

**MTA DOKTORA PÁLYÁZAT
AZ ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

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

Dr. Széll Márta



**MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport
SZTE Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika**

**SZEGED
2009**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1. A genomikai és molekuláris biológiai kutatások jelentősége a multifaktoriális betegségek pathogenezisének kutatásában	3
1.2. A vizsgált multifaktoriális bőrgyógyászati kórképek	4
2. Célkitűzések	7
3. Anyagok és módszerek	8
4. Eredmények	10
4.1. A keratinocita proliferáció szabályozásának vizsgálata multifaktoriális bőrbetegségekben	10
4.2. Multifaktoriális bőrbetegségekre hajlamosító polimorfizmusok azonosítása és vizsgálata	13
4.3. A PRINS nem-kódoló RNS azonosítása, szerepe a sejtek stressz válaszában és a pikkelysömör pathogenezisében	15
5. Megbeszélés	17
6. Összefoglalás	26
7. A munka gyakorlati hasznosításának lehetőségei	28
8. Az értekezés összeállításához felhasznált közlemények jegyzéke	29
9. A bőr immunfunkcióival kapcsolatos, a dolgozatba be nem épített társszerzős közlemények jegyzéke	30
10. Irodalomjegyzék	31

1. Bevezetés

1.1. A genomikai és molekuláris biológiai kutatások jelentősége a multifaktoriális bőrbetegségek pathogenezésének kutatásában

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

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

Dolgozatom három részében azt fogom bemutatni, hogy kutatásainkat a Humán Genom Projekt által szolgáltatott adatokra építve hogyan kerülhetünk közelebb a multifaktoriális betegségek, esetünkben az immunmediált multifaktoriális bőrgyógyászati kórképek pathogenezésének, a betegségek mechanizmusának megértéséhez.

Munkám első részében nagyrészt a pikkelysömörben és vénás eredetű lábszárfekélyben végzett sejt- és molekuláris biológiai vizsgálatainkat összegzem. A bemutatott kísérletek megtervezése, kivitelezése során nagyban támaszkodtunk a Humán Genom Projekt által szolgáltatott adatokra, gén- és fehérje expressziós eredményeink nem jöhettek volna létre ezek nélkül.

A dolgozat második részében a multifaktoriális bőrgyógyászati kórképekben végzett polimorfizmus és mutáció vizsgálatainkról számolok be. Szintén a Humán Genom Projektnek, majd a valamivel később indított HapMap projektnek köszönhetően vált ismertté, hogy a humán genom variabilitásának döntő többségét az úgynevezett „single nucleotide polymorphism”-ok, SNP-k adják. Nagyrészt polimorfizmusaink felelősek az emberi rasszban megfigyelhető jegyek változatosságáért, különböző betegségekre való fogékonyságért, bizonyos terápiákra adott válaszreakciók egyéni eltéréseiért.

Munkám harmadik részében egy kutatócsoportunk által azonosított, fehérjévé át nem íródó, ún. nem kódoló RNS-ről írok, annak elsődleges jellemzéséről, valamint arról, hogy eredményeink szerint milyen szerepet játszik az immunmediált multifaktoriális kórkép, a pikkelysömör pathogenezésében. A Humán Genom Projekt adatai révén jutottunk arra a meglepő felismerésre, hogy az emberi örökítő anyagnak mindössze 3%-a íródik át fehérjévé, és a fehérjéket kódoló génjeink száma nem haladja meg a 30 ezret. Az utóbbi évek eredményei dogmaváltásra ösztönözték a kutatókat. Az évtizedekig elfogadott ún. centrális dogma helyét elfoglalja egy olyan szemlélet, melyben a korábban „junk”-nak tekintett, fehérjévé át nem íródó humán transzkriptumok is helyet kapnak, és intenzív kutatásuknak köszönhetően egyre többet tudunk szerepükről a sejtek működésének szabályozásában, ill. humán betegségek pathogenezésében ¹.

1.2. A vizsgált multifaktoriális bőrgyógyászati kórképek

1.2.1. A pikkelysömör

A pikkelysömör a kaukázusi populációban 2–3% gyakorisággal előforduló kórkép. A pikkelysömörös bőrtünetek kialakulásában nagy szerepet játszik a T-sejtes infiltrátum a hámlati kötőszövetben és a hámban, valamint a háms sejtek (keratinociták) fokozott osztódása és kóros differenciálódása. A pikkelysömörre való hajlam kialakításáért felelős egyik alapvető fontosságú gén (vagy gének) a humán 6. kromoszóma rövid karján (6p21.3), a szöveti összeférhetőséget meghatározó fő hisztokompatibilitási génkomplexben (MHC) található(ak) ². Ezt a lókuszt a pikkelysömörrel foglalkozó irodalom PSORS1 (psoriasis susceptibility 1) néven említi. A PSORS1-en kívül mindeddig kilenc olyan lókuszt (PSORS2-10) azonosítottak a humán genomban, amely feltehetően szerepet játszik a pikkelysömörre való hajlam kialakításában.

A pikkelysömörrel kapcsolatos genetikai és immunológiai kutatások évtizedeken keresztül egymással párhuzamosan folytak. Az immunológiai kutatások célja a betegség kialakításában szerepet játszó immunológiai eltérések azonosítása volt, míg a genetikai vizsgálatok elsősorban a hajlamot okozó genetikai lókuszt azonosítására fókuszáltak. A két kutatási irány mindeddig kevés ponton találkozott. Az elmúlt néhány év kutatásai azonban megmutatták, hogy a Th17 sejtek érésében szerepet játszó IL-23R a klasszikus genetikai térképezések által azonosított PSORS7 lókuszon belül található és az azt kódoló génen azonosított polimorfizmusok egyértelműen szerepet játszanak a pikkelysömörre való hajlam kialakításában ³. A felismerés hamarosan a klinikumban is hasznosul a pikkelysömörös betegek javára, mivel igen ígéretesek azoknak a klinikai kísérleteknek az eredményei, amelyekben az IL-23 ellenes ellenanyaggal blokkolják a pikkelysömörben megfigyelhető kóros IL-23/IL-23R/Th17 axis működését ⁴.

A klasszikus genetikai kapcsoltságai analízisek mellett sok értékes adatot szolgáltatnak a pikkelysömörre való hajlam kialakításáról azok a vizsgálatok, melyek a tünetek kialakulásáért felelős kóros citokin környezet hátterében álló eltéréseket kutatják. Több száz pikkelysömörös beteg és egészséges kontroll egyén TNF- α , IL-1- β és IL-1-RA polimorfizmusainak összevetése igen érdekes eredményeket szolgáltatott. A TNF- α , gén G-238A polimorfizmusa emelt szintű TNF- α produkcióhoz vezet, és szignifikáns asszociációt mutat az I. típusú, fiatalkori pikkelysömörre való hajlammal, érdekes módon elsősorban a férfi betegekben ⁵. Ezzel szemben az IL-1 β gén C-511T polimorfizmusa a II. típusú, negyven év felett jelentkező pikkelysömörrel mutatott asszociációt. Az antiinflammatorikus hatású IL-10-ről régóta ismert, hogy fontos szerepet játszik a pikkelysömör pathomechanizmusában. Az IL10.G13 allél I. típusú, családi halmozódást mutató, fiatalkori pikkelysömörrel való szignifikáns asszociációját találták. Ezek alapján feltételezik, hogy az IL10 lókuszt szerepet játszik a pikkelysömörre való hajlam kialakításában ⁶.

A pikkelysömörre hajlamot okozó genetikai faktorok azonosításának egy harmadik megközelítési lehetősége az ún. nagyskálájú génexpressziós vizsgálat. Anne Bowcock és munkatársai ⁷ 177 olyan gént azonosítottak, amely az egészséges bőrhöz viszonyítva alacsonyabb vagy magasabb szinten fejeződik ki a pikkelysömörös tünetes bőrben. Ezek közül tíz a pikkelysömörös tünetmentes bőrben is eltérő expressziót mutatott, és a már korábban azonosított PSORS lókusztok valamelyikére térképeződött. Ez az eredmény arra utalt, hogy a pikkelysömörre való hajlam kialakításában részt vevő egyes gének oly módon fejtik ki hatásukat, hogy a tünetmentes bőrben az egészségeshez viszonyítva kóros szinten fejeződnek ki mRNS szinten.

Az azóta eltelt időben számos munkacsoport számolt be hasonló jellegű cDNS chip vizsgálatról, ⁸⁻¹⁰ amelyek részben megerősítették a korábbi eredményeket, részben új, a pikkelysömörben eltérő szinten kifejeződő génekről számoltak be. A fent idézett munkákban a szerzők egyöntetűen hangsúlyozták, hogy a nagyskálájú génexpressziós kísérleteknek nagy szerepe van a terápiás célpontok azonosításában.

1.2.2. A krónikus vénás elégtelenség talaján kialakuló lábszárfekély

A vénás elégtelenség talaján kialakuló lábszárfekélyt (ulcus cruris) szintén multifaktoriális bőrbetegségnek tekintjük, melynek pathogenezisében egyéni hajlamot, életmódbeli és környezeti faktorok is szerepet játszanak. Mint a kórkép neve is mutatja, a lábszáron megjelenő és krónikusan fennálló lábszárfekélyt a vénák keringési elégtelenségének kialakulása előzi meg; az ulcus cruris tulajdonképpen a krónikus vénás elégtelenség végstádiuma. Statisztikai adatok szerint a lakosság 3-5%-a érintett krónikus vénás elégtelenségben és 1%-a az annak talaján kialakult lábszárfekélyben. A fekélyben a

normál sebgyógyulás folyamatai sérülnek; annak érdekében tehát, hogy a kóros sebgyógyulás pathofiziológiai folyamatait megérthessük, tudnunk kell, hogy milyen sejtbiológia, immunológiai és molekuláris biológiai eltérések állnak fenn a normál sebgyógyulás és a fekélyekben megfigyelhető kóros sebgyógyulás között. A normál sebgyógyulás folyamán a keratinociták, a fibroblasztok, az endotél sejtek, és professzionális immunsejtek térben és időben rendkívül szigorúan szabályozott vándorlása, infiltrációja, proliferációja és differenciációja zajlik, melyet három fő szakaszra osztunk: exsudatív, vagy más néven gyulladásos, granulációs és epitelizációs szakaszokra.

A normál sebgyógyulás folyamatában a professzionális immunsejtek nagyon fontos szerepet játszanak¹¹, mára már jól ismert, hogy az egyes fehérvérsejt alpopulációk mikor és milyen módon vándorolnak be a sebzés helyére, és ott hogyan fejtik ki hatásukat, milyen citokineket, limfokineket és növekedési faktorokat termelnek. A normál sebgyógyulás folyamatában azonban nem csak a professzionális immunsejtek által termelt citokinek játszanak fontos szerepet, hanem a keratinociták és a fibroblasztok által termelt faktorok is. A keratinociták proliferációja és migrációja rendkívül fontos a sebgyógyulás re-epitelizációs fázisában. Ebben a folyamatban egy összetett kettős parakrin szabályozási rendszer is részt vesz: sebzés hatására az epidermális keratinociták IL-1 α -t és IL-1 β -t kezdenek termelni, amely lejut a dermiszbe. A dermiszben az IL-1 α -t és IL-1 β -t a fibroblasztok FGF-7(=KGF-1) és FGF-10(=KGF-2) termelését indukálja. Az FGF-7 és FGF-10 az epidermiszbe jutva a keratinociták proliferációját serkentik, oly módon, hogy az FGFR-2 receptor család IIb variánsához, a keratinocita növekedési faktor receptorhoz (KGFR) kötődnek¹².

Mivel ismert, hogy a vénás eredetű lábszárfekélyre való hajlam családi halmozódást mutat, feltételezzük, hogy a sebgyógyulásban szerepet játszó gének polimorfizmusa is hozzájárulnak a kóros sebgyógyulás kialakításához. Igazolták, hogy a protrombin¹³ és a XIII. vérvaladási faktor¹⁴ géneken egy-egy polimorfizmusa a kórkép kialakulására hajlamosít. Ismert, a TNF- α fontos faktor a normál sebgyógyulás folyamatának szabályozásában^{15,16}. Egy ausztrál munkacsoport kimutatta, hogy a TNF- α szintje alacsonyabb a terápia rezisztens fekélyekben, mint azokban, amelyekben a sebgyógyulás folyamata lezajlott¹⁷. Ezt követően megvizsgálták, hogy vannak-e a TNF- α gének olyan polimorfizmusa, amelyek a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek csoportjában magasabb arányban fordulnak elő, és hajlamosító genetikai faktorként szerepelnek a kórkép kialakulásában ill. felelősek lehetnek a TNF- α alacsonyabb szintjéért a sebváladéokban. Wallace és munkatársai arra az eredményre jutottak, hogy a TNF- α gén -308 pozícióban levő polimorfizmusa (G/A SNP) a vénás eredetű lábszárfekélyre hajlamosító faktor.

1.2.3. A festékhányos bőrbetegség

A festékhányos bőrbetegség, a vitiligo a lakosság megközelítőleg 1-1,5%-át érintő multifaktoriális bőrgyógyászati kórkép. A vitiligo során a bőr foltokban veszíti el pigmentációját, s ezeken a helyeken teljesen pigment mentes, fehér lesz. A tünetek által érintett területeken nem csupán a melanin pigment hiányzik, hanem az azt termelő melanociták sincsenek jelen¹⁸. A vitiligót jelenlegi ismereteink szerint autoimmun betegségnek tekintjük^{19,20}. Autoreaktív T sejtek szerepét is bizonyították a vitiligo pathogenezisében²¹. A vitiligo által érintett bőrtületeken nem lehet gyulladást megfigyelni, amely arra utal, hogy a melanociták apoptózis, és nem nekrosis révén pusztulnak el²².

A fent ismertetett eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a vitiligo immunmediált betegség. Ismert azonban az is, hogy a vitiligós betegek megközelítőleg 30-40%-a számol be arról, hogy családtagjai között is előfordul ez a bőrbetegség, azonban a kórkép nem mutat mendeli öröklődés menetét. Mindez felvetette annak lehetőségét, hogy a vitiligo egy poligénesen meghatározott, immunmediált multifaktoriális bőrbetegség. Tekintve, hogy a vitiligo autoimmun eredetét számos tény bizonyítja, a polimorfizmus vizsgálatok döntő hányadát immunszabályozást végző fehérjéket kódoló géneken végezték. A citotoxikus T limfocita asszociált antigén-4 (CTLA-4) gén^{23,24}, a limfoid protein tirozináz foszfatáz (PTPN22) gén²⁵⁻²⁸, és az IL-10 gén három promóter polimorfizmusát²⁹ találták hajlamosító genetikai faktornak.

A kilencvenes évek közepe óta ismert az is, hogy a vitiligós betegek körében, mind a depigmentált, mind a normál pigmentáltságú területeken, a hidrogén peroxid (H₂O₂) mennyisége emelkedett, valamint hogy a kataláz enzim mennyisége csökkent az egészséges egyének bőrével összevetve³⁰, amely felveti az oxidatív stressz pathogenetikai szerepét is. Igazolták, hogy a kataláz gén 9. exonjában található kodon 389 C/T polimorfizmus mutáns allélja szignifikánsan magasabb arányban detektálható észak-amerikai, kaukázusi nagyrasszhoz tartozó vitiligós betegek körében, mint egészségesek között^{31,32,33}. A glutation S-transzferáz (GST) enzim M izoformájának polimorfizmusa (GSTM1), amely egy teljes enzimaktivitás vesztéssel járó delécio, szintén magasabb arányban fordul elő koreai vitiligós betegek körében, mint egészségesekben³⁴. Egy kínai munkacsoport az NF-E2-related factor2 (Nrf2) gén polimorfizmusait

vizsgálta és azt találta, hogy a gén promóterének -650 pozícióban levő polimorfizmusa szignifikánsan magasabb mutáns allélfrekvenciával fordul elő vitiligóban³⁵. Az NRF2 egy transzkripció faktor, amely számos antioxidáns hatású, ill. a sejtek detoxifikálását végző fehérjét kódoló gén expresszióját szabályozza.

