amit szintén alátámaszt az az adat, hogy a csimpánz allél szintén prolin. (DNA blast Pan troglodytes). Ráadásul a prolin a gyakoribb allél, pusztán ez a tény is alátámasztja az ősi allél teóriát.

Valószínűsíthető, hogy a PTCH gén szerepe és polimorfizmusa különböző lehet a különféle epitheliális daganatok kialakulásában.[354] A prolin – prolin genotípus jelenléte a többszörös basaliomával bíró amerikaiakban, de nem a svédekben, arra a tényre utalhat, hogy a prolin – prolin az a kelta eredetnek egy jele, amely felülreprezentált az amerikai non-melanoma bőrdaganatokkal bíró páciensek körében. Ha a prolin hátrányos fenotípusa a heterozigóta esetekben is érvényesül, akkor a tumorok kialakulása során a leucin allél elvesztése lenne megfigyelhető. Ha feltételezzük, hogy a két fenti említett mechanizmus a pheomelaninnal, különösen az UV-hatásnak kitett pheomelaninnal függ össze, akkor ez magyarázatot szolgáltat az allélvesztésre. A pheomelanin UV-sugárzás hatására ismerten szuperoxidok és egyéb reaktív oxigén gyökök képződnek, hasonlóan a Rtg sugárzás okozta károsodásokhoz, ami szintén DNS lánc töréseket és inadekvát rekombinációt eredményez[359, 360]. A nem konzervatív polimorfizmusok, mint a 1315 codon polimorfizmusa hatással lehet a PTCH protein jelátviteli képességére. A PTCH legutolsó 156 aminosavának a törlése a Hedgehoghoz kötődést nem akadályozza, de meggátolja a Hedgehog target génekre vonatkozó gátló hatás kifejtését[361]. Érdekes módon még a PTCH heterozigóta formájú csökkent funkciója is jelentőséggel bír a Hedgehog jelátvitel szempontjából[362]. A közelmúltban végzett vizsgálatok felvetették, hogy a kodon 1315-nak köze lehet az emlődaganat kialakulásához[353], ezekben az esetekben a leucin allélt találták betegséggel összefüggőnek. PTCH és a polimorfizmusai természetesen különböző szövetekben más hatással lehetnek, hiszen az emlő epitheliuma más, mint a bőr hámszája. A PTCH szerepe a laphám carcinoma, spinalioma kialakulásában mai napig nem pontosan tisztázott. Bizonyos adatok szerint van összefüggés a PTCH és a laphám carcinoma kialakulása szempontjából[363, 364], azonban más vizsgálatok nem találnak PTCH mutációkat spinaliomákban[365]. Ezzel összhangban PTCH LOH-t mi sem találtunk, ami természetesen arra utal, hogy a PTCH génnek a spinalioma szempontjából kicsi a jelentősége. Természetesen az is lehetséges, hogy a kodon 1315 más fontos polimorfizmusokkal áll együttműködésben és esetleg így vezet jelentősebb

daganatfogékonysághoz. Egy komplex rizikótényező-csoport együttállását nagyon nehéz vizsgálatokkal igazolni. Mindenesetre jelen közlésünk fölveti a szükségét és jelentőségét egy nagyobb életkorral összehasonlított vizsgálatnak az egyes csoportok között. Pontos tumor anamnesztikus háttérrel, PTCH genotípussal és melanin típusok ismeretével precízebb következtetéseket lehetne levonni.

6. Eredeti tudományos felismerések

- 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 immunrendszerre nézve 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 transzkripciós 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 célgéneken ennek relevanciáját. Bizonyítékot szolgáltatunk a HIF-1alfa indukciójának AKT útvonal általi kontrolljára is.
- 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.
- 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.

7. 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 lemezekben 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 medicínás készítmények tesztelésének a lehetősége is rendszerünkben.
- A p53 mutációt kezdetől 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 leszabályozásában 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 PTCH gén polimorfizmusa jelentőséggel bírhat a jelenleg fázis III-as klinikai vizsgálati stádiumban fejlesztés alatt álló Smo inhibitorok terápiás effektusa szempontjából, ami direkt klinikai jelentőséggel bírna.
- 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.

8. Rövidítések jegyzéke

BER - Basis Excision Repair

CPD - ciklobután pirimidin dimer

CS - Cockayne-szindróma

CPM – kompozit promoter modell

EPU – Epidermális proliferációs egység

GGR - Global genom repair

HEP – Hepatoerythropoeticus porphyria

KGM – keratinocyte growth medium

KO – knock out

MED – minimalis erythema dosis

MMR - mismatch repair

NBD – nukleotid kötő domen

NER - Nucleotid Excision Repair

NMSC – non-melanoma bőrrák

PBMC – perifériás vér mononukleáris sejtek

PCR – polimeráz láncreakció

PMNL – polimorfonukleáris leukociták

PT-PCR - reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció

PWM – Pozicionális Weight Matrix

RB - retinoblasztoma

ROS – reaktív oxigén gyökök

SBC – sunburn-sejtek

SSB – egyszálú DNS törések

SSCP – egyszálú DNS konformáció polimorfizmus

TCR - transcription coupled

TG - transzgén

VEGF – vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

VS – vizualis score

USD - unscheduled

XP - Xeroderma pigmentosum

(6-4)-PD - pirimidin-(6-4)-pirimidon fotoproduktum

8OHdGuo - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanozin

Köszönetnyilvánítás

Köszönetnyilvánítás részből a pályám során meghatározó találkozásokat időrendi sorrendben említem, mivel oly sok kiváló mesterrel és munkatárssal hozott össze a sors, hogy ezek között súlyozni méltatlan lenne.

Elsőként **Prof. Szabó Gábor** laborjában kezdtem el III. évesen TDK pályafutásomat, majd az ő külföldi útja miatt **Prof. Fésüs László** avatott be az apoptózis csodálatos világának tanulmányozásába. Ezt követően egyenes út vezetett a klinikumban végzett kutatás során gyakorlatvezetőm, mentorom és pótmamám, **Prof. Horkay Irén** munkacsoportjába, amikor elkezdtem dolgozni a debreceni Bőrklinikán **Prof. Hunyadi János** igazgatósága alatt. **Prof. Remenyik Évával** is itt dolgozhattam elsőként együtt, amely kollaboráció évtizedekre meghatározta mindkettőnk sorsát és munkatársi, baráti kapcsolat alakult ki, amely ma is tart. Külföldi tanulmányútjaimon elsőként **Prof. Frank de Gruijl** laborjában, Utrechtben volt alkalmam elsőként dolgozni, majd az itteni munkám folyamányaként

vezetett sorsom a Yale Egyetemen **Prof. Douglas Brash** laboratóriumába. Mindkettejükben igazi kutatót ismertem meg, nyugodtan mondhatom, hogy a kutatásról alkotott ismereteimet új dimenzióba helyezték. Innen hazatérve **Prof. Horváth Attila** bizalmát volt szerencsém kiérdemelni és csatlakozhattam a Semmelweis Egyetem Bőrklinikájának csapatához, ahol **Prof. Kárpáti Sarolta** biztosította az első itthoni egérkísérleteimhez a laborját és élvezem mindmáig tartó támogatását.

Megköszönöm **Bánvölgyi András, Farkas Réka, Gyöngyösi Nóra, Haluszka Dóra**, jelenleg is aktívan dolgozó PhD hallgatóimnak a precíz munkájukat, akik máris sokat tettek le az asztalra, de még nagy elvárásaim vannak velük szemben. A dolgozat megírása kapcsán kivételesen sokat dolgozott a technikai lebonyolításban **Mihócza Magdolna** és **Belovai Krisztina**, külön köszönöm mindkettőjük odaadó hozzáállását. Emellett természetesen munkahelyem, a **Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika minden asszisztensének és orvosának** is köszönettel tartozom, akik az itt végzett kutatómunkában segítettek, támogattak, valamint távollétem alatt a betegellátásban helyettesítettek.

