

OTKA zárójelentés
K68401

**BIOKÉMIAI, MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATOK NAPPÉNY OKOZTA
BŐRKÁROSODÁSOKBAN**

Bevezetés, előzmények

Patogenetikai szempontból a bőrt érő egyik legjelentősebb környezeti hatás a napfény ultraibolya sugárzása. Az **ultraibolya fény** (UV) a nap elektromágneses sugárzásának 200-280 nm (UVC), 280-320 nm (UVB), 320-400 nm (UVA) hullámhosszú tartománya. Biológiai effektusa hullámhossz függő. Hatására a nukleinsavak, fehérjék és lipidek egyaránt eltérő mértékben és eltérő módon károsodhatnak. Az UVC-sugárzást az ózon kiszűri, így a földfelszínt ez a sugártartomány már nem éri el. Az UVB fotonok legjelentősebb hatása, hogy a DNS-ben elnyelődve ciklobután pirimidin dimer (CPD), és (6-4)-pirimidin fotoproduktumokat indukálnak. A fototermekeket ép sejtekben a nukleotid exciziós repair (NER) észleli és javítja ki. Az UVA döntően reaktív gyökök keletkezésén keresztül okoz biológiai hatásokat.

A földfelszínre jutó napfény mennyisége és minősége a 70-es évektől kezdve az egészségre kedvezőtlenül módosul, a spektrum egyre inkább a rövidebb hullámhosszak irányába tolódik el (McKenzie *et al.*, 2011). Ez, valamint a jóléti társadalmakban a környezetszennyezés, megváltozott öltözködési mód, a szabadidős foglalkozások, a barna bőrszín divatja nemcsak a természetes UV expozíció fokozódásával jár együtt, hanem a mesterséges barnító szalonok is extra UV terhelést jelentenek (Brouse *et al.*, 2011; Burke and Wei, 2009). Mindezek következtében az UV fény okozta akut és krónikus bőrkárosodások és bőrbetegségek, a photodermatosisok száma egyaránt világszerte megnőtt (Norval *et al.*, 2011; van der Leun *et al.*, 2008). A 90-es évek elejétől munkacsoportunk egyik célja, hogy összefüggéseket keressünk az UV-fény okozta DNS-károsodások, reparációjuk és az apoptosis között, illetve annak megvizsgálása, hogy ezen folyamatoknak milyen szerepe van a fotoszenzitív dermatosisok patomechanizmusában és a foto(kemo)terápiában (Emri *et al.*, 2000; Remenyik *et al.*, 1998 ; Remenyik *et al.*, 1998b; Remenyik *et al.*, 2003; Schoket *et al.*, 1990; Wikonkal *et al.*, 1997). Korábbi pályázatok támogatásával genetikai vizsgálatokat indítottunk különböző porphyriákban (Remenyik *et al.*, 1998a). Személyi dózismérő kifejlesztése mellett a photocarcinogenesis molekuláris mechanizmusai megértéséhez is hozzájárultunk (Kuluncsics *et al.*, 2002).

Jelen pályázatban az eredeti célkitűzéseink mind a négy pontjával: porphyria, phototoxicitás, fotoallergiás polymorph fényexanthéma és bőrdaganat foglalkoztunk, az eredeti elképzeléstől kissé eltérő hangsúllyal. Ennek oka, hogy munkatársak távoztak és újak érkeztek a kutatócsoportba, továbbá saját és irodalmi eredmények módosították kérdésfelvetésünket. Így az utolsó projektévben a DNS reparáció speciális területével, a photolyase enzimmel, és a melanoma lehetséges hisztokémiai prognosztikai faktor keresésével egészültek ki vizsgálataink.

Alkalmazott módszerek:

UV irradiáció, fotoreaktiváció,

Sejttenyésztés : keratinocytá: normál humán epidermális primer (NHEK), HaCaT sejt

Molekuláris módszerek: DNS és RNS izolálás, egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (SSCP), DNS szekvenálás, PCR, kvantitatív valós idejű RT-PCR, mRNS transzfekció, Western blot,

Egyéb: ELISA, életképesség vizsgálat (MMT assay), proliferáció assay (Ez4U), apoptosis assay, comet assay, intracelluláris Ca⁺ mérés,

Immunhisztokémia: immunfluoreszcencia,
Tissue microarray
Statisztika Excel, PC SAS, SPSS 7.5 for Windows, ANOVA

Eredmények

1. PORPHYRIÁK

A porphyriák a hem bioszintézis valamelyik enzimének csökkent működése következtében kialakuló kórképek. A klinikai tünetek oka a hibás enzim szubsztrátjának és egyéb metabolitjainak a felszaporodása a szövetekben. Ha a metabolit porfirinváz szerkezetű, akkor fotoszenzitivitást, bőrtüneteket okoz (Horkay, 2008c; Horkay *et al.*, 2008).

Erythropoeticus protoporphyria (EPP).

Hazánkban a második leggyakoribb porphyria. A **ferrokelatáz** (FECH) (MIM#177000, GeneID# 2235) csökkent aktivitása okozza. Az enzim a hem szintézis utolsó lépését katalizálja, a vasion beépülését a protoporfirin vázba. A bőrtünetek gyermekkorban kezdődnek és az egész élet folyamán végigkísérik a beteget. A betegek kb. 5%-ában akut, súlyos, gyorsan halálhoz vezető obstruktív májelégtelenség fejlődhet ki. Jelen ismereteink szerint nem rendelkezünk olyan paraméterekkel, melyek vizsgálata alapján meg tudnánk jósolni, kik azok az EPP-s betegek, akikben májelégtelenség fog kifejlődni (Horkay, 2008c; Sarkany, 2010).

Folytattuk az EPP-ben korábban elkezdett genetikai vizsgálatokat (Remenyik *et al.*, 1998). A ferrokelatáz 21. kromoszómán található génjének lehetséges mutációit 10 betegünk perifériás véréből szeparált genom DNS PCR-amplifikáció utáni szekvenálással azonosítottuk. A betegekben 5 különböző génelterést észleltünk, melyek közül 2 mutációként az irodalomból ismert volt, 3 újabb **single nucleotide polymorphism** (SNP). Eredményeinkről konferencia absztraktban számoltunk be. (Varga *et al.*, 2007)

Porphyria cutanea tarda (PCT).

A leggyakoribb cutan porphyria, melynek hátterében az uroporfirinogén dekarboxiláz (UROD) (MIM#176100, GeneID#7389) enzim csökkent működése áll. A csökkent enzimaktivitás következtében felszaporodik a porfobilinogén és a poli-karboxil porfirinek. Az enzim aktivitására mind környezeti, mind genetikai faktorok befolyással lehetnek. A klinikai kép és súlyossága a reziduális enzimaktivitástól, a porfirin szintektől függ. Az enyhébb klinikai tünetekkel járó PCT-nek különböző altípusai vannak. Ezek a klinikai képen nem térnek el. A sporadikusan jelentkező formájában (PCT I (OMIM#176090)), környezeti faktorok: alkohol, ösztrogén, vas, vírus okozta májkárosodás felelősek az enzimaktivitás csökkenéséért, ami a májra lokalizálódik. A másik forma a familiáris vagy PCT II (OMIM#2176100), amelyben az UROD mutációt hordoz. A PCT prototípus betegségnek tekinthető, ahol a gének és környezet interakciója jól tetten érhető. A PCT-n kívül egy másik kórkép, a Hepatoerythropoeticus porphyria (HEP) # is az UROD génhez kapcsolódik, az autoszomális recesszív mutációjának következménye. (Horkay *et al.*, 2008).

Spanyol kollaborációban a 3 gyermek beteg és hozzáférhető családtagjai perifériás vérmintáiból történt DNS szeparálás után az UROD 10 exonját vizsgálva mindhárom gyermekben az 1. exon 19. nukleotidján A>G tranzíciót eddig még nem közölt mutációt (M1T) detektáltunk. A gyermekek ezen kívül a 7. exon 703 pozíciójában C>T tranzícióra is heterozigóták (P235S) (Accs number: HM971359). Így **compound heterozigóta UROD mutációt igazoltunk és a HEP** diagnózist állítottuk föl (Remenyik *et al.*, 2008). Hasonló compound heterozigótaságot enyhe HEP tünetekkel ismereteink szerint eddig még csak egy

alkalommal publikáltak. Néhány homozigóta enyhe klinikai tünetekkel rendelkező HEP beteg is ismert.