A humán pigmentáció kialakításáért felelős gének polimorfizmusait vitiligóban szintén egy koreai munkacsoport tanulmányozta elsőként. A melanokortin-1 receptor (MC1R) és az agouti signaling protein (ASIP) géneket vizsgálták, és egyiken sem azonosítottak olyan polimorfizmust, amely mutáns allél frekvenciája szignifikánsan eltért volna az egészségesek és a vitiligós betegek között³⁶. Mivel ismert³⁷, hogy a humán nagyrasszok között milyen nagy eltérések vannak az MC1R polimorfizmusok mutáns allél frekvenciájában, nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a kaukázusi populációban bizonyos MC1R allélok szerepet játszanak a vitiligo pathogenezésében.

1.2.4. A malignus melanoma

A malignus melanoma a bőr és a nyálkahártyák melanocitáinak tumoros transzformációja révén alakul ki, és az egyik legrosszabb indulatú daganat. A melanoma multifaktoriális bőrbetegség, amely genetikai predispónáló, életmódbeli és környezeti faktorok együttes hatására alakul ki. A melanoma megbetegedésben nagy szerepe van annak, hogy a bőrt milyen mértékű fénykárosodás éri, ebből a szempontból a legkárosabb a kisgyermekkorban elszenvedett napégés.

A melanoma kialakulhat ép bőrön (ez adja az esetek több mint 50%-át), vagy a bőr már meglévő pigmentált elváltozásának talaján. A melanoma megbetegések 10%-a ún. familiáris melanoma. A familiáris melanoma esetében egyértelmű a nagy penetranciájú genetikai háttér megléte, ezzel ellentétben az ún. sporadikus melanoma kialakulásához jóval kisebb penetranciájú hajlamosító genetikai faktorok járulnak hozzá. Napjainkra elfogadottá vált és kísérletes adatok sora bizonyítja, hogy a familiáris melanoma hátterében általában kis gyakorisággal előforduló nagy penetranciájú allélok állnak, míg a sporadikus melanoma poligénesen kialakított multifaktoriális körkép³⁸. Familiáris melanomát halmozottan mutató családok genetikai kapcsoltsági vizsgálatai felderítették, hogy a körképért elsősorban a ciklin dependens kináz 2A (CDKN2A) gén mutációi a felelősek³⁹.

A nagy penetranciájú, familiáris és primér multiplex melanomát okozó CDKN2A mutációk azonosításán kívül nagy figyelem fordul a sporadikus melanoma kialakulására hajlamosító, kisebb penetranciájú polimorfizmusok azonosítására is. Számos tapasztalati tény szól amellett, hogy a bőr és a szervezet immunfunkciói befolyásolják a melanomára való hajlam kialakulását.

Az elmúlt néhány évben számos olyan közlemény látott napvilágot, amely immun regulációban szerepet játszó citokin és citokin receptor géneken azonosított melanomára hajlamosító polimorfizmusokat. Howell és munkatársai⁴⁰ az IL-10 promóter régióan azonosítottak egyik haplotípus, amely a gén alacsonyabb szintű expresszióját okozza és hajlamosító faktor melanomára. Egy másik tanulmány szerint a TNF- α , IFN- γ és IL-6 gének alacsony expresszióját okozó polimorfizmusai szintén szerepet játszhatnak a melanoma pathogenezésében⁴¹.

A sporadikus melanomára hajlamosító genetikai faktorok kutatása igen korán kiterjedt a humán pigmentációt szabályozó génekre, elsősorban a rendkívül polimorf MC1R génre. Ismert, hogy az MC1R polimorfizmusok gyakorisága és haplotípusai a Föld különböző nagyrasszaiban és azokon belül a kisebb populációkban is igen változatosságot mutat³⁷. Az MC1R polimorfizmusok és a melanomára való hajlam irodalma az elmúlt évek intenzív kutatásának köszönhetően igen kiterjedt; napjaink egyik törekvése, hogy a Föld különböző lokalizációiban született eredményeket meta-analízisekkel összegezze és vonjon le általános következtetéseket a polimorfizmusok melanoma predispónáló hatásáról^{38;42;43}.

2. Célkitűzések

2.1. A keratinocita proliferáció szabályozásának vizsgálata multifaktoriális bőrbetegségekben

2.1.1. *In vitro* modellrendszer beállítása a normál humán keratinociták különböző proliferációs és differenciációs állapotainak vizsgálatára, a modellrendszer elsődleges jellemzése

2.1.2. Szérum faktorok, az etanol és az aceton hatásának vizsgálata a keratinociták proliferációjára

2.1.3. Az EDA motívumot hordozó onkofötális (EDA⁺) fibronektin szerepének vizsgálata a keratinociták proliferációjának szabályozásában, valamint a pikkelysömör pathogenezisében

2.1.4. A keratinocita növekedési faktor receptor (FGFR2-IIIb) kifejeződésének vizsgálata keratinocitákban és a pikkelysömör pathogenezisében

2.1.5. A D típusú ciklinek sejtciklus szabályozásban betöltött szerepének vizsgálata és kifejeződésük pikkelysömörben

2.1.6. A szindekán-4 és a neurofilin-1 expressziójának vizsgálata vénás eredetű lábszárfekélyben

2.2. Multifaktoriális bőrbetegségekre hajlamosító polimorfizmusok azonosítása és vizsgálata

2.2.2. A melanokortin-1 receptor (MC1R) gén polimorfizmusainak vizsgálata vitiligóban

2.2.3. Familiáris és multiplex primér melanomában szenvedő betegek genetikai vizsgálata, hajlamosító ciklin dependens kináz 2A (CDKN2A) mutációk és MC1R polimorfizmusok azonosítása

2.2.4. A vénás eredetű lábszárfekély kialakulására hajlamosító genetikai tényezők azonosítása

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

3. Anyagok és módszerek

Szövetminták

- Pikkelysömörös betegek: tünetes és tünetmentes bőrminták - „punch” és „shave” biopsziák
 - Vénás eredetű lábszárfelekélyben szenvedő betegek: tünetmentes bőrminták - „shave” biopsziák
 - Egészséges egyének kontroll bőrmintái: a Klinika Plasztikai Sebészeti Osztályán eltávolításra került, eldobásra szánt szövetek
 - Egyéb egészséges humán szövettípusok: a Szegedi Tudományegyetem Sebészeti Klinikán különböző műtéti beavatkozások során eltávolított, az alapbetegségtől nem érintett szövetek
- A mintavételek körülményei megfeleltek a helyi Etikai Bizottság előírásainak és minden, a dolgozatban említésre kerülő vizsgálat rendelkezett a megfelelő etikai engedéllyel.

Genomi DNS tisztítása polimorfizmus vizsgálatok céljára

- Vénás vérből
 - Szájnyálkahártya kenetből
- A mintavételekhez minden esetben rendelkezünk a helyi Etikai Bizottság engedélyével és a vért ill. szájnyálkahártya kaparekót adó önkéntesek felvilágosítást követően egyeztek bele a mintavételbe.
- A vérmintákból kiték segítségével tisztítottunk genomi DNS-t, szájnyálkahártya mintákból a MagNA Pure Compact kit segítségével nyertük ki a genomi DNS-t.

Sejt- és szövettenyésztési eljárások

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

Polimorfizmusok vizsgálata

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

Génexpressziós vizsgálatok

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

Fehérje expressziós vizsgálatok

A dolgozatban ismertetett kísérleteinkben négyféle fehérje expressziós vizsgálati módszert alkalmaztunk: immuncitokémiai és immunhisztokémiai festéseket, Western blott analízist és áramlási citometria méréseket.

Funkcionális vizsgálatok

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

Viabilitási vizsgálatok

Viabilitási vizsgálatokat MTT esszével végeztünk.

Statisztikai analízisek

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

4. Eredmények

4.1 A keratinocita proliferáció szabályozásának vizsgálata multifaktoriális bőrbetegségekben

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

A kísérletes bőrgyógyászati kutatások elterjedt *in vitro* rendszerét biztosítják az immortalizált HaCaT keratinociták⁴⁴. A HaCaT keratinociták immortalizáltak és genetikusan különböznek a normál keratinocitáktól⁴⁵, tanulmányozásuk mégis értékes elsődleges adatokat szolgáltathat a sejtek proliferációs/differenciációs sajátosságairól, amelyeket aztán a normál humán tenyésztett keratinocitákon végzett további kísérletek eredményeivel szoktunk összevetni.

Kísérleteinkhez kidolgoztunk a HaCaT keratinociták szinkronizálásának módszerét. Az eljárás lényege, hogy a HaCaT keratinociták tenyészetét addig növesztjük, míg eléri a konfluens állapotot, majd további két hétig tenyésztjük a sejteket kétnaponkénti táptalaj cserével. A második héten a sejtektől a szérumot is megvonjuk. Az eljárás következtében a sejtek a második hét végére G₀ sejtnyugalmi állapotba kerülnek. Ekkor a HaCaT keratinocitákat szétpasszáljuk, és a passzáláskor használt táptalaj már szérumot is tartalmaz. A sejtek ennek következtében szinkron osztódni kezdenek, melyet propidium jodidos DNS festéssel tudunk demonstrálni. Ezt követően a sejt kultúrákból egy héten keresztül mintákat gyűjtünk.

Tanulmányoztuk az $\alpha 5$ integrin, a D1 ciklin és a K1/K10 molekulák expressziójának változásait, annak érdekében, hogy eredményeinkkel hozzájáruljunk ezen *in vitro* modell rendszer további jellemzéséhez, valamint a fenti molekulák pikkelysömör pathomechanizmusában betöltött szerepének tisztázásához.

Megmutattuk, hogy a különböző proliferációs ($\alpha 5$ integrin és D1 ciklin) és differenciós (K1/K10) markerek mind gén-, mind fehérje expressziós szinten markáns változásokat mutatnak és ezekkel a markerekkel jól monitorozhatóak a HaCaT keratinociták proliferációs/differenciációs folyamatai. Ily módon egy olyan érzékeny kísérleti rendszert sikerült kifejlesztenünk és a mindennapi laboratóriumi gyakorlatba bevonnunk, amely alkalmas modellrendszert biztosít a keratinociták növekedésére ható külső faktorok tanulmányozásához.

4.1.2 Szérum faktorok, az etanol és az aceton indukálják a keratinocita proliferációs markerek expresszióját, és feltehetően hozzájárulnak a pikkelysömörre jellemző keratinocita hiperproliferációhoz

Megvizsgáltuk, hogy a szérum milyen hatással van HaCaT sejtekben a proliferációs/differenciációs markerek expressziójára. Intenzíven osztódó HaCaT sejtektől megvontuk a szérumot, majd azt vizsgáltuk, hogy hogyan változik az $\alpha 5$ integrin és a K1/K10 mRNS-ek expressziója. Eredményeink szerint a szérum megvonása nincs hatással a K10 mRNS expressziójára, az $\alpha 5$ integrin gén kifejeződése nagymértékben lecsökken, míg a differenciációs marker K1 gén kifejeződése megemelkedik szérum hiányában. Mindebből arra következtettünk, hogy a keratinociták $\alpha 5$ integrin és K1 génextpressziójának szabályozásában szérumfaktorok is részt vesznek, míg a K10 gén szabályozásában ezek a faktorok nem játszanak szerepet.

Egy másik kísérletsorozatunkban arra voltunk kíváncsiak, hogy az etanol és az aceton szubtoxikus mennyiségben vajon direkt módon hatnak-e a keratinociták proliferációjára. A kísérlet elvégzésére az a klinikai megfigyelés sarkallt bennünket, hogy az alkohol fogyasztás következtében a pikkelysömörös betegek tünetei általában romlani szoktak, és tisztázni szeretnénk volna, hogy ez a hatás vajon közvetlen módon a keratinociták növekedésének befolyásolásán keresztül, vagy közvetett módon történik meg. Aktívan osztódó HaCaT sejtekhez acetont és etanolt adtunk, és mindössze félórás, szubtoxikus koncentrációkban történt kezelés hatására megfigyelhető volt az $\alpha 5$ integrin, a D1 ciklin, valamint a KGRF gének expressziójának növekedése. Mind a három gén expressziója a proliferáló keratinocitákra jellemző.

4.1.3. A proliferáló keratinociták lehetséges forrásai az EDA motívumot hordozó onkofötális (EDA⁺) fibroektinnel

Mint az már említésre került, előzetes adatok arra utaltak⁴⁶, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz keratinocitái emelkedett szintű $\alpha 5$ integrint expresszálnak. Ez feltehetően hozzájárul ahhoz a jelenséghez, amelyet munkacsoportunk is demonstrált, miszerint a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták inherens módon érzékenyebben reagálnak a T-sejt limfokinek indukciójára, amely a

pikkelysömör pathogenezésének egyik kulcs mozzanata. Keratinocita proliferáció szabályozással kapcsolatos kutatásaink következő szakaszában tehát azt a problémakört jártuk körül, hogy az $\alpha 5$ integrin ligandjának, a fibronektinnek milyen izoformáit (EDA motívumot hordozó EDA⁺ és a motívumot nem hordozó EDA⁻) fejezik ki a keratinociták, és ezek hogyan járulnak hozzá a pikkelysömör pathogenezéséhez.

Kimutattuk, hogy a keratinociták és a HaCaT sejtek a fibroblasztok által termelt össz fibronektin mRNS-ének csupán töredékét fejezik ki. Az EDA⁺ izoforma HaCaT sejtekben jóval magasabban fejeződik ki, mint a tenyésztett normál humán keratinocitákban. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az EDA⁺ izoforma termelése valamilyen módon összefüggésbe hozható a nagyobb proliferációs kapacitással.

Következő kísérletsorozatunkban azt vizsgáltuk, hogy hogyan változik az össz fibronektin mennyisége, ill. az EDA⁺/EDA⁻ izoformák aránya keratinociták proliferációs/differenciációs állapotának függvényében. Ezek a kísérletek mind azt igazolták, hogy a HaCaT keratinociták akkor termelik a legnagyobb mennyiségű fibronektint, amikor a legintenzívebben proliferálnak, valamint az onkofötális EDA⁺ izoforma aránya is az aktív proliferációs stádiumban a legmagasabb.

Összehasonlítottuk az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből izolált epidermális sejtek onkofötális EDA⁺ fibronektin expresszióját. Méréseinkhez áramlásos citometriai módszert alkalmaztunk. Eredményeink szerint az egészséges epidermiszből származó sejtek rövid *ex vivo* kultúra során (72 órás tenyésztés) nem fejezik ki az onkofötális EDA⁺ fibronektint, míg a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből származó sejtek 3%-a kifejezi ezt az izoformát. Ezt az eredményünket direkt bizonyítéknak tekintjük arra nézve, hogy a tünetmentes epidermisz keratinocitái maguk lehetnek az onkofötális EDA⁺ fibronektin termelői, amellyel hozzájárulnak az extracelluláris mátrix összetételének, s ezen keresztül a keratinociták válaszkészségének megváltozásához.

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

Kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakciót (Q-RT-PCR) végeztünk annak tisztázására, hogy vajon a tünetmentes pikkelysömörös epidermiszben emelkedett-e az FGFR2-IIIb expresszió. Eredményeink arra utalnak, hogy az egészséges epidermiszhez viszonyítva mind a tünetes, mind a tünetmentes pikkelysömörös epidermiszben magasabb az FGFR2-IIIb mRNS expresszió. A Finch és munkatársai⁴⁷ által közölt eredményeket tehát azzal a saját adattal tudtuk kiegészíteni, hogy az emelkedett szintű FGFR2-IIIb expresszió nem csupán a már hiperproliferáló pikkelysömörös keratinociták sajátja, hanem a tünetmentes epidermiszben is magasabb és ez feltehetően hozzájárul a tünetmentes területek keratinocitáinak pre-aktivált állapotához.