Irodalomjegyzék

1. Lippens, S., et al., *Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification*. Cell Death.Differ., 2005. **12 Suppl 2**: p. 1497-1508.
2. Watt, F.M., *Epidermal stem cells in culture*. Journal of cell science. Supplement, 1988. **10**: p. 85-94.
3. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
4. Asplund, A., et al., *Genetic mosaicism in basal cell carcinoma*. Experimental dermatology, 2005. **14**(8): p. 593-600.
5. Backvall, H., et al., *Mutation spectra of epidermal p53 clones adjacent to basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma*. Experimental dermatology, 2004. **13**(10): p. 643-50.
6. Heitzer, E., et al., *UV fingerprints predominate in the PTCH mutation spectra of basal cell carcinomas independent of clinical phenotype*. The Journal of investigative dermatology, 2007. **127**(12): p. 2872-81.
7. Kim, M.Y., et al., *Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias*. Journal of dermatological science, 2002. **29**(1): p. 1-9.
8. Marks, R., G. Rennie, and T. Selwood, *The relationship of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas to solar keratoses*. Archives of dermatology, 1988. **124**(7): p. 1039-42.
9. Colegio, O.R. and E.M. Billingsley, *Skin cancer in transplant recipients, out of the woods. Scientific retreat of the ITSCC and SCOPE*. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2011. **11**(8): p. 1584-91.
10. Birkeland, S.A., et al., *Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 1995. **60**(2): p. 183-9.
11. Jensen, P., et al., *Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1999. **40**(2 Pt 1): p. 177-86.
12. Lindelof, B., et al., *Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation*. The British journal of dermatology, 2000. **143**(3): p. 513-9.
13. Hartevelt, M.M., et al., *Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands*. Transplantation, 1990. **49**(3): p. 506-9.
14. Zwald, F.O. and M. Brown, *Skin cancer in solid organ transplant recipients: advances in therapy and management: part I. Epidemiology of skin cancer in solid organ transplant recipients*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2011. **65**(2): p. 253-61; quiz 262.
15. Liu, A.S. and E. Eriksson, *Four hundred seventeen squamous cell cancers in a heart transplant patient*. Annals of plastic surgery, 2011. **67**(5): p. 545-6.
16. Rangwala, S. and K.Y. Tsai, *Roles of the Immune System in Skin Cancer*. The British journal of dermatology, 2011.
17. Krutmann, J., *[Premature skin aging by ultraviolet radiation and other environmental hazards. The molecular basis]*. Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete, 2003. **54**(9): p. 809-17.
18. Schwartz, R.A. and H.L. Stoll, *Epithelial precancerous lesions*, in *Dermatology in*

- General Medicine*, T.B. Fitzpatrick, et al., Editors. 1993, McGraw-Hill: New York. p. 804-807.
19. Marks, R., et al., *Spontaneous remission of solar keratoses: the case for conservative management*. British Journal of Dermatology, 1986. **115**(6): p. 649-55.
 20. Marks, R., G. Rennie, and T.S. Selwood, *Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma*. Lancet, 1988. **I**(April 9): p. 795-797.
 21. Miller, S.J., *Biology of basal cell carcinoma*. J. Am. Acad. Dermatol., 1991. **24**: p. 1-13, 161-175.
 22. Oram, Y., et al., *Basal cell carcinoma of the scalp resulting in spine metastasis in a black patient*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1994. **31**(5 Pt 2): p. 916-20.
 23. Dobozy, A. and M. Morvay, *Metastázáló basal sejtes carcinoma*. Bőrgyógyászati és venerológiai szemle, 1990. **66**(4): p. 153-157.
 24. Zhao, K., M. Short, and J. Harding, *Cancer survival and prevalence in Australia : cancers diagnosed from 1982 to 2004*. Cancer series, 2008, Canberra, A.C.T.: Australian Institute of Health and Welfare. xiii, 88 p.
 25. Zhou, J., et al., *Colorectal, prostate, and skin cancer screening among Hispanic and White non-Hispanic men, 2000-2005*. Journal of the National Medical Association, 2011. **103**(4): p. 343-50.
 26. Capell, B.C., B.E. Tloutan, and S.J. Orlov, *From the rarest to the most common: insights from progeroid syndromes into skin cancer and aging*. The Journal of investigative dermatology, 2009. **129**(10): p. 2340-50.
 27. Hoeijmakers, J.H., *DNA damage, aging, and cancer*. The New England journal of medicine, 2009. **361**(15): p. 1475-85.
 28. Stevnsner, T., et al., *The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging*. Mechanisms of ageing and development, 2008. **129**(7-8): p. 441-8.
 29. Mallery, D.L., et al., *Molecular analysis of mutations in the CSB (ERCC6) gene in patients with Cockayne syndrome*. American journal of human genetics, 1998. **62**(1): p. 77-85.
 30. Puzianowska-Kuznicka, M. and J. Kuznicki, *Genetic alterations in accelerated ageing syndromes. Do they play a role in natural ageing?* The international journal of biochemistry & cell biology, 2005. **37**(5): p. 947-60.
 31. Filippi, S., et al., *CSB protein is (a direct target of HIF-1 and) a critical mediator of the hypoxic response*. The EMBO journal, 2008. **27**(19): p. 2545-56.
 32. Misra, R.R. and J.M. Vos, *Defective replication of psoralen adducts detected at the gene-specific level in xeroderma pigmentosum variant cells*. Molecular and cellular biology, 1993. **13**(2): p. 1002-12.
 33. Cordonnier, A.M. and R.P. Fuchs, *Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells*. Mutation research, 1999. **435**(2): p. 111-9.
 34. Limoli, C.L., et al., *Polymerase eta deficiency in the xeroderma pigmentosum variant uncovers an overlap between the S phase checkpoint and double-strand break repair*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(14): p. 7939-46.
 35. Takebe, H., et al., *DNA repair characteristics and skin cancers of xeroderma pigmentosum patients in Japan*. Cancer research, 1977. **37**(2): p. 490-5.
 36. Parren, L.J. and J. Frank, *Hereditary tumour syndromes featuring basal cell carcinomas*. The British journal of dermatology, 2011. **165**(1): p. 30-4.
 37. Karalis, A., M. Tischkowitz, and G.W. Millington, *Dermatological manifestations of inherited cancer syndromes in children*. The British journal of dermatology,

2011. **164**(2): p. 245-56.
38. Yarosh, D., et al., *Effect of topically applied T4 endonuclease V in liposomes on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomised study*. *Xeroderma Pigmentosum Study Group*. Lancet, 2001. **357**(9260): p. 926-9.
 39. Tamura, D., J.J. DiGiovanna, and K.H. Kraemer, *Founder mutations in xeroderma pigmentosum*. The Journal of investigative dermatology, 2010. **130**(6): p. 1491-3.
 40. Soufir, N., et al., *A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa*. The Journal of investigative dermatology, 2010. **130**(6): p. 1537-42.
 41. Kraemer, K.H., et al., *Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin*. The New England journal of medicine, 1988. **318**(25): p. 1633-7.
 42. Zahid, S. and I. Brownell, *Repairing DNA damage in xeroderma pigmentosum: T4N5 lotion and gene therapy*. Journal of drugs in dermatology : JDD, 2008. **7**(4): p. 405-8.
 43. Daya-Grosjean, L., N. Dumaz, and A. Sarasin, *The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers*. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, 1995. **28**(2): p. 115-24.
 44. Correa, M.P., P. Dubuisson, and A. Plana-Fattori, *An overview of the ultraviolet index and the skin cancer cases in Brazil*. Photochemistry and photobiology, 2003. **78**(1): p. 49-54.
 45. Czarnecki, D., et al., *A 10-year prospective study of patients with skin cancer*. Journal of cutaneous medicine and surgery, 2002. **6**(5): p. 427-9.
 46. de Gruijl, F.R., *p53 mutations as a marker of skin cancer risk: comparison of UVA and UVB effects*. Experimental dermatology, 2002. **11 Suppl 1**: p. 37-9.
 47. Ziegler, A., et al., *Sunburn and p53 in the onset of skin cancer*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 773-6.
 48. Johnson, R.L., et al., *Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome*. Science, 1996. **272**(5268): p. 1668-71.
 49. Gorlin, R.J. and R.W. Goltz, *Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome*. The New England journal of medicine, 1960. **262**: p. 908-12.
 50. Evans, D.G., et al., *Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study*. Journal of medical genetics, 1993. **30**(6): p. 460-4.
 51. Kimonis, V.E., et al., *Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome*. American journal of medical genetics, 1997. **69**(3): p. 299-308.
 52. Shivaswamy, K.N., et al., *Gorlin syndrome or basal cell nevus syndrome (BCNS): A case report*. Dermatology online journal, 2010. **16**(9): p. 6.
 53. Hahn, H., et al., *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Cell, 1996. **85**(6): p. 841-51.
 54. Gailani, M.R., et al., *The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas*. Nature genetics, 1996. **14**(1): p. 78-81.
 55. Gailani, M.R., et al., *Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9*. Cell, 1992. **69**(1): p. 111-7.
 56. Daya-Grosjean, L. and A. Sarasin, *UV-specific mutations of the human patched gene in basal cell carcinomas from normal individuals and xeroderma pigmentosum patients*. Mutation research, 2000. **450**(1-2): p. 193-9.
 57. Lee, Y., et al., *Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice*. Cancer research, 2006. **66**(14): p. 6964-71.