Továbbá a barcelonai Bőrklínika munkatársai segítségével a porfirin analízis modern metodikáját és az **UROD enzimaktivitás meghatározás módszerét sajátítottuk el** és honosítottuk meg Debrecenben.

A PCT manifesztálódásában szerepet játszó egyik etiológiai tényező, a **haemochromatosisban** azonosított HFE gén C282Y mutációját 42 beteg esetében tanulmányoztuk, akiket 1995 és 2006 között diagnosztizáltunk. Az allélfrekvenciát az egészséges populációban észlelhetőnél (3,8%) magasabbnak, 7,14%-nak találtuk. Mind az irodalmi, mind ezen saját korábbi és jelenlegi eredményeink arra utalnak, hogy a C282Y allélnak szerepe van a PCT kialakulásában, ezért a jövőben jelenlétének megvizsgálását minden PCT esetben indokoltnak tartjuk. A HFE gén fenti mutációjának vizsgálatával párhuzamosan valamennyi betegben tanulmányoztuk a HCV fertőzöttséget is, amely 52,5%-nak adódott. Jelenlegi eredményeinkről 2007-ben sikeres diplomamunka készült (Radványi, 2007).

Egyéb etiológiai faktorokat is föltérképeztünk A gondozott populációban **PCT-s betegek 77%-a krónikus alkoholfogyasztó.** A **gyógyszer** provokáló szerepe különösen nőknél érhető tetten (**ösztrogén**). Peszticidek szerepe a mezőgazdaságban dolgozó, vegyszerekkel foglalkozó betegek esetében vetődött fel a Bőrgyógyászati Klinika beteganyagában. Továbbá gondozott betegek **26-30%-ban aktív vírushepatitis** igazolható. Egyéb betegség, mint SLE, diabetes, valamint leukaemia egy-egy betegünkön fordult elő(Horkay, 2007; Horkay, 2008c).

2. FOTOTOXICITÁS, AZ UVB CELLULÁRIS ÉS MOLEKULÁRIS HATÁSAI

2.1. 1.ABC transzporterek.

Az endogén porfirineken kívül növényekből, táplálékból származó porfirin vázas vegyületek, (pheophorbid a) is eredményezhetnek fototoxicitást. Az ATP binding cassette (ABC) transzporter család ABCG2 tagjának szerepet tulajdonítanak mind a porphyriák, mind a növényi fototoxicitás kialakulásában(Jonker *et al.*, 2002).

Keratinocita tenyészetben KC-ben Q-PCR segítségével mRNS-szinten vizsgáltuk ABC transzporterek expressziójának változását UV besugárzás hatására német kollaborációban. Korábban megállapítottuk, hogy az ABCA1, és ABCG1 jelentősen csökkent UV besugárzás után, akárcsak a lammelaris ichthyosisban szerepet játszó ABC transzporteré. Bebizonyítottuk, hogy az UVB hatására az ABCA1 és ABCG1 fehérje szintje csökken a besugárzás után 12 és 36 óra múlva. A két protein eltérő módon expresszálódik in situ a humán bőrben. Az ABCC1 a basalis rétegben és a granularis réteg külső részén mutatott legkifejezettebb citoplazmatikus festődést, míg az ABCG1 az egész epidermisben kimutatható volt a differenciációval párhuzamosan fokozódva. Az eredmények rávilágítanak az ABC transzporter molekulák fontos szerepére az epidermalis lipid barrier kialakításában. A barrier funkció, amelynek alapját az epidermalis KC képezik, többek között az UV-sugárzás károsító hatásának kivédésében is jelentős. Az eredmények közzlése a bírálók véleményének megválaszolása fázisában van(Markó *et al.*, 2011).

2.1.2. Magreceptorok

A magreceptorok ligand által aktivált transzkripciós faktorok, a sejt és a szervezet alampüködéseit génszinten szabályozzák(Remenyik *et al.*, 2007). Korábbi vizsgálatainkban intenzíven foglalkoztunk keratinocitákon retinsav receptor, peroxiszoma proliferátor aktivált receptor és retinoid X receptor UV hatásra és differenciációra bekövetkezett expressziós változásával. Jelen pályázatból finanszírozott vizsgálatokban bebizonyítottuk, hogy a PPAR

delta a domináns izoforma UV besugárzott differenciált keratinocitákon(Balogh *et al.*, 2009). Kezdetben úgy tűnt, hogy a PPAR delta izoforma regulálja a DNS károsodás egyik szenzor fehérjéjét, de biztató előkísérleteink eredményét nem tudtuk megerősíteni. Jelentős energiát, időt fordítottunk egy másik nukleáris receptor (retinoid orphan receptor (ROR)) bőrben való kimutatására és funkciójának meghatározására, de sajnos több, a kereskedelemben kapható antitesttel sem tudtunk meggyőző eredményt elérni a néhány biztató irodalmi adat ellenére sem, így az mRNS expressziós eredményeinket fehérje szinten nem tudtuk megerősíteni.

2.1.3. *Nukleotidok*

A nukleotidok több funkciót töltenek be a szervezetben. Így például nukleinsav alkotók, energia raktár, elektron transzfer, neurotranszmitter, jelátvivő molekula és a sejtfelszíni purinerg receptorokon keresztül a sejt alapvető funkcióit is képesek befolyásolni(Novak, 2011). A receptorok széles körben expresszálódnak, így keratinocytákon is(Burrell *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2005). A P2Y metabotrop receptorok befolyásolják a keratinocita proliferatív képességét, míg a P2X ionotrop receptorok inkább a differenciációban játszanak szerepet(Greig *et al.*, 2003). Kevés ismerettel rendelkezünk arról, hogyan befolyásolja az UV sugárzás ezeket a receptorokat és funkcióikat. A calcium influx regulálásával és membrán depolarizációval a P2X csatorna az intracelluláris kalcium koncentrációt szabályozza(Inoue *et al.*, 2005). HaCaT keratinocitákon 40 mJ/cm² UVB besugárzás után vizsgáltuk a különböző purinerg receptrok mRNS fehérje szintű expresszióját és extracelluláris ATP hatására kiváltott intracelluláris Ca⁺ koncentrációt. A P2X1 P2Y2 és P2X7 receptorok csökkent szintjét detektáluk a besugárzás után a túlélő sejteken. A kalcium válasz is kóros volt a besugárzott keratinocitákon 180 umol ATP alkalmazása után. A besugárzott sejteken inkább a metabotrop receptorok voltak felelősek az ATP válaszáért. Az ATP apoptosis indukciója a besugárzott sejteken elmaradt a kontroll sejtekhez képest, így azok apoptosis késsége vizsgálataink szerint csökkent, mint azt az Élettani intézettel kollaborációban kimutattuk(Ruzsnavszky *et al.*, 2011).

2.1.4. *CATERPILLER receptor család*

A természetes immunitás újabban felismert eleme, az IL-1b és IL-18 proinflammatorikus citokinek érésében fontos szerepet játszó multimolekuláris protein komplex, az inflammasoma(Yazdi *et al.*, 2010b). Az utóbbi időkben vált ismertté, hogy nemcsak myeloid eredetű sejtekben expresszálódik(Yazdi *et al.*, 2010a). Az Immunológiai Intézet munkacsoportjával korábban kimutattuk normál humán KC tenyészetben, hogy az inflammasoma-komponens Nalp1, Nalp2, Nalp3, caspase-1, ASC konstitutívan kifejeződik. Jelen pályázat által finanszírozott kísérletekben UV-besugárzás hatását tanulmányoztuk. UV hatására a Nalp1 és a Nalp3 expressziója lecsökken, míg a Nalp2, a caspase-1 és az ASC expressziója nem változott NHEK-ben (Q-PCR). A kaszpáz-5-öt nem tudtuk detektálni ezen sejtekben. Az UV-besugárzást követően ELISA módszerrel mért citokin-felszabadulás összetétele (IL-6, IL-8, IL-10, TNF α) arra utal, hogy ez összefüggésben lehet az inflammosoma komponenseinek expressziójában bekövetkező változásokkal. Az eredményekről konferencián számoltunk be. Továbbá tanulmányoztuk Poly (I:C) hatását (Benkő *et al.*, 2008; Emri *et al.*, 2007). Sajnos, mielőtt közlésre benyújtottuk volna, hasonló témában megjelent egy közlemény(Feldmeyer *et al.*, 2007).

Eredetileg terveztük a fehérjecsalád alkotóelemeinek vizsgálatát polymorph fényexanthemában is.