Annak a kérdésnek a tisztázására, miszerint az FGFR2-IIIb expresszió indukciója a keratinociták proliferációjához vagy differenciációjához kötött, *in vitro* vizsgálatokat végeztünk immortalizált HaCaT keratinocitákon. Kísérleteink egy részében a szinkronizált HaCaT keratinociták modellrendszerét alkalmaztuk és kimutattuk, hogy az FGFR2-IIIb mind mRNS, mind fehérjeszinten az aktívan proliferáló sejtekben fejeződik ki a legmagasabb szinten: mRNS szintű expressziója a sejtnyugalmi fázisból történő kilépést követő 48, míg fehérje expressziós maximuma 72 és 96 óra elteltével látható. Propídium-jodidos DNS festési vizsgálataink szerint⁴⁸ a HaCaT keratinociták ezekben az időpontokban proliferálnak a legaktívabban a sejtnyugalmi fázisból történő szinkron kilépést követően.

Egy másik kísérleti megközelítésben azt vizsgáltuk, hogy hogyan változik az FGFR2-IIIb magas szintű expressziója, ha az aktívan proliferáló HaCaT keratinociták tenyésztési körülményeit oly módon változtatjuk meg, hogy azokat differenciációra készítjük át, azáltal, hogy szuszpenzióban tenyésztjük őket, vagy anti-proliferatív hatású anyaggal kezeljük. Eredményeink szerint az FGFR2-IIIb expressziója mind mRNS, mind fehérje szinten nagymértékben lecsökkent a szuszpenzió indukálta differenciáció folyamán. Az FGFR2-IIIb expressziójával ellenkező kifejeződési mintázatot mutatott a K10 differenciációs marker mind mRNS, mind fehérje szinten. Másik kísérletünkben a pikkelysömör kezelésében használt anti-proliferatív hatású dithranollal kezelünk a HaCaT sejteket és vizsgáltuk FGFR2-IIIb expressziójukat. Azt tapasztaltuk, hogy dithranol hatására az FGFR2-IIIb expressziója mind mRNS, mind fehérje szinten dóziszfüggő csökkenést mutatott. Ezeknek a kísérleteknek az eredményei, valamint a szinkronizált HaCaT keratinociták vizsgálata során szerzett adataink mind arra utalnak, hogy az FGFR2-IIIb expressziója a keratinociták aktívan proliferáló állapotát jellemzi.

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

Munkacsoportunk saját eredményei⁴⁹ és irodalmi adatok^{50;51} is arra utaltak, hogy a D típusú ciklinek (D1, D2 és D3 ciklin) a sejtciklus különböző szakaszaiban töltenek be szabályozó funkciót. Ezért elhatároztuk, hogy részletesen elemezzük a D típusú ciklinek mRNS expresszióját szinkronizált HaCaT sejtekben, valamint megvizsgáljuk annak a lehetőségét is, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz keratinocitáin abnormálisan magas kifejeződő $\alpha 5$ integrinnek van-e szerepe a D típusú ciklinek expressziójának szabályozásában. Végezetül arra is kíváncsiak voltunk, hogy vajon pikkelysömörben látunk-e különbségeket a különböző D típusú ciklinek mRNS és fehérje expressziójában.

Eredményeink arra utaltak, hogy a ciklin D1 mRNS expressziója akkor a legmagasabb, amikor a sejtek szinkron elkezdnek osztódni, majd expressziója a 24. órát követően egyre alacsonyabb lett. A ciklin D2 és D3 mRNS-ek kifejeződési mintázata eltért a ciklin D1 esetében tapasztaltaktól. A ciklin D2 és D3 mRNS-ek is igen alacsony szinten fejeződtek ki a sejtnyugalmi fázisban lévő HaCaT sejtekben (0h), expressziójuk mértéke egyenletesen növekedett és a sejtnyugalmi fázisból való kilépést követő 48 ill. 72 óránál érte el maximumát, majd fokozatosan csökkent (96 és 168 h). Áramlásos citometria méréseink fehérje szinten is megerősítették a fent ismertetett expressziós változásokat. Eredményeink szerint a D típusú ciklinek a szinkronizált HaCaT sejtek kultúrájában különböző időpontokban fejeződnek ki magas szinten, ami arra utal, hogy a sejtciklus különböző stádiumaiban tölthetnek be szabályozó szerepet.

Ezt követően azt vizsgáltuk meg, hogy az $\alpha 5$ integrin által mediált jelátviteli utak vajon szabályozzák-e a D típusú ciklinek mRNS expresszióját. Az $\alpha 5$ integrint neutralizáló hatású ellenanyaggal blokkoltuk és mértük a D1, D2 és D3 ciklinek génexpressziós változásait. A D2 és D3 ciklinek mRNS expresszióját nem befolyásolta az $\alpha 5$ integrin neutralizáló ellenanyaggal való kezelés, a D1 ciklin kifejeződése azonban szignifikáns módon lecsökkent a kezelés hatására. Eredményeink arra utalnak, hogy a D típusú ciklinek szabályozásában különböző jelátviteli útvonalak vesznek részt: az $\alpha 5$ integrin mediált jelátviteli folyamatok szerepet játszanak a D1 ciklin szabályozásában, míg a D2 és D3 ciklinekében nem.

Megvizsgáltuk, hogy vajon pikkelysömörben különbözik-e a D típusú ciklinek mRNS és fehérje szintű kifejeződése. A D1 ciklin mRNS expressziója mind a pikkelysömörös tünetes, mind a tünetmentes epidermiszben alacsonyabb volt, mint az egészséges epidermiszben; míg a D2 és D3 ciklin mRNS-ek szignifikánsan magasabb szinten fejeződtek ki a tünetes epidermiszben, mind a tünetmentes, mind az egészséges epidermiszhez viszonyítva. Immunhisztokémiai vizsgálatainkkal a D1 és D3 ciklin fehérjét tudtuk detektálni az egészséges és a pikkelysömörös mintákban. Az egészséges epidermiszben kizárólag magi D1 ciklin festődést tapasztaltunk és csak nagyon kisszámú sejt festődött a bazális és a szuprabazális rétegekben. A tünetes epidermiszben ellenben nem csupán magi, hanem kismértékű citoplazmás festődést is megfigyeltünk, és a ciklin D1 pozitív sejtek száma jóval magasabb volt, mint az egészséges epidermiszben. Ciklin D3 festődést mind a sejtmagban, mind a citoplazmában kimutattunk az egészséges epidermiszben, de kizárólag a follikulusok szuprabazális rétegeiben, az interfollikuláris területeken nem. A D3 ciklin pozitív sejtek száma nem volt magasabb a pikkelysömörös tünetes epidermiszben, mint az egészséges epidermiszben.

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

A szindekán-4 és neurofilin-1 molekulákról ismert, hogy szerepet játszanak a normál sebgyógyulásban⁵²⁻⁵⁶, a szindekán-4-gyel kapcsolatosan pedig olyan adat is a rendelkezésünkre állt, miszerint a fekélyes sebszélről származó mintákban a szindekán-4 fehérje intracelluláris lokalizációja eltér az egészséges bőrből tapasztaltaktól⁵⁷. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a szindekán-4 és a neurofilin-1 mRNS és fehérje szintű expressziójában a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek tünetmentes bőrében és az egészséges egyének bőrében.

Eredményeink szerint a szindekán-4 expressziója mind mRNS, mind fehérje szinten alacsonyabbnak bizonyult a vénás lábszárfekélyben szenvedő betegek tünetmentes dermiszében, mint az egészséges dermiszben, ugyanakkor az epidermiszben nem tapasztaltunk különbséget. Immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei megerősítették a Western blotból kapott adatokat: az epidermiszben nem tapasztaltunk különbséget a festődés intenzitásában vagy eloszlásában, a dermiszben azonban, ahol a fibroblasztok, a perikapilláris gyulladásos sejtek, valamint a kapilláris endotél mutatott pozitívítást, a tünetmentes bőr esetén valamivel alacsonyabb szintű festődést láttunk, mint az egészséges bőrből. A

neurofilin-1 esetében nem találtunk sem mRNS, sem fehérje szintű expressziós különbséget az egészséges bőr és a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőre között, melyet immunhisztokémiai vizsgálataink eredménye is megerősített.

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

4.2. Multifaktoriális bőrbetegségekre hajlamosító polimorfizmusok azonosítása és vizsgálata

4.2.1. A melanokortin-1 receptor gén (MC1R) Arg160Trp polimorfizmusa protektív genetikai faktor a vitiligo pathogenezésében

Kutatásaink két irányban folytak: egyrészt megvizsgáltuk (Magyarországon elsőként), hogy az MC1R polimorfizmusok hogyan vesznek részt a magyar lakosság pigmentációjának kialakításában; másrészt az is elemeztük, hogy ugyanezek a polimorfizmusok allél frekvenciái eltérnek-e az egészséges egyének és a vitiligos betegek csoportjaiban, lehetnek-e a betegségben hajlamosító genetikai faktorok.

Vizsgálatuk során 10 MC1R polimorfizmust azonosítottunk, melyek közül ötnek az allél frekvenciája alacsonyabb volt, mint 0,01, ezeket a további analíziseinkből kizártuk. Ezek között szerepelt egy új polimorfizmus is (Gly89Arg), amelyet eddig még nem írtak le az irodalomban. Olyan ritka polimorfizmust is találtunk (Gln233Gln) a magyar populációban, amelyet mindeddig egyszer említettek egy szardíniai egyén esetében. Végezetül öt polimorfizmus – Val60Leu, Val92Met, Arg151Cys, Arg160Trp és Arg163Gln – allél frekvenciáit vetettük össze a vizsgált sötét és a világos bőrű egyének között, oly módon, hogy az összehasonlításokba a haj és a szemszínre vonatkozó adatokat is bevontuk. Eredményeink szerint a vizsgált polimorfizmusok közül az Arg160Trp polimorfizmus allél frekvenciája szignifikánsan eltért a sötét és a világos bőrű egyének között.

Vizsgálataink adatait oly módon is kiértékeljük, hogy összevetettük a fenti öt MC1R polimorfizmus allél frekvenciáját világos és sötét bőrszínű vitiligos betegekben és egészséges egyénekben. Mivel a sötét bőrszínű egyének száma igen alacsony volt, a genotípus adatok statisztikai feldolgozása ezekben a csoportokban nem vezetett értékelhető konklúzióra. A világos bőrszínűek körében elvégzett statisztikai elemzések szerint azonban az Arg160Trp polimorfizmus allél frekvenciája különbséget mutatott a vitiligos betegek és az egészségesek közötti összehasonlításban. Az adatok statisztikai kiértékelése szerint a mutáns Arg160Trp allél szignifikánsan magasabb arányban fordul elő az egészséges egyének körében, mint a vitiligos betegek között. Adataink tehát arra utalnak, hogy az MC1R Arg160Trp polimorfizmusa a vitiligo kialakulása szempontjából protektív genetikai faktorként működik. Ezt a feltételezésünket erősíti azon *in silico* analízis eredménye is, amely során a vad típusú és a polimorf génszakasz által kódolt fehérje részlet antigenicitási paramétereit hasonlítja össze. Ez alapján az arginin aminosav triptofánra történő cseréje az építőp részlet antigenicitási sajátosságát csökkenti, feltételezzük tehát, hogy a polimorfizmus által érintett fehérje szakasz kisebb valószínűséggel indukálhat melanocita-specifikus autoimmun folyamatokat. Ily módon értelmezhetővé válik a mutáns allél protektív szerepe vitiligóban.

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

2005-ben egy programot indítottunk, amelynek keretében a Klinikánk gondozásában álló familiáris és többszörös primér melanomában szenvedő betegek és családtagjaik CDKN2A génjének analízisét végezzük el. A program megkezdése óta megközelítőleg 100 vizsgálatra került sor, a doktori értekezésben az eddig legérdekesebbnek tartott esetünkről számolok be.

Egy multiplex melanomában és atipusos anyajegy szindrómában szenvedő betegben detektáltunk egy rendkívül ritka mutációt: a gén 1α exonjában a 142. nukleotid pozícióban a beteg homozigóta formában hordozta a C > A transzverziót, amely a fehérje 48 pozíciójában levő prolin > treonin aminosav cserét okozza (P48). Vizsgálatainkat a beteg hozzátartozóira is kiterjesztettük. Megszekvenáltuk a CDKN2A gén 1α exonját a beteg édesanyja, édesapja, felesége és kislánya esetében, és azt találtuk, hogy feleség kivételével mindannyian heterozigóta formában hordozzák a P48T mutációt. Tehát a multiplex primér melanomában szenvedő beteg mind az édesapjától, mind az édesanyjától a mutáns P48T allélt örökölte, majd továbbörököltette azt kislányának is. Érdemes megemlíteni, hogy a multiplex primér melanomában szenvedő beteg szülei heterozigóta státuszuk ellenére nem szenvednek melanomában vagy egyéb tumoros betegségekben és atipusos anyajegy szindróma jeleit sem mutatják. Saját eredményeink tehát arra utalnak,

hogy az általunk detektált P48T CDKN2A mutáció csak homozigóta formában hajlamosít atípusos anyajegy szindrómára és melanómára. Ezt a mutációt mindeddig csak olasz vagy olasz származású betegekben és kizárólag heterozigóta formában detektálták³⁸⁻⁶¹, minden esetben melanomával és tumoros megbetegedésekkel asszociáltan. Ez azért nagyon érdekes, mert saját analízisünk a primér multiplex melanomában szenvedő beteg szüleit a mutáció heterozigóta hordozóinak azonosította, akik magas koruk mellett is egészségesek, semmiféle malignus betegségben nem szenvednek, amely arra utal, hogy a CDKN2A gén P48T mutációja heterozigóta formában önmagában nem jár a fenotípus kialakulásával, ahhoz egyéb genetikai és/vagy környezeti faktorok is szükségesek.

A családban elvégeztük a melanoma prediszoló MC1R polimorfizmusok vizsgálatát is. Három MC1R polimorfizmust detektáltunk a multiplex primér melanomában szenvedő beteg és családjának vizsgálatán: Val92Met, Arg142His és Arg151Cys, melyek közül az Arg142His és az Arg151Cys polimorfizmusokat melanoma prediszoló genetikai faktorként tartja számon az irodalom³⁸. Betegünk két polimorfizmust (Val92Met és Arg151Cys) hordozott heterozigóta formában, édesapjától a Val92Met, édesanyjától pedig az Arg151Cys polimorfizmust örökölte. A vizsgálat arra is fényt derített, hogy a beteg felesége is hordoz egy MC1R polimorfizmust (Arg142His) heterozigóta formában, melyet továbbörökölt most 8 éves közös gyermeküknek, aki így két melanoma prediszoló MC1R polimorfizmus (Arg142His és Arg151Cys) heterozigóta hordozója, valamint heterozigóta a P48T CDKN2A mutációra is.

4.2.3. A vénás eredetű lábszárfekély kialakulására hajlamosító genetikai tényezők azonosítása

Munkacsoportunk célul tűzte ki a kóros sebgyógyulásban megfigyelhető hámosodási zavarok hátterében álló genetikai hajlamosító faktorok azonosítását. Választásunk a fibroblaszt növekedési faktor receptor-2 (FGFR2) génre esett, amelyen 5 SNP-t vizsgáltunk meg.