58. Athar, M., et al., *Hedgehog signalling in skin development and cancer*. Experimental dermatology, 2006. **15**(9): p. 667-77.
59. Lacour, J.P., *Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms*. The British journal of dermatology, 2002. **146 Suppl 61**: p. 17-9.
60. Saldanha, G., A. Fletcher, and D.N. Slater, *Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update*. The British journal of dermatology, 2003. **148**(2): p. 195-202.
61. Goldberg, L.H., et al., *Basal cell nevus syndrome: a brave new world*. Archives of dermatology, 2010. **146**(1): p. 17-9.
62. Von Hoff, D.D., et al., *Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma*. The New England journal of medicine, 2009. **361**(12): p. 1164-72.
63. Skvara, H., et al., *Topical treatment of Basal cell carcinomas in nevoid Basal cell carcinoma syndrome with a smoothened inhibitor*. The Journal of investigative dermatology, 2011. **131**(8): p. 1735-44.
64. Manney, G.L., et al., *Unprecedented Arctic ozone loss in 2011*. Nature, 2011.
65. Kerr, R.A., *Environment. First detection of ozone hole recovery claimed*. Science, 2011. **332**(6026): p. 160.
66. McKenzie, R.L., et al., *Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation*. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 2011. **10**(2): p. 182-98.
67. Perdiz, D., et al., *Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(35): p. 26732-42.
68. Douki, T., M. Court, and J. Cadet, *Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts*. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, 2000. **54**(2-3): p. 145-54.
69. van der Leun, J.C., et al., *Ultraviolet carcinogenesis: environmental effects of ozone depletion*. Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer, 1993. **128**: p. 263-7.
70. Norval, M., et al., *The human health effects of ozone depletion and interactions with climate change*. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 2011. **10**(2): p. 199-225.
71. de Gruijl, F.R., *Skin cancer and solar UV radiation*. European journal of cancer, 1999. **35**(14): p. 2003-9.
72. Hoeijmakers, J.H., *DNA repair mechanisms*. Maturitas, 2001. **38**(1): p. 17-22; discussion 22-3.
73. Mullenders, L.H., et al., *UV-induced photolesions, their repair and mutations*. Mutation research, 1993. **299**(3-4): p. 271-6.
74. Ljungman, M., *Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress*. Neoplasia, 2000. **2**(3): p. 208-25.
75. Shibutani, S., M. Takeshita, and A.P. Grollman, *Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site. A mechanistic study of the "A rule"*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(21): p. 13916-22.
76. Beard, W.A., et al., *DNA polymerase beta substrate specificity: side chain modulation of the "A-rule"*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(46): p. 31680-9.
77. Wang, Z. and T.M. Rana, *DNA damage-dependent transcriptional arrest and termination of RNA polymerase II elongation complexes in DNA template*

- containing *HIV-1 promoter*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(13): p. 6688-93.
78. Young, A.R., *The sunburn cell*. Photo-dermatology, 1987. **4**(3): p. 127-34.
 79. Sheehan, J.M. and A.R. Young, *The sunburn cell revisited: an update on mechanistic aspects*. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 2002. **1**(6): p. 365-77.
 80. Danno, K. and T. Horio, *Sunburn cell: factors involved in its formation*. Photochem. Photobiol., 1987. **45**: p. 683-690.
 81. Bredberg, A., *DNA damage in human skin fibroblasts exposed to UVA light used in clinical PUVA treatment*. The Journal of investigative dermatology, 1981. **76**(6): p. 449-51.
 82. Herrling, T., K. Jung, and J. Fuchs, *Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin*. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, 2006. **63**(4): p. 840-5.
 83. Irshad, M. and P.S. Chaudhuri, *Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body*. Indian journal of experimental biology, 2002. **40**(11): p. 1233-9.
 84. Weller, E.M., et al., *UV-B-induced cell cycle perturbations, micronucleus induction, and modulation by caffeine in human keratinocytes*. International journal of radiation biology, 1996. **69**(3): p. 371-84.
 85. Berg, R.J., et al., *Substitution of equally carcinogenic UV-A for UV-B irradiations lowers epidermal thymine dimer levels during skin cancer induction in hairless mice*. Carcinogenesis, 1995. **16**(10): p. 2455-9.
 86. Jean, C., et al., *Epidermal growth factor receptor pathway mitigates UVA-induced G2/M arrest in keratinocyte cells*. The Journal of investigative dermatology, 2007. **127**(10): p. 2418-24.
 87. de Laat, A., et al., *Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation*. Photochemistry and photobiology, 1996. **63**(4): p. 492-7.
 88. Sage, E., et al., *Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(1): p. 176-80.
 89. Rochette, P.J., et al., *UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells*. Nucleic acids research, 2003. **31**(11): p. 2786-94.
 90. Mouret, S., et al., *Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(37): p. 13765-70.
 91. Banrud, H., J. Moan, and K. Berg, *Early induction of binucleated cells by ultraviolet A (UVA) radiation: a possible role of microfilaments*. Photochemistry and photobiology, 1999. **70**(2): p. 199-205.
 92. de Laat, A., J.C. van der Leun, and F.R. de Gruijl, *Carcinogenesis induced by UVA (365-nm) radiation: the dose-time dependence of tumor formation in hairless mice*. Carcinogenesis, 1997. **18**: p. 1013-1020.
 93. El Ghissassi, F., et al., *A review of human carcinogens--part D: radiation*. The lancet oncology, 2009. **10**(8): p. 751-2.
 94. Tejasvi, T., V.K. Sharma, and J. Kaur, *Determination of minimal erythematous dose for narrow band-ultraviolet B radiation in north Indian patients: comparison of visual and Dermaspectrometer readings*. Indian journal of dermatology, venereology and leprology, 2007. **73**(2): p. 97-9.