2.2. Polymorph fény-exanthema

A polymorph fény-exanthema (PFE) az idiopathiás photodermatosisek leggyakoribb képviselője. Típusosan nőknél koratavasszal kezdődő, a napfénynek kitett bőrfelületre lokalizálódó, egy betegen általában hasonló, de egyénenként változó papulák, hyperaemia, vesicula képződés jellemző. Gyermekeken ritka (Horkay, 2008a). A nyár előrehaladtával a tünetek intenzitása rendszerint csökken. Pathomechanizmusában az UV fényre keletkező endogén fotoszenzibilizátornak tulajdonítanak szerepet, valamint a normálistól kevésbé kialakuló UV indukált immunszuppresszió (Emri *et al.*, 2008). Terápiájában fontos szerepet kap a fényvédelem (Horkay, 2008b).

PFE-s betegek bőr és perifériás vér mintáinak vizsgálatát terveztük. Előkísérleteket végeztünk. Beállítottunk egy *in vitro* repair assayt: a keringő mononukleáris sejtekből származó, a nukleotid excíziós reparációban (NER) résztvevő enzimeket tartalmazó extractummal végzett comet-assay felhasználásával kimutatható a betegekben a NER esetleges hibája. Ezek évtizedekkel korábbi vizsgálati eredményeink (Horkay *et al.*, 1984; Horkay *et al.*, 1990; Horkay *et al.*, 1978) modern módszerekkel történő megerősítését is célozták. Továbbá KC tenyészetben vizsgáltuk az antioxidáns metallothionein szerepét a NER szabályozásában. Kimutattuk, hogy az *in vitro* UV-fénnyel besugarazott normál bőr biopsziás anyagok (skin explant) alkalmasnak bizonyulnak a DNS-károsodást jelző cyclobutan-pirimidin-dimerek keletkezésének tanulmányozására. A következő lépésben vizsgáltuk az epidermális DC (Langerhans sejtek, LC) UV-irradiációt követő kivándorlását a bőrből ezen a modellen. Megállapítottuk, hogy az epidermisből kiáramló sejtek többsége CD1a pozitív LC. Több sikertelen kísérletet tettünk Langerhans sejtek izolálására, így ezt a projektet felfüggesztettük.

2.3. Keratinocita differenciáció

Az ultraibolya sugárzás befolyásolja a keratinocita differenciációt. *In vitro* HaCaT és normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejttenyészetek kalcium vagy konfluencia indukált differenciációja jól használható modell. Teljes genomra kiterjedő mRNS expressziós vizsgálatunkkal új keratinocita differenciációban szerepet játszó géneket azonosítottunk. Az UVB irradiációnak esszenciális szerepe van a bőrben a D vitamin szintézisében. 50 nM D3 vitamin *in vitro* alkalmazása a konfluencia indukált keratinocita kultúrákon, tovább fokozta a 53 differenciáció asszociált gén expresszióját, a kontrollhoz képest (D vitamint nem kapott) Affimatrix gen array-en (Paragh *et al.*, 2010).

3. FOTOLIÁZ

In vitro UV kísérleteink egy amerikai kollaborációs lehetőség hatására az UVB okozta DNS károsodás repair lehetőségeinek tanulmányozása felé fordultak, melynek személyi feltételeit döntően két másik pályázat fedezte (TÁMOP-4.2.2.-08/1-2008-0019, TÁMOP-4.2.1/B-09/KONV-2010-007).

A DNS-ben kialakuló UVB fotolézisok közül a CPD és a 6-4 pirimidin-pirimidon (6-4 PP) fotoproduktumok kulcsfontosságú sejtéletlen folyamatokat befolyásolnak, mint a DNS replikáció, transzkripció, sejtciklus és apoptózis. A tartósan fennmaradó DNS károsodás génmutációkat eredményezhet, mely később daganatok kialakulásához vezethet. Normál körülmények között a DNS-en kialakult ilyen léziókat a NER javítja (Nousspikel, 2009). A NER konzervált DNS reparációs mechanizmus, amely legalább 20 komplex, illetve enzim koordinált működését igényli. A fotolézisok javítására a NER-nél gyorsabb és hatékonyabb mechanizmus a fotoreparáció (fotoreaktiváció), melyben kulcsfontosságú szerepe van a

heterológ fotoliáz enzimeknek. A CPD- vagy 6-4 PP specifikus fotoliáz képes közvetlenül kötődni az UV fotoproduktumokhoz és egy fény-függő reakcióban, egyéb fehérjék közreműködése nélkül visszaállítani az eredeti monomer struktúrát. A fotoliáz megtalálható a baktériumoktól az erszéyes emlősökig, viszont a méhlepényes emlősökből, így az emberből is, hiányzik (Brettel and Byrdin, 2011). Kísérleteinkben *in vitro*-szintetizált, CPD-fotoliázt kódoló mRNS-t juttattunk be humán keratinocita sejtekbe, majd vizsgáltuk a transzlálódó fehérjét és annak funkcióját. Az *in vitro*-szintetizált mRNS előnye, hogy nem integrálódik a kromoszómákba, ellentétben a vírus- és DNS alapú vektorokkal. A természetben előforduló nukleotid módosítások, mint a pszeudouridin, javítják az mRNS biológiai tulajdonságait: magas transzlációs hatékonysággal rendelkeznek, stabil és nem immunogén (Anderson *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2010; Karikó *et al.*, 2008). A pszeudouridin-módosított mRNS bármely fehérje expressziójára alkalmas, így az mRNS terápia egyik fontos eszköze lehet (Karikó and Weissman, 2007).

A *Potorous tridactylus* erszéyes fotoliáz enzimet kódoló *in vitro* szintetizált mRNS-t amerikai kollaboráló partnerünk (Katalin Karikó) bocsátotta rendelkezésünkre. Az *in vitro* szintetizált mRNS fokozott transzlációs képességét különböző (kodon optimalizáció, pseudouridin beépítés, hosszú poly A farok és cap 1) strukturális módosításokkal érték el. A fotoliáz mRNS-t lipofektamin LTX reagens segítségével juttattuk be HaCaT keratinociták és NHEK *in vitro* tenyészetébe. A humán keratinocitákban transzlálódó erszéyes fotoliáz fehérjét western blot és immunhisztokémiával detektáltuk. A transzfekció után 72 órán át mind a két sejtenyészetben kimutatható volt a fotoliáz fehérje. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a fotoliáz mRNS tranziens transzfekcióval bejuttatható HaCaT sejtekbe és ott hatékonyan termelődik róla fehérje. A fotoliáz funkcionális aktivitásának vizsgálata céljából a keratinocita tenyészeteket transzfekció után 20mJ/cm² UVB sugárzásnak tettük ki, majd rögtön fotoreaktiváltuk a sejteket 1 órán keresztül, illetve a sejtek másik részét sötétben tartottuk. A fotoliáz működését immuncitokémia és ELISA módszer segítségével vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a CPD fotoliáz fény-függő reparáció (fotoreaktiváció) során szignifikánsan csökkenteni (50%-kkal) a CPD-k mennyiségét az UVB irradiált keratinocita sejtekben. Tehát az *in vitro* szintetizált mRNS bejuttatható volt a keratinocitákba és funkcionálisan aktív fehérje szintetizálódott róla. Továbbá azt is kimutattuk, hogy szignifikánsan csökkentette a 60mJ/cm² UVB antiproliferatív hatását (Boros *et al.*, 2011). Az eredmények publikálását előkészítettük. (Melléklet 1.)

Jelen pályázatból finanszírozva elindítottuk a fotoliáz mRNS transzfektált keratinociták génexpressziós mintázatának feltérképezését microarray technológiával. Különösen arra vagyunk kíváncsiak, hogy melyek azok a gének, amelyek expressziója a CPD-k által szabályozódik. A microarray-vel kapott eredményeinket kvantitatív real-time PCR-al szeretnénk validálni.

A klinikumban nagy jelentősége van a napfény okozta károsodások elkerülésének és kijavításának. Jelenleg kevés és csak korlátozottan hozzáférhető (Magyarországon nem) olyan anyag van, mint például a fotoliáz, amely képes a már kialakult károsodásokat és azok hatásait megszüntetni. Ezért a klinikai gyakorlatban széles populációt érintve továbbra is a primer prevenciónak kiemelkedő szerepe van. Így azon ismeretek, melyek felmérik a populáció UV expozícióját, fontos adatokat szolgáltatnak. A primer prevenció egyik legfontosabb része a lakosság edukációja.