Eredményeink szerint az FGFR2 gén egy 3' UTR-ben található SNP-je szignifikánsan magasabb arányban fordul elő a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegekben, mint az egészséges egyéneknél. A heterozigóták aránya a beteg körében 53,66%, míg a kontrollok között 45,12% volt, a mutáns allél homozigóta formában a betegek 23,17%-a, míg az egészségesek 13,42%-a hordozta. Mivel egyszerre öt SNP vizsgálatát végeztük el ebben a tanulmányban, a Bonferroni korrekciót is alkalmaztuk, amely szerint a genotípusok megoszlása a kontroll és a betegpopuláció között a továbbiakra is szignifikánsnak bizonyult.

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

Egy ausztrál munkacsoport eredményei szerint a TNF- α gén -308 pozícióban levő polimorfizmusa (G/A SNP) a vénás eredetű lábszárfekélyre hajlamosító faktor. Mivel a TNF- α -308 A alléljét számos egyéb multifaktoriális kórképben szerepet játszik, többek között az inzulin rezisztencia és az obezitás kialakulásával is kapcsolatba hozták^{62,63}, feltételeztük, hogy a Wallace és munkatársai által a TNF- α -308 A allél és a lábszárfekélyre való hajlam között feltárt összefüggés nem közvetlen, hanem a polimorfizmus elsődlegesen obezitásra hajlamosít, és ezen keresztül fejt ki a hatását a vénás eredetű lábszárfekély kialakulására. Az ausztrál munkacsoport azonban közleményében nem tett arról említést, hogy a vizsgálatukba bevont lábszárfekélyes betegek körében mennyi volt az elhízottak aránya.

Megvizsgáltuk a TNF- α -308 A allél eloszlását a testsúly szerint sztratifikált egészséges és vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek körében. A TNF- α -308 A allél eloszlása nem mutatott szignifikáns különbséget, ha a normál testsúlyú (BMI < 25 kg/m²) kontroll egyének és normál testsúlyú vénás lábszárfekélyben szenvedők (n=110) csoportjait hasonlítottuk össze. Ugyanakkor a -308 TNF- α SNP mutáns allél frekvenciája szignifikáns eltérést mutatott, ha az obez vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek és a normál testsúlyú kontroll egyének között végeztük el az összehasonlítást. Elemzéseinket természetesen elvégeztük oly módon is, hogy nem vettük figyelembe a betegek és a kontrollok testtömeg indexét: ily módon összevetve a TNF- α -308 A allél eloszlását a lábszárfekélyes betegek és a kontroll egyének csoportjai között nem találtunk szignifikáns eltérést. Ha viszont a lábszárfekély betegség meglétét hagytuk figyelmen kívül, és a TNF- α -308 A allél megoszlását az obez (BMI > 25 kg/m²) és normál testsúlyú (BMI < 25 kg/m²) egyének között vizsgáltuk, azt kaptuk, hogy a mutáns allél gyakorisága szignifikánsan magasabb az obez körében, mint a normál testsúlyúakéban.

4.3. A PRINS nem-kódoló RNS azonosítása, szerepe a sejtek stressz válaszában és a pikkelysömör pathogenezisében

Munkánk célja az volt, hogy nagyskálájú génexpressziós vizsgálatokkal olyan transzkripciós szintű változásokat azonosítsunk a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz és az egészséges epidermisz között, amelyek szerepet játszanak a pikkelysömörös nem léziós keratinociták inherensen felfokozott érzékenységeinek kialakításában, így a pikkelysömör patogenezisében. Ennek érdekében ún. „differential display” vizsgálatot végeztünk, amelyben két pikkelysömörös tünetmentes és két egészséges epidermisz minta génexpressziós mintázatát hasonlítottuk össze. Számos ismert funkciójú transzkriptumot találtunk, amely eltérő szinten expresszálódott a kétfajta mintában, valamint egy olyan transzkriptumot is (Acc. No. : AK022045), amelynek még nem volt azonosított funkciója.

Ezt követően *in silico* vizsgálatokat végeztünk annak felderítésére, hogy az AK022045 jelű, mindeddig azonosított funkcióval nem rendelkező cDNS milyen fehérjét kódol, ennek eredménye szerint az AK022045 cDNS-ről nem íródik át fehérje. További internetes homológia vizsgálataink eredményei azonban arra irányították figyelmünket, hogy az AK022045 nyilvántartási számú gén által kódolt transzkriptum egy fehérjét nem kódoló, szabályozó RNS gén lehet. A gén szerkezeti vizsgálata alapján a HaCaT sejtekben átíródo teljes hosszúságú cDNS 3.7 kb hosszúságú, benne 2 *Alu* ismétlődő elem, valamint egy olyan szakasz található, amely megközelítőleg 70% hasonlóságot mutat a *Tetrachymena thermophyla* egysejtű hőtoleranciájának kialakításában szerepet játszó szabályozó nem-kódoló RNS génnel ⁶⁴. A teljes hosszúságú transzkriptumot PRINS-nek (Psoriasis Susceptibility-related RNA Gene Induced by Stress) nevezzük a továbbiakban.

A PRINS gén expresszióját Q-RT-PCR vizsgálatokkal is összehasonlítottuk egészséges, pikkelysömörös tünetes és tünetmentes epidermisz mintákban. A pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben a PRINS gén expressziója szignifikánsan magasabb, mint az egészséges epidermiszben, és magasabb a tünetes epidermiszben tapasztalható értéknél is. Mindent összevetve, adataink arra utalnak, hogy a PRINS gén valószínűleg a pikkelysömörre való hajlam kialakításának egyik tényezője, és nem a pikkelysömörös tünetek kialakulásában részt vevő faktor.

Ezt a feltételezésünket támasztotta alá az organotipikus bőrmintákon elvégzett kísérletünk is, melyben egészséges és pikkelysömörös tünetmentes bőrmintákat kezeltünk azokkal a T-sejt citokinekkal (1 ng/ml IFN- γ , ill. 1 ng/ml IFN- γ , 1 ng/ml GM-CSF és 0,3 ng/ml IL-3 keveréke), amelyek ismertek fontos szerepet játszanak a pikkelysömörös tünetek kialakulásában, és korábbi eredményeink ⁶⁵ szerint a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszből szeparált *ex vivo* keratinocitákat hiperproliferációra serkentik. Q-RT-PCR kísérleteink eredményei szerint az egészséges epidermiszben a T-sejt citokinekkal való indukció nem változtatta meg jelentősen a PRINS gén expresszióját, ezzel szemben a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben ötödére csökkentette a PRINS transzkriptum abundanciáját. Ez az eredmény jó egyezést mutat korábbi összehasonlító vizsgálataink eredményével, amelyben a PRINS gén expressziója alacsonyabbnak bizonyult a pikkelysömörös tünetes epidermiszben, mint a tünetmentes epidermiszben.

A PRINS gén expresszióját megvizsgáltuk 16 különböző humán szervben és szövetben is. Eredményeink szerint a gén az összes vizsgált humán szövettípusban kifejeződik, a legalacsonyabb szinten a szívizom, a legmagasabb szinten pedig a véna expresszálja a PRINS gént. Az epidermiszben, amelyben a PRINS transzkriptum elsődleges azonosítása történt, meglehetősen alacsony a gén expressziója a többi vizsgált szövethez viszonyítva. Eredményünk arra utal, hogy a PRINS génről átíródo nem-kódoló, szabályozó RNS feltehetően általános regulátorként működik a humán sejtekben és szövetekben, expressziójának mértéke azonban szövetspecifikus kontroll alatt áll.

A PRINS gén funkcióinak kiderítésére *in vitro* vizsgálatokat végeztünk HaCaT sejteken. Megállapítottuk, hogy a gén RNS-sé történő átírását feltehetően az RNS polimeráz II végzi. A PRINS gén expresszióját szinkronizált HaCaT sejtekben is tanulmányoztuk és eredményeink szerint legmagasabb szinten a sejtnyugalmi fázisban lévő, differenciált HaCaT keratinocitákban van jelen, majd szintje erősen lecsökken, amikor a keratinociták elkezdene osztozni. Ez a kísérletünk arra utalt, hogy a PRINS expressziója erősen stressz indukált, valamint nagyon jó egyezést mutatott a pikkelysömörben kapott eredményeinkkel, miszerint a gén expressziója magas a tünetmentes epidermiszben, de amikor a keratinociták a tünetes epidermiszben hiperproliferálnak, a PRINS expressziója lecsökken. Kimutattuk azt is, hogy a PRINS gén expresszióját egyéb stresszhatások, úgy mint UV-B besugárzás, vírus infekció, transzlációgátlás is indukálja.

HaCaT keratinocitákkal végzett *in vitro* kísérleteink eredményei mind arra utaltak, hogy a PRINS nem kódoló RNS gén expresszióját különböző stresszfaktorok nagymértékben indukálják. Felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon a PRINS RNS szerepet játszik-e a sejtek stresszválaszának kialakításában. Ennek eldöntésére funkcionális vizsgálatokat végeztünk, melyekben egy vektor alapú RNS csendesítési módszerrel csökkentettük a PRINS RNS mennyiségét HaCaT sejtekben, majd azt vizsgáltuk, hogy mindez hatással van-e a sejtek stresszválaszára. Eredményeink szerint a normál körülmények között (10% FCS) tenyésztett HaCaT keratinocitákban a PRINS gén expressziójának csendesítése nem volt hatással a sejtek viabilitására, ellenben a szérummentes (0% FCS) táptalajban tartott HaCaT keratinocitákban a PRINS gén expressziójának csendesítése a sejtek viabilitásának szignifikáns csökkenését okozta. Ezzel a kísérlettel bizonyítottuk, hogy a PRINS gén stressz körülmények között megfigyelhető expresszió növekedése nem csupán kísérő jelensége a sejtek stresszválaszának, hanem a PRINS nem kódoló RNS szerepet játszik a keratinociták stresszválaszának kialakításában.

5. Megbeszélés

5.1. A keratinocita proliferáció szabályozásának vizsgálata multifaktoriális bőrbetegségekben

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

Ily módon került sor a szinkronizált HaCaT sejtek *in vitro* kultúrájának kidolgozására, amelynek első molekuláris jellemzését az $\alpha 5$ integrin, a D1 ciklin, valamint a K1 és K10 molekulák expressziós mintázatának feltérképezésével végeztük el. Eredményeink szerint az $\alpha 5$ integrin és a ciklin D1 molekulák expressziója egyértelműen a sejtek aktív proliferációs állapotához voltak köthetők. A K1 és K10 gének expressziója nagymértékben lecsökkent, ahogy a sejtek proliferálni kezdtek (tehát új fehérjék szintézisére feltehetően már nem került sor), de az igen hosszú félféletidejű K1 és K10 fehérjék jelenléte az aktívan proliferáló HaCaT sejtekben is megfigyelhető volt. Irodalmi adatok utalnak rá, hogy a keratin molekulák nem csupán mechanikai szerepet töltenek be a keratinocitákban, hanem szabályozó funkciójuk is van⁶⁶, mivel az ektópiásan expresszált K10 fehérje a HaCaT sejtek proliferációját gátolja. Feltételezzük, hogy olyan poszttranszlációs módosítások történnek a lassan lebomló, reziduális K10 fehérjén, hogy ezt a szabályozó funkcióját már nem tudja betölteni a sejtekben.

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

A kísérleti rendszer bevezetését követően első vizsgálataink arra irányultak, hogy a szérum faktorok és az etilalkohol ill. az aceton keratinocita proliferációra gyakorolt hatásait vizsgáljuk. Kísérleteink adatai szerint a szérum faktorok HaCaT keratinocitákban indukáló hatással vannak a proliferáló sejtekre jellemző $\alpha 5$ integrin gén expressziójára és gátló hatással a differenciálódó keratinocitákat markerező K1 gén kifejeződésére. Ismert, hogy a normál sebgyógyulás folyamán a keratinociták direkt kapcsolatba kerülnek szérum faktorokkal, és ez indukálja a keratinociták proliferációját, például a szérum egyik komponense, a fibronectin az $\alpha 5$ integrin ligandja és indukáló hatással van annak expressziójára⁶⁷⁻⁶⁹. A tünetes és a tünetmentes pikkelysömörös bőr bazális membránjára jellemző strukturális abnormalitásokat olyan „mikro sebekként” is értelmezhetjük, amelyek lehetővé teszik a dermisz felől szérum faktorok beszűrődését az epidermiszbe és ott direkt módon is befolyásolhatják a keratinociták proliferációját. Ugyanezt a gondolatmenetet követve értelmezhetjük azt az eredményünket is, hogy az etanolnak és az acetonnak direkt proliferációt serkentő hatása van a keratinocitákra és ennek szerepe lehet a pikkelysömör pathogenezésében. Ismert tény, hogy az aceton az alkoholisták vérében magasabb koncentrációban van jelen, mint a nem italozó egyének vérében és hogy a vér aceton koncentrációja jó indikátora az alkoholfogyasztásnak. *In vitro* kísérleteink eredményei tehát hozzájárultak annak a klinikai megfigyelésnek az értelmezéséhez, miszerint a fokozott alkoholfogyasztás a pikkelysömörös betegek tüneteinek romlását eredményezi.

Egy másik kísérletsorozatunkkal a pikkelysömörös tünetmentes bőrben megfigyelhető abnormális extracelluláris mátrix egyik komponensét, az EDA motívumot hordozó fibronectin izoformát elemeztük részletesen. *In vitro* kísérleteinket HaCaT sejtekkel végeztük, és eredményeink arra utalnak, hogy a HaCaT sejtek immortalizált sajátágaikhoz hozzájárul az a tény, hogy a normál humán keratinocitákhoz viszonyítva ezek a sejtek jóval nagyobb mennyiségű fibronectint termelnek és az EDA⁺ fibroektin aránya ezen belül jóval magasabb. A sejtek által termelt és az extracelluláris térbe kibocsátott EDA⁺ fibronectin hozzákötődik receptorához, az $\alpha 5$ integrinhez, ily módon stabilizálja azt, és hozzájárul annak magasabb szintű membrán expressziójához⁷⁰. Feltételezzük, hogy a fent leírt folyamat hozzájárul ahhoz a

pikkelysömörben megfigyelhető jelenséghez, miszerint a tünetmentes bőrben magasabb az $\alpha 5$ integrin fehérje expressziója, anélkül, hogy az $\alpha 5$ integrin mRNS szintje magasabb lenne. Az eredmények arra utalnak, hogy a megnövekedett $\alpha 5$ integrin szintért nem transzkripció szintű indukció a felelős, hanem az EDA⁺ fibroektin által kiváltott receptor stabilitás növekedés. Eredményeink szerint maguk a keratinociták a forrásai az EDA⁺ fibroektinnek, tehát feltehetően egy autokrin stimuláló folyamat eredménye a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták magasabb $\alpha 5$ integrin fehérje expressziója, és ennek következtében a keratinociták fokozott proliferációs válaszkészsége a külső stimulusokra.

Annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy vajon milyen molekuláris folyamatok állnak a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták EDA⁺ fibronektin termelése mögött, további vizsgálatokat igényel. Irodalmi adatokból azonban tudjuk, hogy a transzformáló növekedési faktor béta 1 és 2 (TGF- $\beta 1$ és TGF- $\beta 2$) megemelik az EDA⁺/EDA⁻ fibronektin izoforma arányt sertés trabekuláris sejtekben⁷¹. Ismert az is, hogy pikkelysömörben mind a TGF- β család tagjai, mind receptoraik magasabb szinten fejeződnek ki^{72,73}, feltételezzük tehát, hogy hozzájárulnak a pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban elsőként általunk kimutatott emelkedett EDA⁺ fibronektin expresszióhoz.