95. van de Pas, C.B., et al., *An optimal method for experimental provocation of polymorphic light eruption*. Archives of dermatology, 2004. **140**(3): p. 286-92.
96. Claerhout, S., et al., *Pathways involved in sunburn cell formation: deregulation in skin cancer*. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 2006. **5**(2): p. 199-207.
97. Neale, R.E., et al., *Basal cell carcinoma on the trunk is associated with excessive sun exposure*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2007. **56**(3): p. 380-6.
98. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
99. Yuan, J., et al., *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. Cell, 1993. **75**(4): p. 641-52.
100. Lamkanfi, M., et al., *Caspases in cell survival, proliferation and differentiation*. Cell death and differentiation, 2007. **14**(1): p. 44-55.
101. Otsuki, Y., Z. Li, and M.A. Shibata, *Apoptotic detection methods--from morphology to gene*. Progress in histochemistry and cytochemistry, 2003. **38**(3): p. 275-339.
102. Bayerl, C., et al., *Immunohistochemical characterization of HSP, alpha-MSH, Merkel cells and neuronal markers in acute UV dermatitis and acute contact dermatitis in vivo*. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.], 1997. **46**(10): p. 409-11.
103. Brash, D.E., *Cellular proofreading*. Nature medicine, 1996. **2**(5): p. 525-6.
104. Brash, D.E., et al., *Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion*. The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research, 1996. **1**(2): p. 136-42.
105. Rolland, S. and B. Conradt, *The role of mitochondria in apoptosis induction in Caenorhabditis elegans: more than just innocent bystanders?* Cell death and differentiation, 2006. **13**(8): p. 1281-6.
106. Hill, L.L., et al., *Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology*. Science, 1999. **285**(5429): p. 898-900.
107. Liefer, K.M., et al., *Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis*. Cancer research, 2000. **60**(15): p. 4016-20.
108. Rodriguez-Villanueva, J., et al., *Human keratin-1.bcl-2 transgenic mice aberrantly express keratin 6, exhibit reduced sensitivity to keratinocyte cell death induction, and are susceptible to skin tumor formation*. Oncogene, 1998. **16**(7): p. 853-63.
109. Hildesheim, J., et al., *Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53*. Cancer research, 2002. **62**(24): p. 7305-15.
110. Ley, R.D. and L.A. Applegate, *Ultraviolet radiation-induced histopathologic changes in the skin of the marsupial Monodelphis domestica. II. Quantitative studies of the photoreactivation of induced hyperplasia and sunburn cell formation*. The Journal of investigative dermatology, 1985. **85**(4): p. 365-7.
111. Goodsell, D.S., *The molecular perspective: p53 tumor suppressor*. The oncologist, 1999. **4**(2): p. 138-9.
112. Murphy, G., et al., *The molecular determinants of sunburn cell formation*. Experimental dermatology, 2001. **10**(3): p. 155-60.
113. Bolshakov, S., et al., *p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas*. Clinical cancer research : an official journal of the

- American Association for Cancer Research, 2003. **9**(1): p. 228-34.
114. Royds, J.A. and B. Iacopetta, *p53 and disease: when the guardian angel fails*. Cell death and differentiation, 2006. **13**(6): p. 1017-26.
 115. Brash, D.E., et al., *A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**: p. 10124-10128.
 116. Ziegler, A., et al., *Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(9): p. 4216-20.
 117. Wikonkal, N.M., et al., *bcl-2 vs p53 protein expression and apoptotic rate in human nonmelanoma skin cancers*. Archives of Dermatology, 1997. **133**(5): p. 599-602.
 118. Thiersch, K., *Der Epithelkrebs, Namentliehlder Ausseren Haut* 1875, Leipzig.
 119. Wikonkal, N.M. and D.E. Brash, *Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis*. The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research, 1999. **4**(1): p. 6-10.
 120. Greenblatt, M.S., et al., *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. Cancer Research, 1994. **54**(18): p. 4855-78.
 121. Levine, A.J., et al., *The role of the p53 tumour- suppressor gene in tumorigenesis*. British Journal of Cancer, 1994. **69**: p. 409-416.
 122. Berg, R.J., et al., *Early p53 alterations in mouse skin carcinogenesis by UVB radiation: immunohistochemical detection of mutant p53 protein in clusters of preneoplastic epidermal cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(1): p. 274-8.
 123. Sherr, C.J., *G1 phase progression: cycling on cue [see comments]*. Cell, 1994. **79**(4): p. 551-5.
 124. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.
 125. Kastan, M.B., et al., *A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia*. Cell, 1992. **71**(4): p. 587-97.
 126. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell, 1993. **75**(4): p. 805-16.
 127. Laurie, N.A., et al., *Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma*. Nature, 2006. **444**(7115): p. 61-6.
 128. Karagas, M.R., et al., *Design of an epidemiologic study of drinking water arsenic exposure and skin and bladder cancer risk in a U.S. population*. Environmental health perspectives, 1998. **106 Suppl 4**: p. 1047-50.
 129. Centeno, J.A., et al., *Pathology related to chronic arsenic exposure*. Environmental health perspectives, 2002. **110 Suppl 5**: p. 883-6.
 130. Karagas, M.R., et al., *Squamous cell and basal cell carcinoma of the skin in relation to radiation therapy and potential modification of risk by sun exposure*. Epidemiology, 2007. **18**(6): p. 776-84.
 131. Stern, R.S., *Putting iatrogenic risk in perspective: basal cell cancer in PUVA patients and Australians*. The Journal of investigative dermatology, 2009. **129**(9): p. 2315-6.
 132. Lim, J.L. and R.S. Stern, *High levels of ultraviolet B exposure increase the risk of non-melanoma skin cancer in psoralen and ultraviolet A-treated patients*. The Journal of investigative dermatology, 2005. **124**(3): p. 505-13.
 133. Hearn, R.M., et al., *Incidence of skin cancers in 3867 patients treated with narrow-band ultraviolet B phototherapy*. The British journal of dermatology, 2008. **159**(4):

- p. 931-5.
134. Cohen, S.M. and L.L. Arnold, *Chemical carcinogenesis*. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, 2011. **120 Suppl 1**: p. S76-92.
 135. Walder, B.K., M.R. Robertson, and D. Jeremy, *Skin cancer and immunosuppression*. Lancet, 1971. **2(7737)**: p. 1282-3.
 136. Mullen, D.L., et al., *Squamous cell carcinoma of the skin and lip in renal homograft recipients*. Cancer, 1976. **37(2)**: p. 729-34.
 137. Zavos, G., et al., *Nonmelanoma skin cancer after renal transplantation: a single-center experience in 1736 transplantations*. International journal of dermatology, 2011.
 138. Ho, W.L. and G.M. Murphy, *Update on the pathogenesis of post-transplant skin cancer in renal transplant recipients*. The British journal of dermatology, 2008. **158(2)**: p. 217-24.
 139. Ulrich, C., et al., *Prevention of non-melanoma skin cancer in organ transplant patients by regular use of a sunscreen: a 24 months, prospective, case-control study*. The British journal of dermatology, 2009. **161 Suppl 3**: p. 78-84.
 140. Lindelof, B., et al., *Burn injuries and skin cancer: a population-based cohort study*. Acta dermato-venereologica, 2008. **88(1)**: p. 20-2.
 141. Biesalski, H.K., et al., *Hohenheimer Consensus Talk. Oxidative and premature skin ageing*. Experimental dermatology, 2003. **12 Suppl 3**: p. 3-15.
 142. Wei, Y.H. and H.C. Lee, *Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging*. Experimental biology and medicine, 2002. **227(9)**: p. 671-82.
 143. Grune, T., *[Protein oxidation in the aging of skin fibroblasts]*. Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete, 2003. **54(9)**: p. 818-21.
 144. Loden, M., et al., *Sunscreen use: controversies, challenges and regulatory aspects*. The British journal of dermatology, 2011. **165(2)**: p. 255-62.
 145. Seite, S., et al., *Photodamage to human skin by suberythral exposure to solar ultraviolet radiation can be attenuated by sunscreens: a review*. The British journal of dermatology, 2010. **163(5)**: p. 903-14.
 146. Uitto, J., *The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure*. Journal of drugs in dermatology : JDD, 2008. **7(2 Suppl)**: p. s12-6.
 147. Seite, S., et al., *Mexoryl SX: a broad absorption UVA filter protects human skin from the effects of repeated suberythral doses of UVA*. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, 1998. **44(1)**: p. 69-76.
 148. Naru, E., et al., *Functional changes induced by chronic UVA irradiation to cultured human dermal fibroblasts*. The British journal of dermatology, 2005. **153 Suppl 2**: p. 6-12.
 149. Herrmann, G., et al., *UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts*. Experimental dermatology, 1993. **2(2)**: p. 92-7.
 150. Unemori, E.N., et al., *Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells*. Journal of cellular physiology, 1992. **153(3)**: p. 557-62.
 151. Yano, K., et al., *Ultraviolet B-induced skin angiogenesis is associated with a switch in the balance of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression*. The Journal of investigative dermatology, 2004. **122(1)**: p. 201-8.
 152. Yano, K., et al., *Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and*