4. EPIDEMIOLOGIA

A mára már általánosan elfogadott és epidemiológiai, *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel bizonyított, hogy az UV sugárzásnak más faktorok (kémiai karcinogének, vírusok, fizikai

hatások stb.) mellett, döntő etiológiai szerepe van a keratinocita daganatok kialakulásában (basalioma, spinocellularis carcinoma), de ez a pigmentsejtekből kiinduló melanoma malignum esetén is bizonyított (Leiter and Garbe, 2008; Schuch and Menck, 2010).

A melanoma malignum incidenciája világszerte emelkedik. A gyermekkorban elszenvedett napégésen kívül fokozott rizikót jelent a világos bőrtípus, az anyajegyek nagy száma. A divatos barna bőrszín miatt a napozás és szolárium-használat elterjedt, annak ellenére, hogy karcinogén hatása igazolt (Mogensen and Jemec, 2011; Riker *et al.*, 2011). Kérdőíves epidemiológiai vizsgálatokat kezdtünk iskolások körében napozási szokásaik megismerése, napfény expozíciójuk becslése céljából. 27 debreceni iskolaorvos, bőrgyógyászati szeminárium és konzultáció után, 27 iskolában 1164 diák (13 és 16 éves korosztály) bőrstatuszát rögzítette. Előzőleg a diákok napozási szokásokról szóló általunk összeállított kérdőívet töltöttek ki. A kérdőíveket statisztikailag elemeztük. A vizsgálatban résztvevők között férfi/nő: 0,982. A bőrtípusok megoszlása a magyarországi átlagpopulációra jellemző. Az összes diák 47%-a tudatosan napozik; 11,5%-a nem használ fényvédelmet, 37,5% fizikai, 51% kémiai fényvédelmet alkalmaz. 2,6% jár rendszeresen bőrgyógyászati ellenőrzésre; 3,6% szoláriumhasználó. 39% számolt be súlyosabb napégésről. Az iskolaorvosok a diákok 63,7%-nak bőrén regisztráltak „atípusos” naevust. Megállapítható, hogy a vizsgált diákok körében az anyajegyek száma nagy, sokan szenvednek napégést a melanoma későbbi kialakulásának szempontjából kritikus életkorban, a fiatal korosztályban is vannak szoláriumhasználók. Vizsgálati eredményeink azt mutatják, hogy a helyes fényvédelemtől továbbra is szükséges felvilágosítani a diákokat és szüleiket. A vizsgálati eredményekből egy sikeres TDK dolgozat és előadás született, valamint magyar nyelvű közleményt állítottunk össze (Takács *et al.*).

Ha a daganatot nem tudjuk megelőzni és kialakult, akkor a beteg életkilátásai szempontjából mai ismereteink szerint a legfontosabb a minél korábbi eltávolítása. A bőrgyógyász társadalom felvilágosító oktató tevékenysége ellenére azonban a melanomák jelentős része olyan stádiumban kerül eltávolításra, amelyben már várható metasztázis.

5. Prognosztikai faktorok keresése Melanoma malignumban

A melanoma az egyik legagresszívebben viselkedő humán malignus tumor (Leiter *et al.*, 2004). Mivel a disszeminált melanomának nincs hatásos terápiája, fontos meghatározni a progresszióra való hajlamot az egyes betegekben, lehetőleg már a diagnózis felállításakor. Eddig a legerősebb prognosztikus faktornak a Breslow tumor vastagság bizonyult (Honsi *et al.*, 2005). Ennek ellenére van vastag melanoma, ami soha nem ad áttétet, és vannak vékony, agresszíven terjedő melanomák. Így szükséges további olyan faktorok azonosítása, amik összefüggésben vannak a progresszióval és túléléssel (Spatz *et al.*, 2010). A metallothioneinek (MT) minden sejtben megtalálható intracelluláris, alacsony molekula tömegű (6,5 kDa) fehérjék, melyek nagy affinitással kötnek fémionokat, mint a Zn, Cu, Cd. Eddig felismert funkciói (antiapoptotikus, antioxidáns hatás) nyomán több tanulmányban vizsgálták a MT expressziót különböző humán tumorokban (Eckschlager *et al.*, 2009). Azonban e tanulmányok többsége, beleértve a melanoma és MT expresszió összefüggésének vizsgálatát is, csak a tumorsejtek összességének pozitivitását/negativitását értékelte. Részletesebb összehasonlítás, valamint más tényezőkkel történő együttértékelés nem történt. A MT közvetlen oki szerepének kérdése a tumor kialakulásában/terjedésében még megválaszolásra vár.

A metallothionein (MT) fehérjéről ismert, hogy antioxidáns, illetve mint cink-transzporter, transzkripciós faktorok és cink-dependens enzimek működését szabályozó molekula. Ezeket figyelembe véve expressziójának mértéke a tumorsejtek növekedését,

apoptózis-rezisztenciáját egyaránt befolyásolhatja. Prognosztikai jelentősége számos daganatfajta esetén már bizonyítást nyert. Az is ismert, hogy a cink-homeosztázis összefüggésben van az immunrendszer működésével is. Jelen projekt keretében tissue microarray analízissel vizsgáltuk klinikánk archivált, áttétet nem adó és haematogén áttétet adó primer kután melanomáiból (n= 47) származó szövettani anyagain a MT-expressziót, ezzel párhuzamosan pedig tumorra asszociált makrofágok (CD68, CD163) és dendritikus sejtek (DC-SIGN, CD1a) jelenlétét. Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a MT-expresszió szignifikánsan nagyobb arányban fordult elő metasztatikus melanomában. Szignifikánsan gyakoribb volt a CD68⁺ és CD163⁺ makrofágok intratumorális jelenléte is az áttétes melanomákban, míg a CD1a⁺ dendritikus sejtek peritumorális előfordulása volt gyakoribb a nem áttétes primer daganatokban. Az eredményeinkről konferenciákon számoltunk be (Emri *et al.*, 2011; Emri *et al.*, 2009), valamint a publikációt előkészítés alatt áll.

A VIZSGÁLATOK VÁRHATÓ HASZNA

1. A HEP esetek közlésével arra is rámutattunk, hogy a PCT pontos diagnózisának felállításához némelykor szükséges lehet a DNS szekvenálás, a molekuláris genetikai vizsgálat is. Ugyanakkor a környezet moduláló hatása is jól nyomonkövethető. Továbbá a porphyriákban végzett vizsgálataink összhangban állnak a modern, megelőzés szemléletű orvoslással, ahol a genetikai ismeretek alapját képezik a prevenciónak. Az eredmények gyarapítják farmakogenetikai tudásunkat is, és hozzájárulhatnak az egyénekre szabott orvoslás jövőbeni víziójának megvalósításához.

2. A vizsgálati eredményeink új adatokat szolgáltatnak az UV-sugárzás általános biológiai hatásainak jobb megértéséhez.

3. mRNS alapú transzfekciós kísérleteink úttörőek keratinocitákon.

a) Továbbfejlesztik az UV fényvédelem új szemléletét, ahol reparációban résztvevő enzimek bejuttatásával, aktívan, a károsodás megtörténte után tudunk beavatkozni, szemben a klinikai gyakorlatban jól bevált fizikai és kémiai fényvédőkkel, melyek az UV fényt szűrik ki, így az expozíció előtt szükséges alkalmazni.

b.: Az egészen új lehetőség, az RNS terápiás alkalmazásának utóbbi néhány évben elindult kísérletes lehetőségeit is bővíti.

4. Az UV terhelés megítélése gyermekeken prediktív értékű a várható tumor incidenciára. Munkánk során a vizsgálatokkal egy időben primer prevenció tevékenységet is végeztünk az adott populációban az UV fény káros hatásainak megismertetésével és a helyes fényvédelemre való oktatással, valamint az anyajegyek vizsgálatával. Az eredményeinket fel tudja használni a bőrgyógyászati szakmai kollégium azokon a tárgyalásokon, ahol a nemzetközi trendeknek megfelelően (Riker *et al.*, 2011) gyermekkorban a szoláriumok alkalmazásának restriktívóját szeretné elérni.

5. Melanoma malignum esetén a ma használatos prognosztikai tényezők csak durva becslést tesznek lehetővé, így sok olyan beteg kerül kiegészítő kezelésekre, akiket feleslegesen teszünk ki ezen terápiák esetenként igen súlyos mellékhatásának. Így új prognosztikai markerek felismerése kiemelkedő jelentőségű a melanoma kezelés klinikai gyakorlatában.