További, a pikkelysömör pathogeneziséhez feltehetően hozzájáruló keratinocita rendellenességre mutattak rá azok a vizsgálataink is, amelyekben az FGFR2-IIIb receptor molekula keratinocita proliferáció szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltuk. *In vitro* kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy az FGFR2-IIIb magas szintű expressziója a keratinociták aktív proliferációs állapotához kötött. Ezekkel a kísérletekkel az volt a célunk, hogy egy, az irodalomban évek óta fennálló ellentmondást oldjunk fel, miszerint az FGFR2-IIIb expressziójának indukciója a keratinocita differenciáció⁷⁴⁻⁷⁶, vagy az aktív proliferáció^{47,77} során következik be. Kísérleteink eredményei egyértelműen arra utalnak, hogy az FGFR2-IIIb expressziójának indukciója a keratinociták proliferatív aktivációjához kapcsolható, és nem a K10 expresszióval jellemzett differenciációs programhoz.

Az irodalomban mindeztidáig csak olyan adatok jelentek meg az FGFR2-IIIb pikkelysömörben történő vizsgálatáról, ahol a szerzők a pikkelysömörös tünetes és tünetmentes bőrt vetették össze. Az FGFR2-IIIb mRNS expresszióját elsőként a mi munkacsoportunk hasonlította össze egészséges, pikkelysömörös tünetes és tünetmentes epidermiszben. Eredményeink szerint nem csupán a hiperproliferáló tünetes epidermiszben, hanem a tünetmentes epidermiszben is magasabb az FGFR2-IIIb mRNS expressziója. Feltételezzük, hogy ez a tény is hozzájárulhat a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz keratinocitáinak munkacsoportunk által is demonstrált⁷⁸ pre-aktivált állapotához, amely aztán a T sejt limfokin indukció során tapasztalható fokozott proliferatív válaszkészségben mutatkozik meg. Kísérleteink azonban nem csupán az FGFR2-IIIb pikkelysömörben tapasztalható expressziós vizsgálatát célozták, hanem a betegség gyógyításában használt dithranol hatásmechanizmusát is szerettük volna mélyebben megvizsgálni. Eredményeink szerint a dithranol, mely az eddig elfogadott nézetek szerint közvetlenül a pikkelysömörös keratinociták hiperproliferációját gátolja, és ez úton fejt ki hatását, az FGFR2-IIIb mRNS és fehérje expresszióját is gátolja. Elsőként szolgáltatunk adatot arra nézve, hogy az FGFR2-IIIb is azon növekedési faktor receptorok között van, úgy mint az epidermális növekedési faktor receptorok⁷⁹, interleukin-8 receptor⁸⁰, amelyek expressziójára a dithranol gátolja. A tény, miszerint a dithranol hatására kialakuló keratinocita proliferáció gátlás az FGFR2-IIIb expressziójának csökkenésével jár együtt, tovább erősíti azt a megállapításunkat, hogy a receptor magas szintű expressziója az aktívan proliferáló, nem pedig a differenciálódó keratinociták sajátsga.

A D típusú ciklinek a sejtciklus G₁ fázisának kulcsfontosságú szabályozói. Számos irodalmi adat utal rá, hogy a D ciklinek specifikus funkciókkal bírnak, miszerint a D1 ciklin a őssejt kompartmentből való kilépés fázisában játszik szerepet⁵¹, míg a D3 ciklin nagymértékű felhalmozódását a posztreplicatív, differenciálódó keratinocitákban találták a legmagasabb szintűnek⁵⁰. Munkacsoportunk D ciklinekkel kapcsolatos korábbi adatait tenyésztett normál keratinociták tanulmányozása során szerezte, áramlásos citometriai vizsgálatokkal⁴⁹. Ezek szerint a G₀ sejtnyugalmi fázisban lévő K1/K10- normál keratinociták a D1 ciklint fejezik ki elsőként, amikor az első sejtciklusba belépnek, majd a D1 ciklin expressziója lecsökken és a D2 ciklin kifejeződése válik detektálhatóvá. A normál humán tenyésztett keratinocitákon kapott adatokat nagymértékben megerősítették a szinkronizált HaCaT keratinociták tanulmányozása során kapott eredményeink. Ezek szerint egyértelműen kijelenthetjük, hogy a D típusú ciklinek funkciója keratinocitákban nem redundáns, hanem diszkrét funkciókkal bírnak: a D1 ciklin a G₀ sejtnyugalmi fázisból való kilépés egyik szabályozó faktora, míg a D2 és D3 ciklinek a gyors egymást követő osztódásokon áteső sejtekben töltenek be szabályozó szerepet. D ciklinekkel kapcsolatos kísérleteink

eredményei azt is megerősítették, hogy a szinkronizált HaCaT sejtek milyen érzékeny és jól használható modell rendszert nyújtanak a keratinocita proliferáció és differenciáció tanulmányozásához, hiszen 12 órás különbséggel bekövetkező gén-és fehérje expressziós különbségeket is rendkívül megbízhatóan tudunk vele kimutatni.

Ismert, hogy az keratinocita integrinek, hasonlóan más sejt típusokhoz, fontos szabályozó szerepet töltenek be az epidermisz homeosztázisának fenntartásában. Az extracelluláris mátrix egyik fontos komponense a celluláris fibronektin, melynek receptora a keratinocitákon az $\alpha 5$ integrin. Munkacsoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták emelt szinten fejezik ki az $\alpha 5$ integrint⁸¹, valamint hogy maguk a keratinociták a forrásai az EDA⁺ fibronektinnak⁸², melynek jelenlétét a tünetmentes bőrben elsőként Ting és munkatársai írták le⁸³. Vizsgálataink szerint a fibronektin- $\alpha 5$ integrin ligand-receptor indukált jelátviteli folyamatok részt vesznek a D1 ciklin mRNS expressziójának szabályozásában és hozzájárulnak a pikkelysömörben megfigyelhető keratinocita hiperproliferációhoz. Saját eredményeinkkel összhangban az SCC12 jelű laphámkarinoma sejt vonalban az $\alpha 5$ integrin funkciójának GT1b ganglioziddal való gátlása szintén a D1 ciklin expressziójának gátlását eredményezte⁸⁴.

A D ciklinek kifejeződését mind mRNS, mind fehérjeszinten megvizsgáltuk pikkelysömörben. Mivel a pikkelysömörben tapasztalható hiperproliferációért a fiziológiás körülmények között sejt nyugalmi fázisban levő K1/K10⁺ $\beta 1$ integrin⁺ keratinociták aktivációja a felelős, arra számítottunk, hogy mind mRNS, mind fehérjeszinten a D1 ciklin emelkedett szintű kifejeződését fogjuk találni a pikkelysömörös tünetes epidermiszben. Ezzel szemben azt találtuk, hogy a tünetes epidermiszben a D1 ciklin mRNS expressziója nem mutat szignifikáns különbséget az egészséges és a tünetmentes pikkelysömörös epidermiszhez viszonyítva, viszont az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei szerint fehérje szinten a D1 ciklin magasabb szinten, és eltérő intracelluláris mintázattal fejeződik ki a tünetes epidermisz keratinocitáiban, mint az egészséges epidermiszben. A gén- és fehérje expressziós szinten tapasztalt ellentmondás magyarázata az lehet, hogy a D típusú ciklinek expressziója nem csupán transzkripció és poszt-transzkripció szabályozás alatt áll, hanem ubiquitin-mediált célzott lebontásuk is fontos szabályozó tényező⁸⁵⁻⁸⁸. A tény, miszerint a tünetes epidermisz bazális és szuprabazális keratinocitái között nagyobb számú D1 ciklin pozitív sejtet figyeltünk meg, anélkül, hogy tünetes epidermisz mRNS szinten magasabban expresszálna volna a D1 ciklint, mint az egészséges epidermisz, arra utal, hogy a pikkelysömörös tünetes keratinocitákban a D1 ciklin lebontása valamilyen módon zavart szenved. Feltételezzük, hogy a lebontási folyamatok zavara miatt fennálló magasabb ciklin D1 fehérje expresszió hozzájárul ahhoz, hogy a K1/K10⁺ $\beta 1$ integrin⁺ aktívan proliferáló bazális keratinociták valamilyen mértékben megtartsák összejt potenciáljukat. Ezt a feltételezésünket erősíti az a Yamamoto és munkatársai⁸⁹ által közölt eredmény is, miszerint a D1 ciklint transzgenikusan kifejező keratinocitákat nem lehet kalciummal differenciáltatni, mert rezisztensek erre a differenciációt indukáló hatásra.

Molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk vénás eredetű lábszárfekélyben is, amely szintén egy zavart keratinocita proliferációval jellemzett multifaktoriális bőrbetegség. Célnk az volt, hogy két olyan receptor molekula, a szindekán-4 és a neurofilin-1, expresszióját tanulmányozzuk, amelyekről ismert, hogy szerepet játszanak a normál sebgyógyulás folyamatában⁵²⁻⁵⁶. Ismert, hogy a keratinociták mindkét molekulát kifejezik⁵⁷⁻⁹⁰. Vizsgálatainkhoz egészséges egyénektől vett bőrmintákat és vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrmintáit használtuk. Ezzel a kísérleti felállással azt szeretnénk volna megállapítani, hogy a két receptor molekulának van-e olyan expressziós eltérése a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrmintáiban, amely a kóros sebgyógyulást predisponálja és így hozzájárul a kórképre való hajlam kialakításához.

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

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

kóros sebgyógyulás kialakulásához. Annak megválaszolása, hogy a dermisz mely sejteinek abnormális szindekán-4 expressziója bír patogenetikai szereppel, további vizsgálatokat igényel. Immunhisztokémiai vizsgálataink azt mutatták, hogy a szindekán-4 a dermisz sejtei közül a fibroblasztokban, a perikapilláris gyulladásos sejtekben, valamint a kapilláris endotélben fejeződött ki. Echtermeyer és munkatársai⁵² eredményei szerint a szindekán-4 hiányos egerekben megfigyelhető kóros sebgyógyulás során abnormális angienezist és gyulladásos folyamatokat találtak, elképzelhető tehát, hogy a vénás lábszárfekélyben szenvedők tünetmentes bőrének dermiszében általunk kimutatott alacsonyabb szintű expressziója hozzájárul ezeknek a folyamatoknak a kóros regulációjához. Ismert azonban az is, hogy a szindekán-4 az FGFR2 ko-receptor^{52,53}, melynek IIIC izoformája kifejeződik a fibroblasztokon⁹¹. Nem zárhatjuk ki tehát annak a lehetőségét sem, hogy a szindekán-4 csökkent expressziója az FGFR2-IIIC-szindekán-4 receptor-ko-receptor által mediált jelátviteli utak működését befolyásolja a dermisz fibroblasztjaiban és ezzel hozzá járul a kóros sebgyógyulás kialakulásához.

5.2. Multifaktoriális bőrbetegségekre hajlamosító polimorfizmusok azonosítása és vizsgálata

A vitiligo egy komplex pigmentációs betegség, melyről ismert, hogy háttérében multigenikus hajlamosító faktorok állnak. A legújabb adatok szerint az MHC génjei, valamint az antigén prezentációban részt vevő fehérjéket kódoló gének polimorfizmusai is szerepet játszanak a betegség kialakításában^{23,92}. Ezek a genomikai adatok nagyon jól alátámasztják a vitiligo autoimmun betegséggént való, régóta fennálló megítélését. Számos adat utal ugyanakkor arra is, hogy immunszabályozás génjein kívül egyéb gének polimorfizmusai is hozzájárulhatnak a betegségre való hajlam kialakításához^{31,93-97}. Mindezidáig azonban csupán egy olyan közlemény látott napvilágot, amely a humán pigmentáció kialakításában szerepet játszó gének (MC1R és ASIP) polimorfizmusainak vitiligo pathogenezisében való szerepét vizsgálta³⁶. A koreai betegek vizsgálata során kapott adatok azonban arra utaltak, hogy egyik gén polimorfizmusai sem járulnak hozzá a vitiligóra való hajlam kialakításához. Mivel ismert, hogy az MC1R polimorfizmusok gyakorisága és a multifaktoriális bőrbetegségekre való hajlamosító szerepe különböző etnikai csoportokban nagy eltéréseket mutat^{37,38}, a koreai munka negatív eredménye ellenére elhatároztuk, hogy a magyar populációban megvizsgáljuk annak lehetőségét, hogy az MC1R gén polimorfizmusai szerepet játszanak-e a vitiligo pathogenezisében. Azt is elemeztük, hogy ugyanezek a polimorfizmusok hogyan vesznek részt a magyar populáció pigmentációjának kialakításában.

Munkánk során kilenc, már eddig is ismert és egy új, mindeddig leírásra nem került MC1R polimorfizmust azonosítottunk a magyar lakosság körében. A tíz polimorfizmus közül az öt leggyakrabban előfordulólt vizsgáltunk abból a szempontból, hogy hogyan vesznek részt a pigmentáció kialakításában ill. a vitiligo pathogenezisében. Adataink jó egyezést mutattak a korábban főleg Nyugat- és Észak-Európában végzett kutatások eredményeivel³⁷, és ugyanazokat a polimorfizmusokat azonosítottuk mi is, mint a korábbi tanulmányok. Érdekes módon azonban a magyar lakosság körében nagyon alacsony allél frekvenciával fordul elő az Asp294His polimorfizmus, amelyet a nyugat- és észak-európai tanulmányok a világos bőrszín kialakításáért felelős egyik legfontosabb allélként tartanak számon⁹⁸. Az általunk elemzett öt polimorfizmus közül egynek az allél frekvenciája tért el szignifikánsan a vizsgált sötét (Fitzpatrick III és IV) és világos (Fitzpatrick I és II) bőrű magyar egyének körében. Az Arg160Trp allél minden bizonnyal szerepet játszik a magyar lakosság körében a világos bőrszín kialakításában. Erről a polimorfizmusról ismert, hogy az általa érintett aminosav az MSHR fehérje második intracelluláris doménjében helyezkedik el, amely az MSHR fehérje által mediált jelátviteli utak, és ezen keresztül a pigmentáció szabályozásában is szerepet játszik⁹⁹⁻¹⁰¹.

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

hanem az általa indukált, a melanin pigment képződést szabályozó melanocita jelátviteli utak megváltoztatása révén vesz részt a betegség pathogenezisében.

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

Egy másik munkánkban a szintén multifaktoriális bőrbetegségnek tekintett malignus melanoma genetikai hátterét tanulmányoztuk. Egy multiplex primer melanomában szenvedő férfibeteg és családjának genetikai analízise során azonosítottunk egy rendkívül ritkán előforduló CDKN2A mutációt. Ezt az igen ritka ivarsejtvonal-beli mutációt mindeztől négy esetben írták le. Elsőként egy olasz pancreas carcinomában szenvedő betegben detektálták⁵⁸, majd egy olasz multiplex primer melanomában megbetegedett páciensnél⁵⁹, ill. egy olasz származású brazil melanomás betegben⁶⁰. Ezek a betegek mindannyian heterozigóta formában hordozták a P48T mutációt. Az említett munkák egyikében sem vizsgálták az egyeses ági rokonok genetikai státusát, ezért ezekben a P48T mutáció és a beteg fenotípus összefüggéséről sem lehetett következtetéseket levonni.

Della Torre és munkatársai⁶¹ egy nagy, melanomára hajlamos családon végzett, kiterjedt genetikai vizsgálata feltárta, hogy a P48T mutáció hordozói nem kizárólag melanomára, hanem más malignus betegségekre is fogékonyabbak. Az ugyanebben az aminosav pozícióban bekövetkező, de eltérő nukleotid csere által okozott P48L mutáció tumoros megbetegedésre hajlamot váltott is ismertette egy svéd munkacsoport¹⁰². A családtagokra is kiterjesztett analízis során kimutatták, hogy ez a mutáció is malignus tumorokra, köztük melanomára, kifejezett hajlamot eredményez. Egy endogám holland közösség vizsgálata során Gruis és kutatócsoportja¹⁰³ a következőt figyelte meg: a CDKN2A gén exon 2-ben bekövetkezett kis delécióját (mely nagy valószínűséggel alapító mutáció) homoizigóta formában hordozó melanomás családtagoknál nem volt klinikailag észlelhető különbség a betegség súlyosságában a heterozigóta hordozókhoz viszonyítva. Mindent egybevetve, a fenti adatok és jelen eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a CDKN2A gén mutációi mind homo-, mind heterozigóta formában erős melanoma predisponáló faktorok, azonban egyéb addicionális genetikai eltérések, mint pl. – melanoma estén – az MC1R gén egyes genetikai variációinak megléte is szükségesek lehetnek a betegség manifestációjához.