- by downregulation of thrombospondin-1. The British journal of dermatology, 2005. **152**(1): p. 115-21.
153. Nys, K., et al., *Uncovering the role of hypoxia inducible factor-1alpha in skin carcinogenesis*. Biochimica et biophysica acta, 2011. **1816**(1): p. 1-12.
 154. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
 155. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochemical pharmacology, 2002. **64**(5-6): p. 993-8.
 156. Semenza, G.L., *HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia*. Journal of applied physiology, 2000. **88**(4): p. 1474-80.
 157. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
 158. Kamura, T., et al., *Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(19): p. 10430-5.
 159. Sutter, C.H., E. Laughner, and G.L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(9): p. 4748-53.
 160. Zhong, H., et al., *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*. Cancer research, 2000. **60**(6): p. 1541-5.
 161. Yoshida, K., et al., *Thrombopoietin (TPO) regulates HIF-1alpha levels through generation of mitochondrial reactive oxygen species*. International journal of hematology, 2008. **88**(1): p. 43-51.
 162. Semenza, G.L., *Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents*. Drug discovery today, 2007. **12**(19-20): p. 853-9.
 163. Melillo, G., *Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy*. Molecular cancer research : MCR, 2006. **4**(9): p. 601-5.
 164. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Molecular and cellular biology, 1996. **16**(9): p. 4604-13.
 165. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. The Journal of biological chemistry, 1995. **270**(3): p. 1230-7.
 166. Tyrrell, R.M., *Solar ultraviolet A radiation: an oxidizing skin carcinogen that activates heme oxygenase-1*. Antioxidants & redox signaling, 2004. **6**(5): p. 835-40.
 167. Wood, S.M., et al., *The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(25): p. 15117-23.
 168. Cals-Grierson, M.M. and A.D. Ormerod, *Nitric oxide function in the skin*. Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society, 2004. **10**(4): p. 179-93.
 169. Boutin, A.T., et al., *Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response*. Cell, 2008. **133**(2): p. 223-34.
 170. McKenna, M.J., *Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly*. The American journal of medicine, 1992. **93**(1): p. 69-77.
 171. Brustad, M., et al., *Vitamin D status in a rural population of northern Norway with high fish liver consumption*. Public health nutrition, 2004. **7**(6): p. 783-9.

172. Beck-Nielsen, S.S., et al., *Incidence and prevalence of nutritional and hereditary rickets in southern Denmark*. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies, 2009. **160**(3): p. 491-7.
173. Holick, M.F., *Vitamin D deficiency*. The New England journal of medicine, 2007. **357**(3): p. 266-81.
174. Holick, M.F., *High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health*. Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic, 2006. **81**(3): p. 353-73.
175. Bischoff-Ferrari, H.A., et al., *Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes*. The American journal of clinical nutrition, 2006. **84**(1): p. 18-28.
176. Malabanan, A., I.E. Veronikis, and M.F. Holick, *Redefining vitamin D insufficiency*. Lancet, 1998. **351**(9105): p. 805-6.
177. Brunvand, L. and E. Haug, *Vitamin D deficiency amongst Pakistani women in Oslo*. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica, 1993. **72**(4): p. 264-8.
178. Hanchette, C.L. and G.G. Schwartz, *Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation*. Cancer, 1992. **70**(12): p. 2861-9.
179. Gorham, E.D., et al., *Vitamin D and prevention of colorectal cancer*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2005. **97**(1-2): p. 179-94.
180. Grant, W.B., *An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation*. Cancer, 2002. **94**(6): p. 1867-75.
181. Feskanich, D., et al., *Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2004. **13**(9): p. 1502-8.
182. Garland, C.F., et al., *The role of vitamin D in cancer prevention*. American journal of public health, 2006. **96**(2): p. 252-61.
183. Holick, M.F., *Resurrection of vitamin D deficiency and rickets*. The Journal of clinical investigation, 2006. **116**(8): p. 2062-72.
184. Dusso, A.S., A.J. Brown, and E. Slatopolsky, *Vitamin D*. American journal of physiology. Renal physiology, 2005. **289**(1): p. F8-28.
185. Heaney, R.P., et al., *Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol*. The American journal of clinical nutrition, 2003. **77**(1): p. 204-10.
186. Tangpricha, V., et al., *Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health*. The American journal of clinical nutrition, 2003. **77**(6): p. 1478-83.
187. Holick, M.F., *Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis*. The American journal of clinical nutrition, 2004. **79**(3): p. 362-71.
188. Reid, I.R., D.J. Gallagher, and J. Bosworth, *Prophylaxis against vitamin D deficiency in the elderly by regular sunlight exposure*. Age and ageing, 1986. **15**(1): p. 35-40.
189. Sato, Y., et al., *Amelioration of osteoporosis and hypovitaminosis D by sunlight exposure in hospitalized, elderly women with Alzheimer's disease: a randomized controlled trial*. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2005. **20**(8): p. 1327-33.
190. Schluter, H., et al., *Functional characterization of quiescent keratinocyte stem cells and their progeny reveals a hierarchical organization in human skin epidermis*. Stem cells, 2011. **29**(8): p. 1256-68.

191. Folk, J.E. and J.S. Finlayson, *The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases*. Advances in protein chemistry, 1977. **31**: p. 1-133.
192. Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino, *The cornified envelope: a model of cell death in the skin*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2005. **6**(4): p. 328-40.
193. Lippens, S., et al., *Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification*. Cell death and differentiation, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1497-508.
194. Schurer, N.Y., G. Plewig, and P.M. Elias, *Stratum corneum lipid function*. Dermatologica, 1991. **133**(2): p. 77-94.
195. Wertz, P.W. and B.B. van den, *The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers*. Chem.Phys.Lipids, 1998. **91**(2): p. 85-96.
196. Elias, P.M., *Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism*. Journal of Controlled Release, 1991. **15**(3): p. 199-208.
197. Hamanaka, S., et al., *Glucosylceramide accumulates preferentially in lamellar bodies in differentiated keratinocytes*. Br.J.Dermatol., 2005. **152**(3): p. 426-434.
198. Norlen, L., *Skin barrier formation: the membrane folding model*. J Invest Dermatol., 2001. **117**(4): p. 823-9.
199. Raymond, A.A., et al., *Lamellar bodies of human epidermis: proteomics characterization by high throughput mass spectrometry and possible involvement of CLIP-170 in their trafficking/secretion*. Mol.Cell Proteomics., 2008. **7**(11): p. 2151-2175.
200. Jensen, J.M., et al., *Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(12): p. 1761-70.
201. Schmuth, M., et al., *Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis*. The Journal of investigative dermatology, 2000. **115**(3): p. 459-66.
202. Haimovitz-Friedman, A., et al., *Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis*. The Journal of experimental medicine, 1994. **180**(2): p. 525-35.
203. Dbaiibo, G.S., et al., *p53-dependent ceramide response to genotoxic stress*. The Journal of clinical investigation, 1998. **102**(2): p. 329-39.
204. Rotolo, J.A., et al., *Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(28): p. 26425-34.
205. Dbaiibo, G.S., et al., *Ceramide generation by two distinct pathways in tumor necrosis factor alpha-induced cell death*. FEBS letters, 2001. **503**(1): p. 7-12.
206. Yang, J.M., et al., *Novel mutations of the transglutaminase 1 gene in lamellar ichthyosis*. The Journal of investigative dermatology, 2001. **117**(2): p. 214-8.
207. Lefevre, C., et al., *Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2*. Hum.Mol.Genet., 2003. **12**(18): p. 2369-2378.
208. James, L.C., et al., *Transforming growth factor alpha: in vivo release by normal human skin following UV irradiation and abrasion*. Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society, 1991. **4**(2): p. 61-4.
209. Ellem, K.A., et al., *UVR induction of TGF alpha: a possible autocrine mechanism for the epidermal melanocytic response and for promotion of epidermal carcinogenesis*. Carcinogenesis, 1988. **9**(5): p. 797-801.
210. Haratake, A., et al., *UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles*