Irodalom

Anderson B, Muramatsu H, Jha B, Silverman R, Weissman D, Karikó K (2011) Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic Acids Res.*

Anderson B, Muramatsu H, Nallagatla S, Bevilacqua P, Sansing L, Weissman D, *et al.* (2010) Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res* 38:5884 - 5892.

Balogh A, Törőcsik D, Nagy L, Remenyik É (2009) PPAR delta is the dominant PPAR isoform in UV exposed in vitro differentiated primary human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 129:S35

Benkő S, Varga A, Balogh A, Miklóssy G, Emri G, Remenyik É, *et al.* (2008) Poly(I:C) differentially regulates the expression of Nod-like receptors and induces caspase-1 dependent IL-1b secretion in keratinocytes. *J Invest Dermatol.*

Boros G, Rózsa D, Emri E, Nagy G, Miko E, Juhász A, *et al.* (2011) Enhanced repair of UVB-induced DNA lesions in photolyase mRNA-transfected keratinocytes. *J Invest Dermatol* 131 S104/ Abs 621.

Brettel K, Byrdin M (2011) Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Curr Opin Struct Biol* 20:693 - 701.

Brouse C, Basch C, Neugut A (2011) Warning signs observed in tanning salons in New York City: implications for skin cancer prevention. *Prev Chronic Dis* 8:A88.

Burke K, Wei H (2009) Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicol Ind Health* 25:219 - 224.

Burrell H, Bowler W, Gallagher J, Sharpe G (2003) Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: evidence for functional P2Y1, P2Y2, and P2Y4 receptors. *J Invest Dermatol* 120:440 - 447.

Eckschlager T, Adam V, Hrabeta J, Figova K, Kizek R (2009) Metallothioneins and cancer. *Curr Protein Pept Sci* 10:360 - 375.

Emri E, Emri G, Egervari K, Beke L, Varvolgyi T, Mehes G, *et al.* (2011) Immunohistochemical characterization of metallothionein-expression in primary cutaneous malignant melanoma
J Invest Dermatol 131 S112 Abs 667.

Emri G, Benkő S, Balogh A, Varga A, Remenyik É, Rajnavölgyi É (2007) Study of mRNA expression of the CIITA transactivator in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127.

Emri G, E R, Horkay I (2008) A polymorph fényexanthema pathogenezise. *Bőrgyógy Vener Szle* 84:147-150.

Emri G, Varvolgyi T, Begany Á, Hargitay Z, Toth L, Emri E, *et al.* (2009) Immunohistochemical markers as prognostic factors in primary cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 129:S4.

Emri G, Wenczl E, Van Erp P, Jans J, Roza L, Horkay I, *et al.* (2000) Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. *J Invest Dermatol* 115:435 - 440.

Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer H (2007) The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol* 17:1140 - 1145.

Greig A, Linge C, Terenghi G, McGrouther D, Burnstock G (2003) Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120:1007 - 1015.

Homsí J, Kashani-Sabet M, Messina J, Daud A (2005) Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer Control* 12:223 - 229.

Horkay I (2007) **A fotodermatológia 15 éve.** . *Bőrgy Ven Szle* 83:105-108.

Horkay I (2008a) Environmental dermatology in childhood: photosensitivity. *Pediatric Health* 2:749-759.

Horkay I (2008b) Fényvédelem. *Nouv Esthetiques SPA* 2:34-35.

Horkay I (2008c) Klinikai photodermatologia. *Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest.*

Horkay I, Bodolay E, Krajczár J, Alföldi G (1984) In situ identification of T lymphocytes in polymorphic light eruption. *Photodermatol* 1:250 - 252.

Horkay I, Emri G, Varga V, Simics E, Remenyik E (2008) Photosensitivity skin disorders in childhood. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 24:56 - 60.

Horkay I, Topaloglou A, Teherani D, Kósa A, Altmann H (1990) Poly(ADP-ribose)-synthesis and excision repair in light sensitive skin disorders. *Acta Biol Hung* 41:93 - 100.

Horkay I, Varga L, Tamási P, Gundy S (1978) Repair of DNA damage in light sensitive human skin diseases. *Arch Dermatol Res* 263:307 - 315.

Inoue K, Denda M, Tozaki H, Fujishita K, Koizumi S (2005) Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 124:756 - 763.

Jonker J, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk M, Scheffer G, Scheper R, *et al.* (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15649 - 15654.

Karikó K, Muramatsu H, Welsh F, Ludwig J, Kato H, Akira S, *et al.* (2008) Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther* 16:1833 - 1840.

Karikó K, Weissman D (2007) Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Curr Opin Drug Discov Devel* 10:523 - 532.

Kuluncsics Z, Kerékgyártó T, Gróf P, Horkay I, Rontó G (2002) Biological UV dosimeters in quality control of tanning tubes. *Photochem Photobiol* 76:391 - 396.

Leiter U, Garbe C (2008) Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 624:89 - 103.

Leiter U, Meier F, Schittek B, Garbe C (2004) The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol* 86:172 - 178.

Markó L, Paragh G, Ugocsai P, Böttcher A, Orsó E, Wikonkál N, *et al.* (2011) ATP binding cassette transporters of keratinocytes are differentially regulated by UV light *J Photochem Photobiol B: Biology (reviewing process)*

McKenzie R, Aucamp P, Bais A, Björn L, Ilyas M, Madronich S (2011) Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: 2010 assessment. Executive summary
Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem Photobiol Sci* 10:178 - 181.

Mogensen M, Jemec G (2011) The potential carcinogenic risk of tanning beds: clinical guidelines and patient safety advice. *Cancer Manag Res* 2:277 - 282.

Norval M, Lucas R, Cullen A, de Gruijl F, Longstreth J, Takizawa Y, *et al.* (2011) The human health effects of ozone depletion and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 10:199 - 225.

Nouspikel T (2009) DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 66:994 - 1009.

Novak I (2011) Purinergic signalling in epithelial ion transport: regulation of secretion and absorption. *Acta Physiol (Oxf)* 202:501 - 522.

Paragh G, Ugocsai P, Vogt T, Schling P, Kel A, Tarabin V, *et al.* (2010) Whole genome transcriptional profiling identifies novel differentiation regulated genes in keratinocytes. *Exp Dermatol* 19:297 - 301.

Radványi M (2007) A porphyria cutanea tarda és kapcsolata a haemochromatosis gén C282Y mutációjával. *diplomamunka, DE OEC Bőrgyógyászati Klinika, 2007 Témavezető: Horkay Irén.*

- Remenyik E, Lanyon G, Horkay I, Paragh G, Wikonkál N, Kósa A, *et al.* (1998a) Erythropoietic protoporphyria: a new mutation responsible for exon skipping in the human ferrochelatase gene. *J Invest Dermatol* 111:540 - 541.
- Remenyik E, Lanyon G, Horkay I, Paragh G, Wikonkál N, Kósa A, *et al.* (1998) Erythropoietic protoporphyria: a new mutation responsible for exon skipping in the human ferrochelatase gene. *J Invest Dermatol* 111:540 - 541.
- Remenyik E, Lecha M, Badenas C, Kószó F, Vass V, Herrero C, *et al.* (2008) Childhood-onset mild cutaneous porphyria with compound heterozygotic mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene. *Clin Exp Dermatol* 33:602 - 605.
- Remenyik E, Töröcsik D, Paragh G, Balogh A, Dózsa A, Markó L, *et al.* (2007) Magreceptorok. *Bőrgyógy Vener Szle* 83:105-108.
- Remenyik E, Varga C, Emri G, Hunyadi J, Horkay I (1998b) Comet assay to study UV-induced DNA damage. *Photodermatol Photoimmunol Photomedicin* 14:2004.
- Remenyik E, Wikonkál N, Zhang W, Paliwal V, Brash D (2003) Antigen-specific immunity does not mediate acute regression of UVB-induced p53-mutant clones. *Oncogene* 22:6369 - 6376.
- Riker A, Zea N, Trinh T (2011) The epidemiology, prevention, and detection of melanoma. *Ochsner J* 10:56 - 65.
- Ruzsnavszky O, Telek A, Gönczi M, Balogh A, Remenyik E, Csernoch L (2011) UV-B induced alteration in purinergic receptors and signaling on HaCaT keratinocytes. *J Photochem Photobiol B*.
- Sarkany R (2010) Clinical implications of advances in understanding the inheritance of erythropoietic protoporphyria. *Br J Dermatol* 162:1156 - 1157.
- Schoket B, Horkay I, Kósa A, Páldeák L, Hewer A, Grover P, *et al.* (1990) Formation of DNA adducts in the skin of psoriasis patients, in human skin in organ culture, and in mouse skin and lung following topical application of coal-tar and juniper tar. *J Invest Dermatol* 94:241 - 246.
- Schuch A, Menck C (2010) The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *J Photochem Photobiol B* 99:111 - 116.
- Spatz A, Batist G, Eggermont A (2010) The biology behind prognostic factors of cutaneous melanoma. *Curr Opin Oncol* 22:163 - 168.
- Takács K, Tamás I, Fejes M, Ádám B, Vokó Z, Emri G, *et al.* Pigmnetált naevusok és napozási szokások általános- és középiskolás diákok körében *Orv Hetil.*
- van der Leun J, Piacentini R, de Gruijl F (2008) Climate change and human skin cancer. *Photochem Photobiol Sci* 7:730 - 733.