A jelenleg ismertetett magyarországi eset arra enged következtetni, hogy a CDKN2A génben létrejött P48T mutáció szorosan összefügg a multiplex primer melanoma kialakulásával. Esetünk támogatja azt az elméletet is, mely szerint a melanomára való hajlam multifaktoriális természetű: az allélok penetranciája nagyban függ környezeti, ill. egyéb genetikai tényezőktől, és földrajzi területenként nagyfokú változatosságot mutat¹⁰⁴. Betegünk heterozigóta mutáns szüleinél (akik jelenleg 65 ill. 71 évesek) máig nem manifestálódott sem atípusos anyajegy szindróma, sem melanoma, sem egyéb malignus betegség, annak ellenére, hogy megőrződéssel foglalkoznak, így egész életükben erős napfény expozíciónak voltak kitéve. A fentiekben kívül esetünk amiatt is ritkaságnak számít, mert a CDKN2A gén mutációt homoizigóta formában csak elvétve detektálják. Ezek az esetek kiemelkedő jelentőségűek, hiszen egy alapvető sejtciklus szabályozó génben bekövetkező változások hatásának vizsgálatát teszik lehetővé a tumor képződésre.

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

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

A vénás eredetű lábszárfekélyre való hajlam genetikai hátterének kutatása során azt találtuk, hogy az FGFR2 gén egy 3'UTR-ben található SNP-je feltehetően szerepet játszik a kórképre való hajlam kialakításában. Az általunk vizsgált, az adatbázisokban rs13581 számon nyilvántartott polimorfizmus a

különböző humán rasszokban nagyon nagy különbségekkel detektálható: az afrikai fekete populációban gyakorlatilag nincs jelen, az ázsiai populációban, Kínában és Japánban, 32 és 21%-os allél frekvenciával fordul elő, míg a kaukázusi populációban rendkívül magas, 42%-os a mutáns allél előfordulási gyakorisága az általános populációban. A mi, magyar populáción végzett tanulmányunk adatai is megerősítették az SNP magas előfordulási gyakoriságát a kaukázusi nagyrszban. Adatainkkal különböző populációgenetikai számításokat is végeztünk, és azt találtuk, hogy az FGFR2 gén általunk vizsgált 3'UTR SNP alléljainak megoszlása megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlyi állapotnak, ami arra utal, hogy ez az SNP nincsen hatással a populációban lezajló természetes szelekcióra.

Egyre több adat utal arra, hogy a gének 3'UTR régiójában található genetikai variációknak szerepe van egyes kórképek kialakításában, oly módon, hogy a génről átíródó elsődleges mRNS transzkriptum stabilitását megváltoztatják, és ezáltal a „végterméknek” tekinthető fehérje mennyiségét megnövelik, vagy csökkentik¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Feltételezzük, hogy az FGFR2 gén 3'UTR régiójában általunk vizsgált, a kontroll és betegcsoportban eltérő allél frekvenciával előforduló SNP is módosíthatja az elsődleges FGFR2 mRNS transzkript stabilitását. Ennek következtében az elsődleges transzkriptról alternatív splicing révén keletkező fehérjetermék(ek), a KGFR és/vagy a BEK mennyisége megváltozik, ami hatással lehet a re-epitelizáció¹² és/vagy a sebgyógyulással asszociált angiogenezis^{109;110} folyamataira. A jövőben expressziós kísérletekkel tervezünk bizonyítani ezeket a feltételezéseinket, amelyek során a különböző genotípusú egyének bőréből származó mintákban hasonlítjuk össze a BEK és a KGFR gének/fehérjék expresszióját.

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

A multifaktoriális betegségek genetikai hajlamosító faktorainak felderítése során nagy jelentősége van annak, hogy a vizsgálatokat minél homogénebb betegcsoportokon végezzük el, illetve, hogy az „eset” és a „kontroll” csoportok magán a vizsgálni kívánt multifaktoriális betegségen kívül minél jobban megfeleltethetők legyenek egymásnak. Egy-egy genetikai faktor multifaktoriális betegségekben játszott szerepének felderítése során nagyon fontos lehet a beteg (és gyakran ezzel együtt a kontroll) csoport ún. sztratifikálása, tehát bizonyos szempontok szerint való alcsoportokra osztása¹¹¹. Erre nagyon jó példa az a vénás eredetű lábszárfekély kutatása során végzett munkánk, melynek során azt vizsgáltuk, hogy a TNF- α -308 A allél milyen módon hajlamosít a kórkép kialakulására. A vizsgálat elvégzésére az sarkallt bennünket, hogy¹¹² egy sztratifikálatlan ausztrál vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegcsoport analízise során azt találták, hogy a TNF- α -308 A allélja genetikai faktorként szerepet játszhat a betegségre való hajlam kialakításában. Mivel ugyanerről a polimorfizmusról az is ismert volt, hogy inzulin rezisztenciára és obesitásra hajlamosít^{62;63}, valamint a klinikai gyakorlatból tudott, hogy a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedők között emelkedett az elhízottak aránya, elhatároztuk, hogy a beteg és a kontroll populációk testtömeg index alapján sztratifikált csoportjaiban megvizsgáljuk a TNF- α -308 A allél gyakoriságát. Eredményeink megerősítették Hoffstedt és Brand^{62;63} adatait, miszerint ez a polimorfizmus részt vesz az obesitásra való hajlam kialakításában. Rámutattunk arra is, hogy a Wallace és munkatársai által felfedezett összefüggés a TNF- α -308 A allél és a vénás eredetű lábszárfekély kialakulása között feltehetően nem közvetlen, hanem másodlagos; az elsődleges összefüggés a polimorfizmus és az obesitás között áll fenn és a TNF- α -308 A polimorfizmus az obesitásra való hajlam kialakításán keresztül játszik szerepet a vénás eredetű lábszárfekély pathogenezisében.

5.3. A PRINS nem-kódoló RNS azonosítása, szerepe a sejtek stressz válaszában és a pikkelysömör pathogenezésében

A kilencvenes évek végén csoportunk egy olyan kutatási programot indított, melynek elsődleges célja a pikkelysömör betegségre hajlamosító, elsősorban keratinociták szintjén jelentkező pathogenetikai faktorer azonosítása volt. Erre a célkitűzésre az sarkallt bennünket, hogy előzetes eredményeink szerint a pikkelysömörös betegeknek már a tünetmentes keratinocitái is mutatnak olyan molekuláris és sejt szintű eltéréseket, amelyek a tünetek kialakulását előidéző immunológiai trigger faktorokkal szemben fokozott érzékenységgel ruházzák fel őket, és szerepet játszanak a pikkelysömörre való hajlam kialakításában⁶⁵. Programunkat egy nagyskalájú gényexpressziós ún. differential display kísérlettel indítottuk, melynek elsődleges célja az volt, hogy olyan transzkripciós szintű különbségeket azonosítsunk az egészséges és pikkelysömörös tünetmentes epidermisz minták között, amelyek szerepet játszhatnak a pikkelysömörre való hajlam kialakításában. Vizsgálataink során jónéhány olyan eltérő expressziójú gént azonosítottunk a két rendszerben, amelyekről átiródo fehérjék funkciója már ismert volt. Az egyik ilyen fehérje az extracelluláris mártix protein, a fibronectin, melynek EDA⁺ onkofótlás formájáról Ting és munkatársai kimutatták (2000), hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrből a dermális-epidermális junction (DEJ) területén kifejeződik, amely kifejeződés nem jellemző az egészséges bőrre. A tény, hogy differential display kísérletünkkel mi is eltérő fibronectin expressziót igazoltunk az egészséges és tünetmentes pikkelysömörös epidermisz között azt bizonyította, hogy az általunk használt kísérleti megközelítés alkalmas volt kérdésünk megválaszolására. További vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy maguk a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták is képesek expresszálni a fibronectint és annak EDA⁺ onkofótlás formáját⁸², így részben forrásai lehetnek a Ting és munkatársai által leírt⁸³ fibronectinnek a DEJ területén.

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

A kilencvenes évek közepétől jelentek meg azok a közlemények^{113;114} amelyek arra hívták fel figyelmünket, hogy a humán genom fehérjéket nem kódoló „junk DNS” szakaszairól számos olyan transzkriptum keletkezik, amely RNS-ként tölt be szabályozó funkciót. Ekkor már ismert volt a PRINS génnel nagyfokú szerkezeti homológiát mutató nem kódoló RNS gén, a BC200 is, amely neuron specifikusan fejeződik ki¹¹⁵, és az emberben és főemlősökben is konzervált struktúrát mutató monomerikus *Alu* retrotranspozíciós elemet hordoz¹¹⁶. A BC200 nem kódoló RNS abnormális expressziója számos nem neuronális eredetű tumoros szövetben is detektálható¹¹⁷; és az 90-es évek végén valamint a 2000-es évek elején végzett intenzív kutatásoknak köszönhetően arra is fény derült, hogy BC200 nem kódoló RNS a dendritek poszt-szinaptikus területén, mint poszttranszkripciós modulátor funkcionál, egyes fehérjék expressziós szintjének szabályozójaként¹¹⁸. A nem kódoló RNS-ek funkciójának megértéséhez elengedhetetlen a hozzájuk kapcsolódó nukleinsavak és/vagy fehérjék azonosítása. A BC200 nem kódoló RNS a legújabb kutatási eredmények szerint a „synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA interacting protein” (SYNCRIP) nevű fehérjével kölcsönhatva részét képezi a citoplazma nagy mRNS transzport granulumjainak és a poszt-szinaptikus fehérje szintézis szabályozásában vesz részt¹¹⁹. A PRINS gén BC200-zal, és más nem kódoló RNS-ekkel, úgy mint a BORG, H19 és PCGEM1¹²⁰⁻¹²² való szerkezeti homológiája azt sugallta, hogy az általunk azonosított gén az úgynevezett mRNS-szerű nem kódoló RNS gének körébe tartozik. Ezekről a génekről ismert, hogy az mRNS molekulákhoz hasonlóan érési folyamatokon (splicing, poliadeniláció) esnek át, de róluk fehérjetermék nem képződik, hanem RNS-ként töltik be sejten belüli szabályozó funkciójukat¹.

Az *Alu* elemeket hordozó, fehérjévé át nem íródó, de a sejtekben stabil RNS-ként detektálható géntermékekről általánosan elfogadott tény, hogy expressziójuk magas szintje akkor figyelhető meg, ha a sejteket valamilyen formában stressz éri¹²³⁻¹²⁶. A PRINS gén esetében ezt a stresszt a HaCaT sejt kultúra kontaktgátlásával, széruméheztetéssel, UV-B besugárzással, víruskezeléssel, ill. direkt transzlációgátlással értük el. Eredményeink szerint bármilyen stresszhatás érte a HaCaT keratinocitákat, azok a PRINS gén expressziójának indukciójával válaszoltak. Eredményeink szerint tehát az *Alu* szekvenciákat hordozó nem

kódoló RNS génekkel nem csupán szerkezeti homológiát mutat a PRINS gén, hanem stresszhatásokra adott expressziós válasza is jó egyezést mutatott ezzel a géncsoporttal.

Ezek a kísérletek egyrészt arra hívták fel a figyelmünket, hogy a PRINS valószínűleg tagja annak az *Alu* szekvenciákat hordozó RNS-ként működő géncsaládnak, amely szerepet játszik a sejtek stresszválaszának kialakításában; másrészt jól értelmezhető az a PRINS génextpressziós különbség is, amelyet a pikkelysömörös tünetmentes és tünetes epidermiszben tapasztaltunk. Számos irodalmi adat^{83,127} és saját kutatási eredményeink^{78,82} is arra hívják fel a figyelmünket, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben az abnormális extracelluláris milió a keratinociták számára stresszt jelent, és feltételezzük, hogy ez is hozzájárul a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták külső indukciókra adott inherens, felfokozott reakciókészségéhez. Amikor azonban a pikkelysömörös tünetek kialakulásához vezető keratinocita hiperproliferáció külső hatásra indukálódik (lásd pikkelysömörös epidermisz és a T-limfocitákkal indukált pikkelysömörös tünetmentes epidermisz), a keratinociták felszabadulnak a stresszhatás alól és a PRINS gén expressziója határozottan csökkenni kezd.

Kísérleti eredményeink alapján feltételezzük, hogy a PRINS gén magasabb szintű kifejeződésének inkább a pikkelysömörre való hajlamlanak, nem pedig magának a pikkelysömörös tünetnek a kialakításában van szerepe. Érdekes megfigyelésünk volt az is, hogy a PRNS gén expressziója igen nagy egyéni különbségeket mutatott, amikor tünetes/tünetmentes pikkelysömörös epidermisz mintákban hasonlítottuk azt össze: bár a minták átlaga azt mutatta, hogy a tünetmentes epidermiszben szignifikánsan magasabb a gén expressziója, két beteg anyagában mégis azt találtuk, hogy a tünetes és a tünetmentes epidermiszben megközelítőleg egyenlő mértékű volt a PRINS expressziója. Feltételezzük, hogy azonosítottunk egy olyan újabb faktort, amelynek nagy egyedi különbségeket mutató kifejeződése a pikkelysömör klinikai heterogenitását tükrözi. Azt sem zárhatjuk ki azonban, hogy a PRINS gén nagy egyéni különbségeket mutató kifejeződése annak köszönhető, hogy valamely még nem azonosított, az expresszióját befolyásoló faktor működése tér el nagymértékben a pikkelysömörös betegek körében. Elképzelhető, hogy a PRINS magasszintű kifejeződése a pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákban az őket körülvevő abnormális extracelluláris környezet hatását tükrözi, de nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy a PRINS nem kódoló RNS valamilyen módon részt vesz a keratinociták proliferációjának/differenciációjának szabályozásában. Erre vonatkozó előzetes adataink szerint a PRINS szabályozza az antiapoptotikus hatású G1P3 gén expresszióját (Szegedi, kézirat elbírálás alatt), valamint hogy a PRINS nem kódoló RNS fizikailag kölcsönhat a nukleofozmin nevű fehérjével (Szegedi, a kézirat előkészítés alatt), melyről a közelmúltban kimutatták¹²⁸, hogy a kromatin tartalmú CCCTC kötő faktorról (CTCF) együttműködve részt vesz a D1 ciklin expressziójának szabályozásában. A ciklin D1 fehérje pikkelysömörben megfigyelhető emelkedett expresszióját munkacsoportunk is részletesen elemezte¹²⁹. Pikkelysömörrel kapcsolatos kutatómunkánk egyik ígéretes aspektusának tartjuk, hogy a betegség pathogenezisét kétfajta, sejtbioológiai és molekuláris biológiai, megközelítésből vizsgáló munkánk eredményei ezen a ponton feltételezhetően találkozni fognak. A PRINS-nukleofozmin komplex keratinociták D1 ciklin expressziójában és sejtciklus szabályozásban betöltött szerepének tisztázására további kísérleteket fogunk végezni a közeljövőben.