- for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response. *The Journal of investigative dermatology*, 1997. **108**(5): p. 769-75.
211. Jiang, S.J., et al., *Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation*. *Journal of dermatological science*, 2006. **44**(1): p. 29-36.
 212. Cutler, R.G., et al., *Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(7): p. 2070-5.
 213. Okamoto, T., et al., *Differentiation of cultured epidermal keratinocytes related to sterol metabolism and its retardation by chemical carcinogens*. *Biochimica et biophysica acta*, 1984. **805**(2): p. 143-51.
 214. Uchida, Y., M. Iwamori, and Y. Nagai, *Activation of keratinization of keratinocytes from fetal rat skin with N-(O-linoleoyl) omega-hydroxy fatty acyl sphingosyl glucose (lipokeratinogenoside) as a marker of epidermis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1990. **170**(1): p. 162-8.
 215. Williams, M.L., et al., *Density-dependent variations in the lipid content and metabolism of cultured human keratinocytes*. *The Journal of investigative dermatology*, 1988. **91**(1): p. 86-91.
 216. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
 217. Sankaram, M.B. and T.E. Thompson, *Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin*. *Biochemistry*, 1990. **29**(47): p. 10670-5.
 218. Brown, D.A. and E. London, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. *Annual review of cell and developmental biology*, 1998. **14**: p. 111-36.
 219. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2000. **1**(1): p. 31-9.
 220. Horvath, I. and L. Vigh, *Cell biology: Stability in times of stress*. *Nature*, 2010. **463**(7280): p. 436-8.
 221. Brown, R.E., *Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal*. *Journal of cell science*, 1998. **111 (Pt 1)**: p. 1-9.
 222. Parsa, R., et al., *Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes*. *The Journal of investigative dermatology*, 1999. **113**(6): p. 1099-105.
 223. Koster, M.I. and D.R. Roop, *The role of p63 in development and differentiation of the epidermis*. *Journal of dermatological science*, 2004. **34**(1): p. 3-9.
 224. Chaturvedi, V., et al., *Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes*. *The Journal of biological chemistry*, 1999. **274**(33): p. 23358-67.
 225. Takao, J., et al., *Expression of NF-kappaB in epidermis and the relationship between NF-kappaB activation and inhibition of keratinocyte growth*. *The British journal of dermatology*, 2003. **148**(4): p. 680-8.
 226. Descargues, P., A.K. Sil, and M. Karin, *IKKalpha, a critical regulator of epidermal differentiation and a suppressor of skin cancer*. *The EMBO journal*, 2008. **27**(20): p. 2639-47.
 227. Tishkoff, S.A., et al., *Global patterns of linkage disequilibrium at the CD4 locus and modern human origins*. *Science*, 1996. **271**(5254): p. 1380-7.
 228. de Vries, A., et al., *Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA*. *Nature*, 1995. **377**(6545): p. 169-73.
 229. Cheo, D.L., et al., *Characterization of defective nucleotide excision repair in XPC mutant mice*. *Mutation research*, 1997. **374**(1): p. 1-9.

230. van der Horst, G.T., et al., *Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition*. Cell, 1997. **89**(3): p. 425-35.
231. Pierce, A.M., et al., *Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development*. Oncogene, 1998. **16**(10): p. 1267-76.
232. Rheinwald, J.G. and H. Green, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*. Cell, 1975. **6**(3): p. 331-43.
233. Ryle, C.M., et al., *Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones*. Differentiation; research in biological diversity, 1989. **40**(1): p. 42-54.
234. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical biochemistry, 1987. **162**(1): p. 156-9.
235. Jonason, A.S., et al., *Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(24): p. 14025-9.
236. Tymms, M.J. and I. Kola, *Gene knockout protocols*. Methods in molecular biology 2001, Totowa, NJ: Humana Press. xi, 431 p.
237. Cress, W.D., D.G. Johnson, and J.R. Nevins, *A genetic analysis of the E2F1 gene distinguishes regulation by Rb, p107, and adenovirus E4*. Molecular and cellular biology, 1993. **13**(10): p. 6314-25.
238. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. The Journal of cell biology, 1992. **119**(3): p. 493-501.
239. Ricciarelli, R., J.M. Zingg, and A. Azzi, *Vitamin E 80th anniversary: a double life, not only fighting radicals*. IUBMB life, 2001. **52**(1-2): p. 71-6.
240. Ronaghi, M., M. Uhlen, and P. Nyren, *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. Science, 1998. **281**(5375): p. 363, 365.
241. Babson, A.L. and G.E. Phillips, *A rapid colorimetric assay for serum lactic dehydrogenase*. Clin.Chim.Acta, 1965. **12**(2): p. 210-215.
242. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**: p. 248-54.
243. Langmann, T., et al., *Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 26-40.
244. Chen, X., et al., *TiProD: the Tissue-specific Promoter Database*. Nucleic Acids Res., 2006. **34**(Database issue): p. D104-D107.
245. Matys, V., et al., *TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes*. Nucleic Acids Res., 2006. **34**(Database issue): p. D108-D110.
246. Kel, A.E., et al., *MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences*. Nucleic Acids Res., 2003. **31**(13): p. 3576-3579.
247. Kel, O.V., et al., *A compilation of composite regulatory elements affecting gene transcription in vertebrates*. Nucleic acids research, 1995. **23**(20): p. 4097-103.
248. Kel, A., et al., *Composite Module Analyst: a fitness-based tool for identification of transcription factor binding site combinations*. Bioinformatics., 2006. **22**(10): p. 1190-1197.

249. Waleev, T., et al., *Composite Module Analyst: identification of transcription factor binding site combinations using genetic algorithm*. Nucleic Acids Res., 2006. **34**(Web Server issue): p. W541-W545.
250. Kel, A.E., et al., *Computer-assisted identification of cell cycle-related genes: new targets for E2F transcription factors*. J.Mol.Biol., 2001. **309**(1): p. 99-120.
251. Young, A.R., *The sunburn cell*. Photodermatology, 1987. **4**: p. 127-134.
252. Liu, M., et al., *Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation*. Carcinogenesis, 1994. **15**(6): p. 1089-92.
253. Lehmann, A.R., *DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy*. Biochimie, 2003. **85**(11): p. 1101-11.
254. Khoury, M.P. and J.C. Bourdon, *p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor?* Genes & cancer, 2011. **2**(4): p. 453-65.
255. Ziegler, U. and P. Groscurth, *Morphological features of cell death*. News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society, 2004. **19**: p. 124-8.
256. Ljungman, M. and F. Zhang, *Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis*. Oncogene, 1996. **13**(4): p. 823-31.
257. Mei Kwei, J.S., et al., *Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoproduct*. Biochemical and biophysical research communications, 2004. **320**(4): p. 1133-8.
258. van Gijssel, H.E., et al., *Blockage of transcription as a trigger for p53 accumulation by 2-acetylaminofluorene DNA-adducts*. Life sciences, 2003. **73**(14): p. 1759-71.
259. Momand, J., et al., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1237-45.
260. Wu, X., et al., *The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop*. Genes & development, 1993. **7**(7A): p. 1126-32.
261. Fakharzadeh, S.S., S.P. Trusko, and D.L. George, *Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line*. The EMBO journal, 1991. **10**(6): p. 1565-9.
262. Fuchs, S.Y., et al., *Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination*. Oncogene, 1998. **17**(19): p. 2543-7.
263. Zaika, A., N. Marchenko, and U.M. Moll, *Cytoplasmically "sequestered" wild type p53 protein is resistant to Mdm2-mediated degradation*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(39): p. 27474-80.
264. Maki, C.G., J.M. Huibregtse, and P.M. Howley, *In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53*. Cancer Research, 1996. **56**(11): p. 2649-54.
265. Tsvetkov, P., N. Reuven, and Y. Shaul, *Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation*. Cell death and differentiation, 2010. **17**(1): p. 103-8.
266. Ganguli, G., J. Abecassis, and B. Wasylyk, *MDM2 induces hyperplasia and premalignant lesions when expressed in the basal layer of the epidermis*. The EMBO journal, 2000. **19**(19): p. 5135-47.
267. Conforti, G., et al., *Proneness to UV-induced apoptosis in human fibroblasts defective in transcription coupled repair is associated with the lack of Mdm2 transactivation*. Oncogene, 2000. **19**(22): p. 2714-20.
268. Nijhof, J.G., et al., *Epidermal stem and progenitor cells in murine epidermis accumulate UV damage despite NER proficiency*. Carcinogenesis, 2007. **28**(4): p. 792-800.