Varga V, Balogh A, Emri G, Horkay I, Remenyik E (2007) Molecular genetic studies in erythropoietic protoporphyria. *J Invest Dermatol* 127:83.

Vink A, Roza L (2001) Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *J Photochem Photobiol B* 65:101 - 104.

Wikonkal N, Berg R, van Haselen C, Horkay I, Remenyik E, Begany A, *et al.* (1997) bcl-2 vs p53 protein expression and apoptotic rate in human nonmelanoma skin cancers. *Arch Dermatol* 133:599 - 602.

Yarosh D (2002) Enhanced DNA repair of cyclobutane pyrimidine dimers changes the biological response to UV-B radiation. *Mutat Res* 509:221 - 226.

Yazdi A, Drexler S, Tschopp J (2010a) The role of the inflammasome in nonmyeloid cells. *J Clin Immunol* 30:623 - 627.

Yazdi A, Guarda G, D'Ombra M, Drexler S (2010b) Inflammatory caspases in innate immunity and inflammation. *J Innate Immun* 2:228 - 237.

Melléklet

I. mRNS transzfekció segítségével létrehozott funkcionálisan aktív fotoliáz protein szintézis in vitro humán keratinocita monolayeren.

G Boros¹, D Rózsa¹, E Emri¹, G Nagy¹, E Miko¹, A Juhász¹, I Juhász¹, van der Horst GT², Muramatsu H³, Weissman D⁴, K Karikó³, E Remenyik¹, G Emri¹, I Horkay¹

¹Department of Dermatology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary;

²Department of Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands;

³Department of Neurosurgery, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA;

⁴Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

1. Bevezetés

Ultraibolya (UV) sugárzás hatására a nukleinsavak, fehérjék és lipidek egyaránt károsodhatnak. A DNS-ben kialakuló fotoléziók közül a ciklobután pirimidin dimerek (CPD) és a 6-4 pirimidin-pirimidon (6-4 PP) fotoproduktumok a legismertebbek, melyek olyan kulcsfontosságú sejtleletani folyamatokat befolyásolnak, mint a DNS replikáció, transzkripció, sejtciklus és apoptózis. A tartósan fennmaradó DNS károsodás génmutációkat eredményezhet, mely később daganatok kialakulásához vezethet (Vink and Roza, 2001).

Normál körülmények között a DNS-en kialakult léziókat a nukleotid excíziós reparációs rendszer (NER) képes javítani (Yarosh, 2002). A NER konzervált DNS reparációs mechanizmus, amely legalább 20 komplex, illetve enzim koordinált működését igényli. Ennek a mechanizmusnak két altípusa ismert. Az egyik a transzkripcióhoz kapcsolt reparáció (TCR), mely azokat a léziókat távolítja el, melyek a gén átíródo szakaszán helyezkednek el, a másik a globális genom reparáció (GGR), amely a teljes genomból képes a léziókat eltávolítani [1].

A fotoléziók javítására a NER-nél gyorsabb és hatékonyabb mechanizmus a fotoreparáció (fotoreaktiváció), melyben kulcsfontosságú szerepe van a heterológ fotoliáz enzimeknek. A CPD- vagy 6-4 PP specifikus fotoliáz képes közvetlenül kötődni az UV fotoproduktumokhoz és egy fény-függő reakcióban, egyéb fehérjék közreműködése nélkül visszaállítani az eredeti monomer struktúrát. A fotoliáz megtalálható a baktériumoktól az erszényes emlősökig, viszont a méhlepényes emlősökből, így az emberből is, hiányzik. A fotoliázok 450-550 aminosavból felépülő, „struktúra-specifikus” DNS-kötő monomer fehérjék, melyek két kromofór kofaktorral rendelkeznek. Az egyik kofaktor mindig az egyes fajok között magas homológiát mutató flavin adenin dinukleotid (FAD), a másik pedig vagy a metheniltetrahidrofolát (MTHF), vagy a 8-hidroxi-7,8-didemetil-5-deazariboflavin (8-HDF), ez fajoként eltérő. Az esszenciális FAD kofaktor specifikusan kötődik a károsodott DNS-hez, valamint a fotoreparáció katalitikus hatásáért is ez felelős. A „kettes számú” kofaktorok fotoantennaként működnek, melyek fontos hatást gyakorolnak a fotokatalízisre a látható fény tartományába eső fotonok begyűjtésével, hiszen hullámhossztól függően akár 10-100-szorosára is növelhetik annak hatékonyságát. Maga a fotokatalízis egy ciklikus elektron transzfer révén valósul meg néhány pikomásodperc leforgása alatt [2-4].

Az UV sugárzás hatására nagyobb számban keletkezik CPD, mint 6-4 PP, lassabban javítódik és nagyobb a mutagenitása is, ez is alátámasztja, hogy jelentős szerepe van az UV sugárzás okozta károsodásokban. Továbbá, a CPD-k nagymértékben hozzájárulnak a bőrben kialakuló akut válaszreakciókhoz (bőrpír, napégés, apoptózis), amivel a bőrrák kialakulásának kockázatát is növelik. Nem véletlen, hogy számos tanulmány foglalkozik az UV sugárzás indukálta CPD-k felismerésével és javításával.

Egyik tanulmányban az erszényes CPD-fotoliáz gént tartalmazó rekombináns adenovírus vektort, eGFP fehérjével fúzióban (*Adphr*-EGFP vírus), juttattak be humán sejtekbe [5], egy másikban *Potorous tridactylis* (Amerikai potoró) CPD fotoliáz transzsgént expresszáló egeret hoztak létre és vizsgálták a fotoliáz funkcióját [6]. Egy japán kutatócsoport szintén a *Potorous*

tridactylis CPD-fotoliázát kódoló cytomegalovírus vektort (pCY4B) hozott létre, melyet NER-deficiens humán sejtekbe, valamint egér fibroblaszt sejtekbe juttattak be, így vizsgálva a fotoliáz gyors és hatékony működését [7-8]. Ugyanezzel a vektorral egy brazil kutatócsoport HeLa sejtvonalat felhasználva folytatott tudományos kísérleteket [9].

Kísérleteinkben *in vitro*-szintetizált, CPD-fotoliázát kódoló mRNS-t juttattunk be humán keratinocita sejtekbe, majd vizsgáltuk a transzlálódó fehérjét és annak funkcióját. Az *in vitro*-szintetizált mRNS előnye, hogy nem integrálódik a kromoszómákba, ellentétben a vírus- és DNS alapú vektorokkal. A természetben előforduló nukleotid módosítások, mint a pszeudouridin, javítják az mRNS biológiai tulajdonságait: magas transzlációs hatékonysággal rendelkezik, stabil és nem immunogén. A pszeudouridin-módosított mRNS bármely fehérje expressziójára alkalmas, így az mRNS terápia egyik fontos eszköze lehet [10].

Kísérleteink első célkitűzése az *in vitro*-szintetizált, pszeudouridin-módosított, erszénes CPD-fotoliázát kódoló mRNS (fotoliáz mRNS) *in vitro* hatásának vizsgálata. Elsődlegesen arra kerestük a választ, hogy bejuttatható-e a fotoliáz mRNS keratinocita sejtekbe, transzlálódik-e róla fehérje és ha igen, betölti-e a funkcióját.