A PRINS nem kódoló RNS-t saját kísérleteink során humán epidermiszben azonosítottuk, valamint elsődleges jellemzését is egy immortalizált keratinocita sejtvonalon végeztük el. Természetesen kíváncsiak voltunk arra is, hogy a PRINS nem kódoló RNS expressziója csak a bőrre korlátozódik-e vagy egyéb humán szövetekben és szövetekben is kifejeződik. Eredményeink szerint a PRINS gén az általunk tanulmányozott összes humán szervben és szövetben kifejeződik, tehát ellentétben a szoros neuron specifikus kifejeződést mutató BC200 nem-kódoló RNS génnel, a PRINS nem kódoló RNS gén feltehetően a sejtek általános stresszválaszának kialakításában szerepet játszó szabályozó RNS. Az a tény azonban, hogy a különböző szövet típusok között a PRINS gén expressziója nagymértékű eltérést mutat, arra utal, hogy kifejeződése nem konstitutív, hanem szerv- és szövet-specifikusan szabályozott. További kutatások tárgyát képezi annak a kiderítése, hogy a PRINS nem kódoló RNS gén szövet-specifikus expressziójának szabályozásáért milyen faktorok felelősek. Eredményeink szerint a legmagasabb szintű PRINS RNS expresszió a vénákban megfigyelhető meg. Ismert, hogy a pikkelysömörös tünetes bőrben a dermisz mikrovaskulaturája megváltozik^{130,131} és hogy ezek a változások már a tünetek kialakulásának kezdő fázisában megfigyelhetők¹³⁰. A vénákban mért magas PRINS RNS expresszió azt sugallja, hogy feltehetően az endotél sejtekben is kifejeződik a gén, ahol az angienezishez kapcsolódó folyamatok szabályozásában vehet részt.

A fehérjévé át nem íródó, szabályozó funkciójukat RNS-ként betöltő génekkel kapcsolatos kutatások az elmúlt néhány év nagy figyelmet keltő területévé váltak: 2002-ben a Science magazin az év első számú,

nagy áttöréseként értékelte az ezzel kapcsolatos vizsgálatok eredményeit¹³². Az azóta eltelt időben a téma kutatása hihetetlen lendületet kapott, egyre több információval rendelkezünk a nem-kódoló RNS-ek intracelluláris funkcióiról, ill. szerepükről a humán betegségek pathogenezisében¹³³. A nem kódoló RNS-ek nagy családjának tagjai közül a legtöbb információval az ún. mikroRNS-ekről rendelkezünk^{134;135}, de az ún. mRNS-szerű nem kódoló RNS-ekről is, mely csoportba a PRINS RNS is tartozik, egyre többet tudunk¹.

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

6. Összefoglalás

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

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

- Megállapítottuk, hogy a szérumfaktorok, amelyek feltehetően a pikkelysömörös tünetes bőrben bazális membránjának folytonossági hiányain keresztül jutnak az epidermiszbe, a keratinociták K1 differenciációs markerének expresszióját csökkenti, míg a proliferációs marker $\alpha 5$ integrin kifejeződését serkenti.
- Kimutattuk, hogy az etilalkohol és az aceton indukálja a proliferációs markergének ($\alpha 5$ integrin, D1 ciklin és KGFR) expresszióját és a keratinociták proliferációját. Feltételezzük, hogy ezek az anyagok szintén átjutnak a pikkelysömörös bőr bazális membránján és ott aktiválják az epidermális keratinocitákat. Ez is magyarázata lehet annak a klinikai megfigyelésnek, miszerint a nagymértékű alkoholfogyasztás a pikkelysömörös betegek tüneteinek romlásához vezet.
- Kimutattuk, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz aktivált keratinocitái kifejezik a fibronektin EDA motívumot hordozó izoformáját, melyről ismert, hogy receptorához, az $\alpha 5$ integrinhez kötődve annak nagyobb stabilitást biztosít. Feltételezzük, hogy ez az autokrin szabályozási rendszer áll a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz keratinocitáinak magasabb szintű $\alpha 5$ integrin expressziója mögött, amely aztán hozzájárul ezen keratinociták citokin indukcióra mutatott emelkedett proliferatív válaszkészségéhez.
- A keratinocita proliferációs/differenciációs modellrendszer segítségével kimutattuk, hogy az FGFR2-IIIb receptor magas szintű kifejezése a proliferáló keratinociták sajátosága. Ez a receptor molekula a keratinociták felszínén fejeződik ki és a fibroblasztok által termelt fibroblaszt növekedési faktorok receptora. Az FGFR2-IIIb mRNS mind a tünetmentes, mind a tünetes pikkelysömörös epidermiszben magasabb szinten fejeződik ki, mint az egészséges epidermiszben, feltételezzük tehát, hogy ez a receptor molekula is szerepet játszik a pikkelysömör pathomechanizmusában.
- Kimutattuk, hogy a D típusú ciklinek a sejtciklus különböző szakaszaiban töltenek be szabályozó szerepet, és hogy a ciklin D1 fehérje magasabb szinten és eltérő intracelluláris mintázattal fejeződik ki a tünetes epidermisz keratinocitáiban, mint az egészséges epidermiszben. Vizsgálataink szerint a fibronektin- $\alpha 5$ integrin ligand-receptor indukált jelátviteli folyamatok részt vesznek a D1 ciklin mRNS expressziójának szabályozásában, és hozzájárulnak a pikkelysömörben megfigyelhető keratinocita hiperproliferációhoz.
- Egy génexpressziós vizsgálat során azonosítottunk egy mRNS-szerű nem kódoló RNS-t, PRINS-t, amely adataink szerint részt vesz a sejtek stresszválaszának és a pikkelysömörre való hajlam kialakításában. Előzetes eredményeink szerint a PRINS nem kódoló RNS szabályozza az anti-apoptotikus hatású G1P3 gén expresszióját, valamint a sejten belül fizikailag kölcsönhat a nukleofoszin fehérjével. Egy közelmúltban megjelent közlemény szerint a nukleofoszin szerepet játszik a D1 ciklin expressziójának szabályozásában. A komplex keratinocitákban betöltött szerepét a közeljövőben tervezzük vizsgálni.

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

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

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

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

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

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

7. Az eredmények gyakorlati hasznosításának lehetősége

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

Munkánk egyik „célbetegsége” a pikkelysömör, amelyet joggal nevezhetünk az egyik legnagyobb gyakorisággal előforduló immunmediált multifaktoriális bőrgyógyászati kórképnek. A legkorszerűbb gyógyszerek, a biológiai szerek jelenleg folyó is fejlesztése azokon a 80-90-es években született kutatási eredményeken alapul, amelyek a tünetek kiváltásában szerepet játszó, immun mediáló hatással rendelkező molekulákat célozzák. Mi munkánk során elsősorban nem azokra a folyamatokra összpontosítottunk, amelyek a tünetek kialakulása és fennállása közben jellemzik a pikkelysömörös bőrt, hanem azokat a molekuláris történéseket szeretnénk felfedni, amelyek a makroszkóposan egészségesnek látszó, de számos általunk és mások által szolgáltatott adat szerint molekuláris és sejt- szinten már kóros folyamatokat mutató tünetmentes pikkelysömörös epidermiszben zajlanak. Meggyőződésünk, hogy ezeknek a sejt- és molekuláris szintű eltéréseknek az ismerete olyan pre-szimptomatikus terápiás eljárások kidolgozásához vezet, amelyek a pikkelysömörös keratinociták proliferációs ingerekre adott fokozott válasz-készségét módosítják. Ebből a szempontból talán a legígéretesebb eredményünk annak felismerése, hogy egy autokrin szabályozási rendszerrel, az EDA⁺ fibronektin termelésével, majd annak $\alpha 5$ integrinhez való visszacsatolásával feltehetően maguk a pikkelysömörös tünetmentes keratinociták is felelősek saját maguk fokozott proliferatív válasz-képességének kialakításáért és fenntartásáért. Egy közelmúltban megjelent közlemény szerint az EDA⁺ fibronektin specifikus ellenanyaggal történő blokkolása terápiás eljárás lehet tumoros betegségek gyógyításában¹³⁶. Ennek analógiájára elképzelhető, hogy a pikkelysömör betegségben is terápiás célpont lehet ez a fibronektin izoforma.

A vénás eredetű lábszárfekélyben végzett kutatásaink eredményei szintén hasznosulhatnak terápiás fejlesztésekben. A rekombináns KGF-2-et (repifermin) már klinikai kísérletekben is kipróbálták krónikus sebek terápiájára, és gyorsabb sebzárást tapasztaltak^{137,138}. A KGF ligand/KGFR receptor rendszer tehát ígéretes terápiás célpont a krónikus sebek kezelésében. Ugyanez elmondható szindekán-4 heparán szulfát proteoglikánról is, amely eredményeink szerint a vénás eredetű lábszárfekélyben szenvedő betegek tünetmentes bőrének dermiszében alacsonyabb szinten fejeződik ki, és feltehetően hozzájárul a betegség pathogeneziséhez. Egy közelmúltban megjelent közlemény szerint ultrahang kezeléssel a szindekán-4 mediált Rac1 és RhoA jelátviteli folyamatok aktiválhatók és a szöveti regeneráció folyamatai ezzel felgyorsíthatók¹³⁹.

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

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

8. A dolgozat elkészítéséhez felhasznált közlemények:

1. Pivarcsi A, **Szell M**, Kemény L, Dobozy A, Bata-Csörgő Zs: Serum factors regulate the expression of the proliferation related genes $\alpha 5$ integrin and keratin 1 but not keratin 10 in HaCaT keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 293: 206-213, 2001 **IF: 1.425**
2. Farkas A, **Szell M**, Bata-Csörgő Zs, Kemény L, Dobozy A: Ethanol and acetone stimulate the proliferation of HaCaT cells. *Arch. Dermatol. Res.* 295 :56-62, 2003 **IF: 1.415**
3. **Szell M**, Bata-Csörgő Zs, , Koreck A, Pivarcsi A, Polyánka H, Szeg Cs, Gaál M, Kemény L, Dobozy A: Proliferating keratinocytes are putative sources of the psoriasis susceptibility related EDA+ oncofoetal fibronectin. *J. Invest. Dermatol.* 123:537-46, 2004 **IF: 4.238**
4. Bata Zs, Farkas Á, Garaczi E, Gyulai R, Kemény L, Kenderessy Szabó A, Koreck I, **Szell M**: A pikkelysömör betegség: gyógyítás és kutatómunka a Szegedi Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán Dobozy Attila Professzor úr tanszékvezetése alatt. *Bőrgyógy. Vener. Szle.* 80: 251-254, 2004
5. **Szell M**, Sonkoly E, Bata-Csörgő Zs, Pivarcsi A, Polyánka H, Kenderessy Szabó A, Szentpáli K, Molnár G, Kemény L: PRINS: egy új nem kódoló RNS gén azonosítása, expressziójának vizsgálata pikkelysömörben, valamint különböző humán szervekben és szövetekben. *Bőrgyógy. Vener. Szle.* 80: 255-260, 2004
6. Nagy N, , Szolnoky Gy, Szabad G, Dobozy A, Kemény L, **Szell M**: Examination of Single Nucleotide Polymorphisms of the Fibroblast Growth Factor Receptor 2 gene in patients with leg ulcer. *J. Invest. Dermatol.* 124: 1085-88, 2005 **IF: 4.406**
7. Sonkoly E, Bata-Csörgő Zs, Pivarcsi A, Polyánka H, Kenderessy-Szabó A, Molnár G, Szentpáli K, Megyeri K, Mándi Y, Dobozy A, Kemény L, **Szell M**. Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS. *J. Biol. Chem.* 280: 24159-67, 2005 **IF: 5.854**
8. **Szell M**, Bata-Csörgő Zs, Sonkoly E, Dobozy A, Kemény L: Genomikai kutatások a bőrgyógyászatban. *Magyar Tud.* 166: 688-699, 2005.
9. Nagy N, Bata-Csörgő Zs, Kopasz N, Szeg Cs, Pivarcsi A, Koreck A, Dobozy A, Kemény L, **Szell M**: The expression of keratinocyte growth factor receptor (FGFR2-IIIb) correlates with the high proliferative rate of HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 15: 596-605, 2006 **IF: 2.449**
10. Nagy N, Szolnoky Gy, Szabad G, Bata-Csörgő Zs, Balogh A, Klausz G, Mándi Y, Dobozy A, Kemény L, **Szell M**: Tumor Necrosis Factor- α -308 polymorphism and leg ulceration — possible association with obesity. *J. Invest. Dermatol.* 127: 1768-9, 2007 **IF: 4.829**
11. **Szell M**, Balogh K, Dobozy A, Kemény L, Oláh J: First Detection of the Melanoma-Predisposing Proline-48-Threonine Mutation of p16 in Hungarians – Was There a Common Founder Either in Italy or in Hungary? *Melanoma Res.* 17: 251-4, 2007 **IF: 2.225**
12. Belső N, **Szell M**, Pivarcsi A, Kis K, Kormos B, Kenderessy SzA, Dobozy A, Kemény L, Bata-Csörgő Zs: Differential expression of D-type cyclins in HaCaT keratinocytes and psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 128:634-42, 2008 **IF: 4.829**
13. Nagy N, Szolnoky Gy, Szabad G, Bata-Csörgő Zs, Balogh A, Klausz G, Györgyei J, Mándi Y, Dobozy A, Kemény L, **Szell M**: Genetic background of venous leg ulcer development. *Hung Med J* 2: 391-405, 2008
14. **Szell M**, Bata-Csörgő Zs, Kemény L: The enigmatic world of mRNA-like ncRNAs: their role in human evolution and in human diseases. *Semin. Cancer Biol.* 18 :141-8, 2008 **IF: 7.51**
15. **Szell M**, Baltás E, Bodai L, Bata-Csörgő Zs, Nagy N, Dallos A, Pourfarzi, R, Simics E, Kondorosi I, Szalai Zs, K. Tóth G, Hunyadi J, Dobozy A, Kemény L: The Arg160Trp allele of melanocortin-1 receptor gene might protect against vitiligo. *Photochem. Photobiol.* 84:565-71, 2008 **IF: 2.172**
16. Nagy N, Németh IB, Szabad G, Szolnoky G, Belső N, Bata-Csörgő Z, Dobozy A, Kemény L, **Szell M**.:The altered expression of syndecan 4 in the uninvolved skin of venous leg ulcer patients may predispose to venous leg ulcer. *Wound Repair. Regen.* 16: 495-502. 2008 **IF: 2.445**

Ezek összesített impact faktora: 43.807

9. A bőr immunfunkcióival kapcsolatos, a dolgozatba be nem épített társszerzős közlemények jegyzéke:

1. Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, **Szell M**, Beer Z, Bata-Csorgo Z, Magocsi M, Rajnavolgyi E, Dobozy A, Kemeny L: Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. Int. Immunol. 15:721-30, 2003 **IF: 3.690**
2. Pivarcsi A, Koreck A, Bodai L, **Szell M**, Szeg C, Belso N, Kenderessy-Szabo A, Bata-Csorgo Z, Dobozy A, Kemeny L: Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. Arch. Dermatol. Res. 296:120-4, 2004 **IF: 1.217**
3. Garaczi E, **Szell M**, Jánossy T, Koreck A, Pivarcsi A, Buzás E, Pos Z, Falus A, Dobozy A, Kemény L: Negative regulatory effect of histamine in DNFB induced contact hypersensitivity. Int. Immunol. 16:1781-1782, 2004 **IF: 3.540**
4. Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, **Szell M.**, Urbán E, Kemény L: Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induces selective human β -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through Toll-like receptors. J. Invest. Dermatol. 124: 931-38, 2005 **IF: 4.406**
5. Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabó A, **Szell M**, Dobozy A, Kemény L. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. Microbes Infect. 7:1117-27, 2005 **IF: 3.154**
6. Koreck A, Kis K, Szegedi K, Panescu V, Cioaca R, Olariu R, Kemény L, Dobozy A, **Szell M**: TLR2 and TLR4 polymorphisms are not associated with acne vulgaris. Dermatology, 213: 267-9, 2006 **IF: 1.854**
7. Szabad G, Kormos B, Pivarcsi A, **Szell M**, Kis K, Kenderessy Sz A, Dobozy A, Bata-Csörgő Zs: Human adult epidermal melanocytes cultured without chemical mitogens express the EGF receptor and respond EGF. Arch. Dermatol. Res. 299: 191-200, 2007 **IF: 1.596**