269. Nigg, E.A., *Genome instability in cancer development*. Advances in experimental medicine and biology 2005, New York: Springer. xv, 511 p.
270. Stout, G.J., et al., *Selective DNA damage responses in murine Xpa^{-/-}, Xpc^{-/-} and Csb^{-/-} keratinocyte cultures*. DNA repair, 2005. **4**(11): p. 1337-44.
271. Rebel, H., et al., *Relationship between UV-induced mutant p53 patches and skin tumours, analysed by mutation spectra and by induction kinetics in various DNA-repair-deficient mice*. Carcinogenesis, 2005. **26**(12): p. 2123-30.
272. Hoogervorst, E.M., et al., *2-AAF-induced tumor development in nucleotide excision repair-deficient mice is associated with a defect in global genome repair but not with transcription coupled repair*. DNA repair, 2005. **4**(1): p. 3-9.
273. Brash, D.E., et al., *The DNA damage signal for Mdm2 regulation, Trp53 induction, and sunburn cell formation in vivo originates from actively transcribed genes*. The Journal of investigative dermatology, 2001. **117**(5): p. 1234-40.
274. van Oosten, M., et al., *Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(21): p. 11268-73.
275. Zindy, F., et al., *Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization*. Genes & development, 1998. **12**(15): p. 2424-33.
276. Wijnhoven, S.W., et al., *Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models*. Mutation research, 2007. **614**(1-2): p. 77-94.
277. Ventura, A., et al., *Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 661-5.
278. Ueda, M., et al., *The expression of retinoblastoma protein in epidermis is induced by ultraviolet B exposure*. The British journal of dermatology, 1996. **135**(3): p. 406-11.
279. Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins*. Genes & development, 1998. **12**(15): p. 2245-62.
280. Phillips, A.C. and K.H. Vousden, *E2F-1 induced apoptosis*. Apoptosis : an international journal on programmed cell death, 2001. **6**(3): p. 173-82.
281. Danno, K. and T. Horio, *Formation of UV-induced apoptosis relates to the cell cycle*. The British journal of dermatology, 1982. **107**(4): p. 423-8.
282. Deng, C., et al., *Mice lacking p21^{CIP1}/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control*. Cell, 1995. **82**(4): p. 675-84.
283. Li, X., et al., *Altered p21(WAF1/CIP1) expression is associated with poor prognosis in extrahepatic bile duct carcinoma*. Cancer letters, 2000. **154**(1): p. 85-91.
284. Werness, B.A., et al., *Prognostic significance of p53 and p21(waf1/cip1) immunoreactivity in epithelial cancers of the ovary*. Gynecologic oncology, 1999. **75**(3): p. 413-8.
285. Karjalainen, J.M., et al., *p21(WAF1/CIP1) expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival*. British Journal of Cancer, 1999. **79**(5-6): p. 895-902.
286. Yang, R.M., et al., *Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer*. The Journal of urology, 1998. **159**(3): p. 941-5.
287. Erlanson, M., et al., *Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications*. Blood, 1998. **92**(3): p. 770-7.
288. Tan, P., et al., *The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas*. Cancer research, 1997. **57**(7): p. 1259-

- 63.
289. Fero, M.L., et al., *The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression*. Nature, 1998. **396**(6707): p. 177-80.
290. Morgenbesser, S.D., et al., *p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens*. Nature, 1994. **371**(6492): p. 72-4.
291. Field, S.J., et al., *E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation*. Cell, 1996. **85**(4): p. 549-61.
292. Yamasaki, L., et al., *Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1*. Cell, 1996. **85**(4): p. 537-48.
293. Wu, X. and A.J. Levine, *p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(9): p. 3602-6.
294. Yamasaki, L., et al., *Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice*. Nature Genetics, 1998. **18**(4): p. 360-4.
295. Weil, M.M., et al., *Genetic basis of strain variation in levels of radiation-induced apoptosis of thymocytes*. Radiation research, 1996. **146**(6): p. 646-51.
296. Knezevic, D. and D.E. Brash, *Role of E2F1 in apoptosis: a case study in feedback loops*. Cell cycle, 2004. **3**(6): p. 729-32.
297. Jacks, T., et al., *Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice*. Current biology : CB, 1994. **4**(1): p. 1-7.
298. Donehower, L.A., et al., *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. Nature, 1992. **356**(6366): p. 215-21.
299. Song, H. and Y. Xu, *Gain of function of p53 cancer mutants in disrupting critical DNA damage response pathways*. Cell cycle, 2007. **6**(13): p. 1570-3.
300. Eberle, J., et al., *Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy*. The British journal of dermatology, 2007. **156 Suppl 3**: p. 18-24.
301. Fuster, J.J., et al., *Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy*. Trends in molecular medicine, 2007. **13**(5): p. 192-9.
302. Kumar, S. and S. Subramanian, *Mutation rates in mammalian genomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(2): p. 803-8.
303. Nachman, M.W. and S.L. Crowell, *Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans*. Genetics, 2000. **156**(1): p. 297-304.
304. Berg, R.J.W., et al., *Early p53 alterations in mouse skin carcinogenesis by UVB radiation: Immunohistochemical detection of mutant p53 protein in clusters of preneoplastic cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996. **93**: p. 274-278.
305. Potten, C.S. and T.D. Allen, *The fine structure and cell kinetics of mouse epidermis after wounding*. Journal of cell science, 1975. **17**(3): p. 413-47.
306. Morris, R.J., S.M. Fischer, and T.J. Slaga, *Evidence that the centrally and peripherally located cells in the murine epidermal proliferative unit are two distinct cell populations*. The Journal of investigative dermatology, 1985. **84**(4): p. 277-81.
307. Sherley, J.L., P.B. Stadler, and D.R. Johnson, *Expression of the wild-type p53 antioncogene induces guanine nucleotide-dependent stem cell division kinetics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(1): p. 136-40.
308. de Gruijl, F.R. and J.C. van der Leun, *Development of skin tumors in hairless mice after discontinuation of ultraviolet irradiation*. Cancer research, 1991. **51**(3): p. 979-84.
309. Zhang, W., et al., *UVB-induced apoptosis drives clonal expansion during skin tumor development*. Carcinogenesis, 2005. **26**(1): p. 249-57.

310. Horkay, I., *Klinikai photodermatologia* 2008, Budapest: Medicina Könyvkiadó.
311. Kripke, M.L., *Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light*. Journal of the National Cancer Institute, 1974. **53**(5): p. 1333-6.
312. Greene, M.I., et al., *Impairment of antigen-presenting cell function by ultraviolet radiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. **76**(12): p. 6591-5.
313. Kripke, M.L., *Immunology of UV-induced skin cancer*. Photochemistry and photobiology, 1980. **32**(6): p. 837-9.
314. Ullrich, S.E., *Photoimmune suppression and photocarcinogenesis*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 2002. **7**: p. d684-703.
315. Fukuda, T., et al., *Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation*. The Journal of experimental medicine, 1997. **186**(3): p. 439-48.
316. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
317. Lu, Y.P., et al., *Time course for early adaptive responses to ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice*. Cancer research, 1999. **59**(18): p. 4591-602.
318. Ouhtit, A., et al., *Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin*. The American journal of pathology, 2000. **156**(1): p. 201-7.
319. Strickland, P.T. and R.P. Swartz, *Inheritance of susceptibility to phototumorigenesis and persistent hyperplasia in F1 hybrids between SENCAR mice and BALB/c or C57BL/6 mice*. Cancer research, 1987. **47**(23): p. 6294-6.
320. Ouhtit, A., et al., *Loss of Fas-ligand expression in mouse keratinocytes during UV carcinogenesis*. The American journal of pathology, 2000. **157**(6): p. 1975-81.
321. Schwarz, A., et al., *Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells*. The Journal of investigative dermatology, 1995. **104**(6): p. 922-7.
322. Smyth, M.J., N.Y. Crowe, and D.I. Godfrey, *NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma*. International immunology, 2001. **13**(4): p. 459-63.
323. Toda, K., et al., *Decreased NK activity of nude mice receiving long-term ultraviolet irradiation: in relation to tumor induction*. Journal of clinical & laboratory immunology, 1986. **20**(3): p. 129-31.
324. Ullrich, S.E. and D.A. Schmitt, *The role of cytokines in UV-induced systemic immune suppression*. Journal of dermatological science, 2000. **23 Suppl 1**: p. S10-2.
325. Noonan, F.P. and E.C. De Fabo, *Ultraviolet-B dose-response curves for local and systemic immunosuppression are identical*. Photochemistry and photobiology, 1990. **52**(4): p. 801-10.
326. Fisher, M.S. and M.L. Kripke, *Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(4): p. 1688-92.
327. Kripke, M.L. and M.S. Fisher, *Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis*. Journal of the National Cancer Institute, 1976. **57**(1): p. 211-5.
328. Andrews, E.J., *Evidence of the nonimmune regression of chemically induced papillomas in mouse skin*. Journal of the National Cancer Institute, 1971. **47**(3): p. 653-65.
329. Burns, F.J., et al., *Regression kinetics of mouse skin papillomas*. Cancer research, 1976. **36**(4): p. 1422-7.