2 . Anyagok és módszerek

2.1. Az mRNS *in vitro* szintetizálása

Az *in vitro* szintézishez *Potorous tridactylus* (Amerikai potoró) CPD-fotoliázát kódoló plazmidot használtunk templátként. A fotoliáz gén szintetizálását a német székhelyű Entelechon cég (www.entelechon.com) végezte el, akik a „PerfectGene” nevű algoritmus segítségével az erszénes szekvenciát humanizálták, azaz olyan kodonokat szelektáltak, amelyek a humán szekvenciákban gyakoribbak, az optimalizálás stresszelt humán környezetre történt. Az mRNS *in vitro* szintetizálását kollaborációs partnerünk Karikó Katalin és munkatársai (Department of Neurosurgery, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) végezték el. Az fotoliáz gént egy bizonyos plazmidba klónozták, amelyet szubklónozni kellett egy olyan plazmidba, amely minden olyan elemet tartalmaz, amelyről optimális RNS készül. Ezen elemek közé tartozik a T7 promoter, az 5'UTR (TEV -Tobacco Etch Viral szekvencia), a 3'UTR (*Xenopus* beta-globin-specifikus szekvencia), cap1 struktúra, 50-nt hosszúságú poly(A) farok. A módosított nukleozid tartalmú RNS elkészítéséhez pszeudouridin trifoszfát származékokat használtak. A transzkripciót követően a templát plazmidot kezelték Turbo DNáz-zal, majd az RNS-t 2.5M lítium-kloriddal precipitálták, centrifugálással összegyűjtötték a pelletet, amit etanolos mosás után nukleáz-mentes vízben oldottak. Az RNS koncentrációját spektrofotométerrel határozták meg, minőségellenőrzését denaturáló agaróz gélelektroforézissel végezték. A hasonló eljárással készült *Renilla reniformis* eGFP-t kódoló mRNS-t (Ψ -eGFP) használtuk kontrollként kísérleteinkben.

2.2. Sejttenyésztés

A HaCaT keratinocita sejteket 10% hőinaktivált foetális borjúsérumot (FBS) és 0.5 % antibiotikumot (penicillin/streptomycin, Sigma-Aldrich) tartalmazó DMEM médiumban (PAA) növesztettük 37 °C állandó hőmérséklet és 5 % CO₂ tartalom mellett.

2.3. Transzfekció és kezelések

A transzfekciót megelőző napon 2×10^4 sejtet osztottunk le egy 96 lyukú plate 1 welljébe. Az mRNS-eket (Ψ -eGFP, Ψ -CPD-PL) minden kísérletben tranziens transzfekcióval juttattuk be a sejtekbe Lipofectamine LTX-PLUS (Invitrogen) transzfekciós reagens segítségével. Kipróbáltunk más transzfekciós reagenst is, mint például a Lipofectin-t (Invitrogen), vagy a TransIT-ot (Mirus), de ezek nem bizonyultak hatékonyak. 20 órával a transzfekciót követően a sejteket 20 mJ/cm² UVB sugárzásnak tettük ki (Philips, TL12 lamps), majd rögtön fotoreaktiváltunk 1 órán át (Sylvania, F18W DayLight Fluorescent lamps), vagy sötétben tartottuk a sejteket.

2.4. Western blot

A HaCaT sejteket PBS-es mosás után RIPA pufferben lizáltuk. A fehérjéket 10 % SDS poliakrilamid gélen választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra vittük át nedves blottolással. A membránokat 5 % sovány tejben blokkoltuk 1 órán keresztül, majd inkubáltuk egy éjszakán át a primer antitestekkel: anti-CPD-fotoliáz (1:500, Prof. van der Horst laboratóriumából kapott nyúlban termeltetett, poliklonális antitest), anti- β -Aktin (#3700S, 1:1000, Cell Signalling Technology). A HRP-konjugált szekunder antitestekkel (1:3000; anti-nyúl és anti-egér; Biorad) való 1 órás inkubálás után a fehérjéket az ECL-Plus kemilumineszcens detektáló kit (Amersham) segítségével tettük láthatóvá.

2.5. Immunfluoreszcencia

A transzfekciót megelőző napon a sejteket tárgylemezre raktuk ki. A transzfekciót, UVB kezelést és fotoreaktivációt követően a sejteket fixáltuk 4% paraformaldehiddel, permeabilizáltuk 1% Triton X-100 reagenssel. A sejteket 20% FBS oldatban blokkoltuk, majd inkubáltuk egy éjszakán át az anti-CPD-fotoliáz antitesttel. A sejteket az anti-nyúl IgG FITC konjugált (Vectashield) szekunder antitesttel 2 órán át inkubáltuk sötétben, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk meg a mintákat.

2.6. DNS károsodás detektálása

2.6.1. Direkt ELISA

A HaCaT sejtekből genom DNS-t izoláltunk QIAamp Blood DNA mini kit (Qiagen) segítségével, majd a vizsgálatot a Cosmo Bio Co., LTD cég által ajánlott protokoll szerint végeztük el, annyi módosítással, hogy 10 ng gDNS-t használtunk a kísérlethez, illetve a western blot technikánál alkalmazott szekunder antitestet használtuk.

2.6.2. Immuncitokémia

A módszert a Cosmo Bio Co., LTD cég által ajánlott protokoll szerint végeztük el, annyi módosítással, hogy szekunder antitestként az anti-egér IgG Alexa Fluor 568-at (Invitrogen) használtuk 1:2000 hígításban.

2.7. Sejtproliferáció vizsgálata

A sejtek életképességét EZ4U kit segítségével vizsgáltuk (Biomedica Gruppe, Austria), a vizsgálatokat a gyártó ajánlása szerint végeztük el, annyi módosítással, hogy a szubsztrát és az aktivátor hozzáadása után a sejteket 37 C°-on 90 percig inkubáltuk. A sejteket a transzfekciót követően 20 mJ/cm² és 60 mJ/cm² dózisú UVB sugárzásnak is kitettük.

3. Eredmények és következtetések

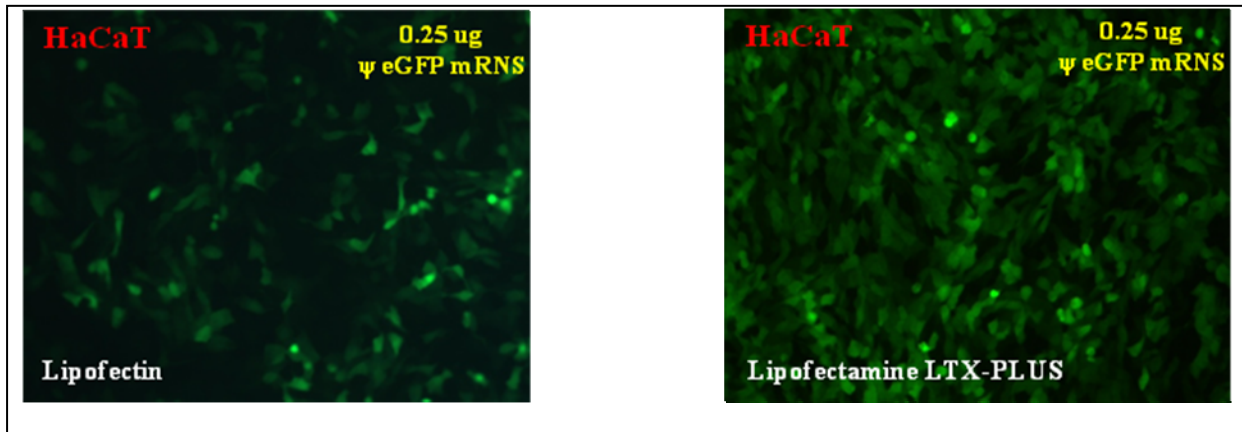
3.1. Az in vitro-szintetizált Ψ -módosított mRNS-ek transzlációja

3.1.1. Az eGFP mRNS (Ψ -eGFP) transzlációja

Az optimális kísérleti körülmények beállításához HaCaT keratinocita sejtekbe tranziens transzfekcióval különböző koncentrációjú Ψ -eGFP mRNS-t juttattunk be kétféle lipid-alapú transzfekciós reagens segítségével, annak eldöntésére, hogy melyik kísérleti kondíció mellett érjük el a legnagyobb transzlációs hatékonyságot. Lipofectamine LTX-PLUS segítségével mindhárom kipróbált koncentrációnál (0.25 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g) megfelelő transzlációt értünk el és a Ψ -eGFP mRNS nem volt toxikus a sejtekre nézve egyik koncentrációban sem. A lipofectin nem bizonyult ennyire hatékonynak (1. ábra). Mivel elegendő a 0.25 μ g koncentrációjú Ψ -eGFP mRNS bevitele is a megfelelő transzláció eléréséhez, ezért kísérleteink további részében ezt a koncentrációt használtuk.