Ezek összesített impact faktora: 19.457

10. Irodalomjegyzék

1. M. Szell, Z. Bata-Csorgo, L. Kemeny, *Seminars in Cancer Biology* 18, 141-148 (2008).
2. N. Balendran et al., *J.Invest Dermatol* 113, 322-328 (1999).
3. M. Cargill et al., *Am.J.Hum.Genet.* 80, 273-290 (2007).
4. A. Menter et al., *J.Am.Acad.Dermatol* 58, 826-850 (2008).
5. K. Reich et al., *J.Invest Dermatol* 118, 155-163 (2002).
6. K. Asadullah et al., *J.Invest Dermatol* 116, 975-978 (2001).
7. A. M. Bowcock et al., *Hum.Mol.Genet.* 10, 1793-1805 (2001).
8. J. L. Oestreich et al., *Pharmacogenomics.J.* 1, 272-287 (2001).
9. V. Quekenborn-Trinquet et al., *Br.J.Dermatol* 152, 489-504 (2005).
10. M. Kunz, *Semin.Cutan.Med.Surg.* 27, 16-24 (2008).
11. J. E. Park and A. Barbul, *Am.J.Surg.* 187, 11S-16S (2004).
12. N. Maas-Szabowski et al., *J Invest Dermatol.* 116, 816-820 (2001).
13. G. Jebeleanu and L. Procopciuc, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 5, 397-401 (2001).
14. D. Gemmati et al., *Wound.Repair Regen.* 12, 512-517 (2004).
15. S. A. Crist et al., *Exp.Hematol.* 32, 1073-1081 (2004).
16. N. Babbar, A. Hacker, Y. Huang, R. A. Casero, Jr., *J.Biol.Chem.* 281, 24182-24192 (2006).
17. H. J. Wallace and M. C. Stacey, *J.Invest Dermatol* 110, 292-296 (1998).
18. D. A. Norris, T. Horikawa, J. G. Morelli, *Pigment Cell Res.* 7, 193-203 (1994).
19. W. R. van den, A. Wankowicz-Kalinska, S. Pals, J. Weening, P. Das, *Lab Invest* 81, 1061-1067 (2001).
20. K. Ongenaes, N. Van Geel, J. M. Naeyaert, *Pigment Cell Res.* 16, 90-100 (2003).
21. S. Chow, C. Rizzo, L. Ravitskiy, A. A. Sinha, *Autoimmunity* 38, 303-317 (2005).
22. D. Kanduc et al., *Int.J.Oncol.* 21, 165-170 (2002).
23. A. Blomhoff et al., *Pigment Cell Res.* 18, 55-58 (2005).
24. S. Pehlivan et al., *Eur.J.Dermatol* (2009).
25. I. Canton et al., *Genes Immun.* 6, 584-587 (2005).
26. J. Wipff et al., *Ann.Rheum.Dis.* 65, 1230-1232 (2006).
27. N. C. Laddha et al., *J.Dermatol Sci.* 49, 260-262 (2008).
28. G. S. Laberge, S. A. Birlea, P. R. Fain, R. A. Spritz, *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 206-208 (2008).
29. A. Abanmi et al., *Dis.Markers* 24, 51-57 (2008).
30. V. Maresca et al., *J.Invest Dermatol* 109, 310-313 (1997).
31. C. B. Casp, J. X. She, W. T. McCormack, *Pigment Cell Res.* 15, 62-66 (2002).
32. H. H. Park et al., *Exp.Dermatol* 15, 377-380 (2006).
33. S. Em et al., *Pigment Cell Res.* 20, 405-407 (2007).
34. Y. K. Uhm et al., *Life Sci.* 81, 223-227 (2007).
35. C. P. Guan et al., *Exp.Dermatol* 17, 1059-1062 (2008).
36. G. Y. Na et al., *Pigment Cell Res.* 16, 383-387 (2003).
37. R. M. Harding et al., *Am.J.Hum.Genet.* 66, 1351-1361 (2000).
38. A. A. Nelson and H. Tsao, *Clin.Dermatol* 27, 46-52 (2009).
39. L. A. Cannon-Albright et al., *Science.* 258, 1148-1152 (1992).
40. W. M. Howell, S. J. Turner, A. C. Bateman, J. M. Theaker, *Genes Immun.* 2, 25-31 (2001).
41. P. N. Nikolova et al., *Transpl.Immunol.* 18, 344-348 (2008).
42. W. A. High and W. A. Robinson, *Adv.Dermatol* 23, 61-79 (2007).
43. S. Raimondi et al., *Int.J.Cancer* 122, 2753-2760 (2008).
44. P. Boukamp and N. E. Fusenig, *J.Cell Biol.* 120, 981-993 (1993).
45. C. M. Ryle et al., *Differentiation.* 40, 42-54 (1989).
46. G. Pellegrini et al., *J Clin.Invest* 89, 1783-1795 (1992).
47. P. W. Finch, F. Murphy, I. Cardinale, J. G. Krueger, *Am.J.Pathol.* 151, 1619-28. (1997).
48. A. Pivarsci, M. Szell, L. Kemeny, A. Dobozy, Z. Bata-Csorgo, *Arch.Dermatol.Res.* 293, 206-213 (2001).

49. Bata-Csorgo, Z., Cooper, K. D., Kang, B. K., Voorhees, J. J., and Hammerberg, C. Differential expression suggesting differential functions of D-type cyclins in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106, 828. (1996).
50. J. Bartkova, J. Lukas, M. Strauss, J. Bartek, *Oncogene*. 17, 1027-1037 (1998).
51. X. Xu, S. Lyle, Y. Liu, B. Solky, G. Cotsarelis, *Am.J Pathol.* 163, 969-978 (2003).
52. F. Echtermeyer et al., *J Clin.Invest.* 107, R9-R14 (2001).
53. C. Mundhenke, K. Meyer, S. Drew, A. Friedl, *Am.J Pathol.* 160, 185-194 (2002).
54. C. H. Heldin and B. Westermark, *Physiol Rev.* 79, 1283-1316 (1999).
55. S. Takashima et al., *Proc.Natl.Acad Sci.U.S.A.* 99, 3657-3662 (2002).
56. P. Kurschat, D. Bielenberg, M. Rossignol-Tallandier, A. Stahl, M. Klagsbrun, *J Biol.Chem.* 281, 2721-2729 (2006).
57. K. Lundqvist and A. Schmidtchen, *Br.J Dermatol.* 144, 254-259 (2001).
58. P. S. Moore, G. Zamboni, M. Falconi, C. Bassi, A. Scarpa, *Hum.Mutat.* 16, 447-448 (2000).
59. M. Mantelli et al., *Melanoma Res.* 14, 443-448 (2004).
60. J. Huber and E. S. Ramos, *Braz.J Med Biol.Res.* 39, 237-241 (2006).
61. T. G. Della et al., *Br.J.Cancer* 85, 836-844 (2001).
62. J. Hoffstedt et al., *Diabetologia* 43, 117-120 (2000).
63. E. Brand et al., *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 25, 581-585 (2001).
64. P. A. Fung, J. Gaertig, M. A. Gorovsky, R. L. Hallberg, *Science* 268, 1036-1039 (1995).
65. Z. Bata-Csorgo, C. Hammerberg, J. J. Voorhees, K. D. Cooper, *J.Clin.Invest.* 95, 317-327 (1995).
66. J. M. Paramio et al., *Mol.Cell Biol.* 19, 3086-3094 (1999).
67. M. Delcommenne and C. H. Streuli, *J.Biol.Chem.* 270, 26794-26801 (1995).
68. S. Huang, J. Varani, S. Chakrabarty, *J.Cell Physiol.* 161, 470-482 (1994).
69. S. E. LaFlamme, S. K. Akiyama, K. M. Yamada, *J.Cell Biol.* 117, 437-447 (1992).
70. P. Xia and L. A. Culp, *Exp.Cell Res.* 217, 517-527 (1995).
71. J. Li, B. J. Tripathi, R. C. Tripathi, *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 41, 3437-3443 (2000).
72. M. Wataya-Kaneda, K. Hashimoto, M. Kato, K. Miyazono, K. Yoshikawa, *J Dermatol Sci.* 11, 183-188 (1996).
73. T. Leivo, I. Leivo, A. L. Kariniemi, J. Keski-Oja, I. Virtanen, *Br.J Dermatol* 138, 57-62 (1998).
74. C. Marchese, M. Sorice, C. De Stefano, L. Frati, M. R. Torrisi, *Cell Growth Differ.* 8, 989-997 (1997).
75. A. Capone et al., *Cell Growth Differ.* 11, 607-14. (2000).
76. V. Visco et al., *J Cell Physiol* 200, 31-44 (2004).
77. Y. Zhou et al., *Exp.Dermatol.* 5, 138-44. (1996).
78. Z. Bata-Csorgo, C. Hammerberg, J. J. Voorhees, K. D. Cooper, *J.Invest.Dermatol.* 105, 89S-94S (1995).
79. L. Kemeny, G. Michel, P. Arenberger, T. Ruzicka, *Acta Derm.Venereol.* 73, 37-40 (1993).
80. L. Kemeny et al., *Eur.J.Pharmacol.* 258, 269-272 (1994).
81. Z. Bata-Csorgo, K. D. Cooper, K. M. Ting, J. J. Voorhees, C. Hammerberg, *J Clin.Invest* 101, 1509-1518 (1998).
82. M. Szell et al., *J Invest Dermatol* 123, 537-546 (2004).
83. K. M. Ting et al., *J Invest Dermatol* 114, 706-711 (2000).
84. X. Wang et al., *J Biol.Chem.* 276, 8436-8444 (2001).
85. J. A. Diehl, M. Cheng, M. F. Roussel, C. J. Sherr, *Genes Dev.* 12, 3499-3511 (1998).
86. J. H. Chung et al., *Hum. Mol.Genet.* 15, 2553-2559 (2006).
87. H. Okabe et al., *PLoS.ONE.* 1:e128, e128 (2006).
88. W. Yang, Y. Zhang, Y. Li, Z. Wu, D. Zhu, *J Biol.Chem.* 282, 3799-3808 (2007).
89. H. Yamamoto et al., *Cancer Res.* 62, 1641-1647 (2002).
90. M. L. Gagnon et al., *Proc.Natl.Acad Sci.U.S.A.* 97, 2573-2578 (2000).
91. A. P. Baraniak, E. L. Lasda, E. J. Wagner, M. A. Garcia-Blanco, *Mol.Cell Biol.* 23, 9327-9337 (2003).
92. C. B. Casp, J. X. She, W. T. McCormack, *Genes Immun.* 4, 492-499 (2003).
93. S. Y. Jin et al., *Pigment Cell Res.* 17, 84-86 (2004).
94. I. C. Le Poole et al., *Pigment Cell Res.* 14, 475-484 (2001).
95. S. K. Nath et al., *Am.J Hum.Genet.* 69, 1401-1406 (2001).

96. U. Tursen et al., *Arch Dermatol Res.* 294, 143-146 (2002).
97. S. Y. Jin et al., *J Dermatol Sci.* 35, 181-186 (2004).
98. P. Valverde, E. Healy, I. Jackson, J. L. Rees, A. J. Thody, *Nat.Genet.* 11, 328-330 (1995).
99. J. C. Garcia-Borron, B. L. Sanchez-Laorden, C. Jimenez-Cervantes, *Pigment Cell Res.* 18, 393-410 (2005).
100. T. R. Hawn et al., *Proc.Natl.Acad Sci.U.S.A.* 102, 10593-10597 (2005).
101. H. B. Schioth et al., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 260, 488-491 (1999).
102. A. Platz et al., *J Natl.Cancer Inst.* 89, 697-702 (1997).
103. N. A. Gruis et al., *Nat.Genet.* 10, 351-353 (1995).
104. D. T. Bishop et al., *J Natl.Cancer Inst.* 94, 894-903 (2002).
105. R. Di Paola et al., *Am.J.Hum.Genet.* 70, 806-812 (2002).
106. Y. Vasilopoulos et al., *J.Invest Dermatol* 123, 62-66 (2004).
107. J. M. Chen, C. Ferec, D. N. Cooper, *Human Genetics* 120, 301-333 (2006).
108. J. M. Chen, C. Ferec, D. N. Cooper, *Human Genetics* 120, 1-21 (2006).
109. P. Auguste et al., *Cancer Res.* 61, 1717-1726 (2001).
110. S. Shan et al., *FASEB J.* 18, 326-328 (2004).
111. C. I. Amos, *Human Molecular Genetics* 16, R220-R225 (2007).
112. H. J. Wallace, Y. K. Vandongen, M. C. Stacey, *J Invest Dermatol.* 126, 921-925 (2006).
113. M. J. Moore, *Nature* 379, 402-403 (1996).
114. S. R. Eddy, *Curr.Opin.Genet.Dev.* 9, 695-699 (1999).
115. J. A. Martignetti and J. Brosius, *Proc.Natl.Acad Sci.U.S.A* 90, 11563-11567 (1993).
116. J. G. Cheng, H. Tiedge, J. Brosius, *Neurosci.Lett.* 224, 206-210 (1997).
117. W. Chen, W. Bocker, J. Brosius, H. Tiedge, *J Pathol.* 183, 345-351 (1997).
118. S. Kobayashi, A. Takashima, K. Anzai, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 253, 448-453 (1998).
119. K. Duning, F. Buck, A. Barnekow, J. Kremerskothen, *J.Neurochem.* 105, 351-359 (2008).
120. V. Srikanthan et al., *Proc.Natl.Acad Sci.U.S.A* 97, 12216-12221 (2000).
121. K. Takeda et al., *J.Biol.Chem.* 273, 17079-17085 (1998).
122. C. I. Brannan, E. C. Dees, R. S. Ingram, S. M. Tilghman, *Mol.Cell Biol.* 10, 28-36 (1990).
123. W. M. Liu, W. M. Chu, P. V. Choudary, C. W. Schmid, *Nucleic Acids Res.* 23, 1758-1765 (1995).
124. T. Li, J. Spearow, C. M. Rubin, C. W. Schmid, *Gene* 239, 367-372 (1999).
125. T. H. Li and C. W. Schmid, *Gene* 276, 135-141 (2001).
126. C. M. Rubin, R. H. Kimura, C. W. Schmid, *Nucleic Acids Res.* 30, 3253-3261 (2002).
127. R. Fleischmajer et al., *J Invest Dermatol.* 115, 771-777 (2000).
128. H. Liu et al., *J.Exp.Med.* 205, 1843-1858 (2008).
129. N. Belso et al., *J.Invest Dermatol* 128, 634-642 (2008).
130. D. Creamer et al., *Arch.Dermatol* 138, 791-796 (2002).
131. M. Detmar et al., *J.Exp.Med.* 180, 1141-1146 (1994).
132. D. Kennedy, *Science*;298, 2283 (2002).
133. W. Xie, W. T. Brown, R. B. Denman, *Biochem Biophys Res Comm* 373, 462-466 (2008).
134. A. E. Erson and E. M. Petty, *Clin Gen* 74, 296-306 (2008).
135. E. Sonkoly, M. Stahle, A. Pivarcsi, *Clin Exp Dermatol* 33, 312-315 (2008).
136. A. Villa et al., *Int.J.Cancer* 122, 2405-2413 (2008).
137. M. C. Robson et al., *Wound.Repair Regen.* 9, 347-352 (2001).
138. K. A. Radek, K. R. Taylor, R. L. Gallo, *Wound.Repair Regen.* 17, 118-126 (2009).
139. C. M. Mahoney, M. R. Morgan, A. Harrison, M. J. Humphries, M. D. Bass, *J.Biol.Chem.* (2009).