330. Selgrade, M.K., et al., *Dose response for UV-induced immune suppression in people of color: differences based on erythral reactivity rather than skin pigmentation*. Photochemistry and photobiology, 2001. **74**(1): p. 88-95.
331. Hanson, K.M. and R.M. Clegg, *Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in ex vivo human skin*. Photochemistry and photobiology, 2002. **76**(1): p. 57-63.
332. Tachi, M. and M. Iwamori, *Mass spectrometric characterization of cholesterol esters and wax esters in epidermis of fetal, adult and keloidal human skin*. Experimental dermatology, 2008. **17**(4): p. 318-23.
333. Robson, K.J., et al., *6-Hydroxy-4-sphingene in human epidermal ceramides*. Journal of lipid research, 1994. **35**(11): p. 2060-8.
334. Chopart, A., *A new type of covalently bound ceramide in human epithelia*, in *The Essential Stratum Corneum*, R. Marks, J.L. Leveque, and R. Voegeli, Editors. 2002, Martin Dunitz: London. p. 331-334.
335. Swartzendruber, D.C., et al., *Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope*. J.Invest Dermatol., 1987. **88**(6): p. 709-713.
336. Behne, M., et al., *Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function*. J.Invest Dermatol., 2000. **114**(1): p. 185-192.
337. Geilen, C.C., S. Barz, and M. Bektas, *Sphingolipid signaling in epidermal homeostasis. Current knowledge and new therapeutic approaches in dermatology*. Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol, 2001. **14**(5): p. 261-271.
338. Geilen, C.C., T. Wieder, and C.E. Orfanos, *Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis*. Arch.Dermatol.Res., 1997. **289**(10): p. 559-566.
339. Wakita, H., et al., *Sphingosylphosphorylcholine stimulates proliferation and upregulates cell surface-associated plasminogen activator activity in cultured human keratinocytes*. J.Invest Dermatol., 1998. **110**(3): p. 253-258.
340. Watson, A.L., et al., *Dietary constituents are able to play a beneficial role in canine epidermal barrier function*. Experimental dermatology, 2006. **15**(1): p. 74-81.
341. Jung, E.M., et al., *A potential role for ceramide in the regulation of mouse epidermal keratinocyte proliferation and differentiation*. J.Invest Dermatol., 1998. **110**(4): p. 318-323.
342. Kim, T.I., et al., *Ceramide-induced apoptosis in rabbit corneal fibroblasts*. Cornea, 2005. **24**(1): p. 72-79.
343. Kim, W.H., et al., *Ceramide induces non-apoptotic cell death in human glioma cells*. Neurochem.Res., 2005. **30**(8): p. 969-979.
344. Kim, W.H., et al., *Involvement of p27(kip1) in ceramide-mediated apoptosis in HL-60 cells*. Cancer Lett., 2000. **151**(1): p. 39-48.
345. Kim, S., et al., *Phytosphingosine stimulates the differentiation of human keratinocytes and inhibits TPA-induced inflammatory epidermal hyperplasia in hairless mouse skin*. Molecular medicine, 2006. **12**(1-3): p. 17-24.
346. Kim, S.S., et al., *P53 mediates ceramide-induced apoptosis in SKN-SH cells*. Oncogene, 2002. **21**(13): p. 2020-2028.
347. Wakita, H., et al., *Keratinocyte differentiation is induced by cell-permeant ceramides and its proliferation is promoted by sphingosine*. Arch.Dermatol.Res., 1994. **286**(6): p. 350-354.
348. Honma, M., et al., *Identification of novel keratinocyte differentiation modulating compounds by high-throughput screening*. Journal of biomolecular screening, 2006. **11**(8): p. 977-84.

349. Farwick, M., et al., *Salicyloyl-phytosphingosine: a novel agent for the repair of photoaged skin*. International Journal of Cosmetic Science, 2007. **29**(4): p. 319-329.
350. Paragh, G., et al., *Novel sphingolipid derivatives promote keratinocyte differentiation*. Experimental dermatology, 2008. **17**(12): p. 1004-16.
351. Reischl, J., et al., *Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques*. The Journal of investigative dermatology, 2007. **127**(1): p. 163-9.
352. Edgar, R., M. Domrachev, and A.E. Lash, *Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository*. Nucleic acids research, 2002. **30**(1): p. 207-10.
353. Chang-Claude, J., et al., *The patched polymorphism Pro1315Leu (C3944T) may modulate the association between use of oral contraceptives and breast cancer risk*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2003. **103**(6): p. 779-83.
354. Asplund, A., et al., *PTCH codon 1315 polymorphism and risk for nonmelanoma skin cancer*. The British journal of dermatology, 2005. **152**(5): p. 868-73.
355. Liboutet, M., et al., *MC1R and PTCH gene polymorphism in French patients with basal cell carcinomas*. The Journal of investigative dermatology, 2006. **126**(7): p. 1510-7.
356. Hafner, C., et al., *PTCH mutations are not mainly involved in the pathogenesis of sporadic trichoblastomas*. Human pathology, 2007. **38**(10): p. 1496-500.
357. Cavalli-Sforza, L.L., P. Menozzi, and A. Piazza, *The history and geography of human genes* 1994, Princeton, N.J.: Princeton University Press. xi, 541, 518 p.
358. Long, C.C. and R. Marks, *Increased risk of skin cancer: another Celtic myth? A review of Celtic ancestry and other risk factors for malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1995. **33**(4): p. 658-61.
359. Chedekel, M.R., et al., *Photodestruction of pheomelanin: role of oxygen*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978. **75**(11): p. 5395-9.
360. Hill, H.Z., et al., *Melanin: a two edged sword?* Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society, 1997. **10**(3): p. 158-61.
361. Johnson, R.L., L. Milenkovic, and M.P. Scott, *In vivo functions of the patched protein: requirement of the C terminus for target gene inactivation but not Hedgehog sequestration*. Molecular cell, 2000. **6**(2): p. 467-78.
362. Bailey, E.C., et al., *Several PATCHED1 missense mutations display activity in patched1-deficient fibroblasts*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(37): p. 33632-40.
363. Ping, X.L., et al., *PTCH mutations in squamous cell carcinoma of the skin*. The Journal of investigative dermatology, 2001. **116**(4): p. 614-6.
364. Ahmadian, A., et al., *Genetic instability in the 9q22.3 region is a late event in the development of squamous cell carcinoma*. Oncogene, 1998. **17**(14): p. 1837-43.
365. Eklund, L.K., et al., *Mutation analysis of the human homologue of Drosophila patched and the xeroderma pigmentosum complementation group A genes in squamous cell carcinomas of the skin*. Molecular carcinogenesis, 1998. **21**(2): p. 87-92.

dc_274_11