A.

B.

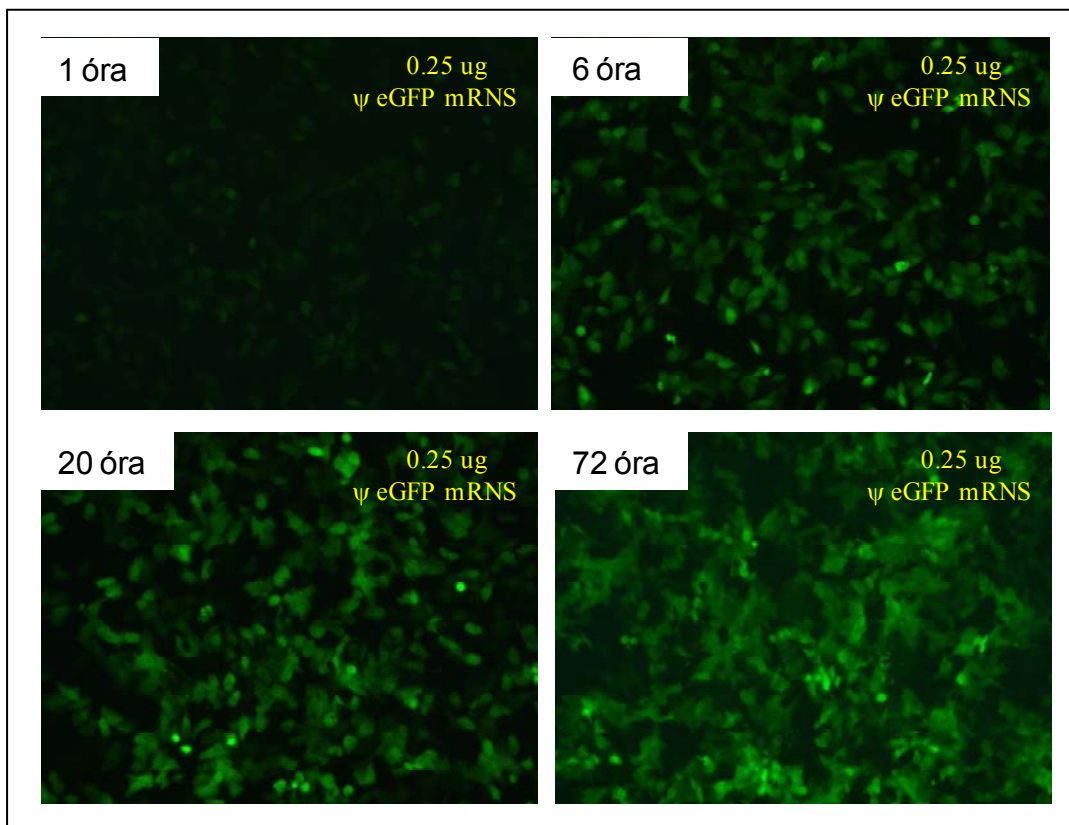


1. ábra: Az eGFP expressziója HaCaT sejtekben

Ψ -eGFP mRNS (0.25 μ g) tranziens transzfekciója HaCaT sejtekbe Lipofectin (A) és Lipofectamine LTX-PLUS (B) transzfekciós reagensek segítségével. Az eGFP expresszióját 20 órával a transzfekciót követően fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk 20x nagyítás mellett.

Az eGFP fehérje már kimutatható a transzfekció után 1 órával is, viszont a későbbi időpontokban (20 órával a transzfekciót követően) expressziója kifejezettebb. Az eGFP expressziója még a transzfekciót követő 72. órában is kimutatható (2. ábra).

Az eredmények tehát azt mutatják, hogy a HaCaT keratinocita sejtekbe bejuttatható a Ψ -eGFP mRNS, és nagy hatékonysággal termelődik róla fehérje, amely még a transzfekciót követő 3. napon is kimutatható.



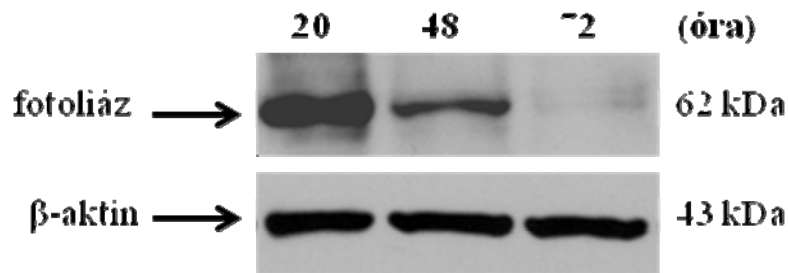
2. ábra: Az eGFP expressziója HaCaT sejtekben

A Ψ -eGFP mRNS-t (0.25 μ g) tranziens transzfekcióval juttattuk be HaCaT sejtekbe Lipofectamine LTX-PLUS transzfekciós reagens segítségével. Az eGFP fehérje expresszióját különböző időpontokban (1, 6, 20, 72 óra) a transzfekciót követően fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk 20x nagyítás mellett.

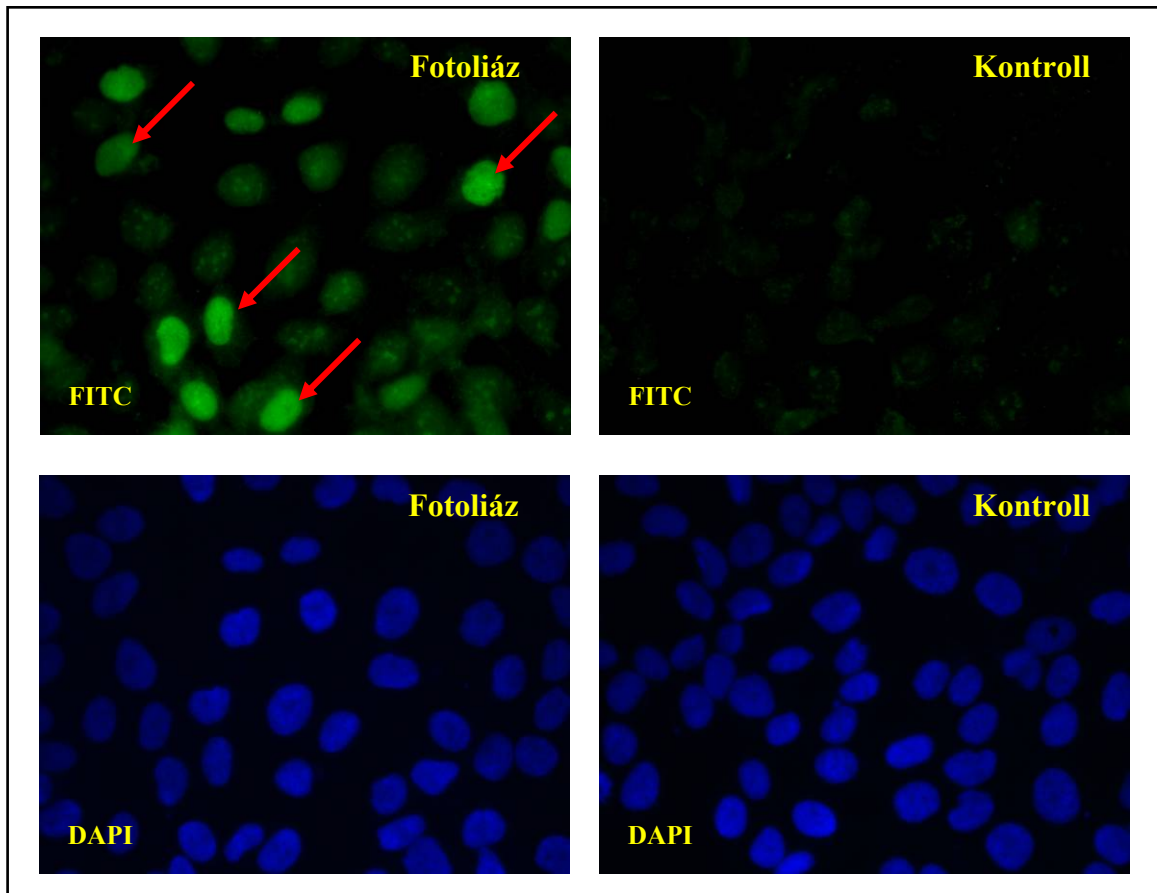
3.1.2. Fotoliáz mRNS (Ψ -CPD-PL) transzlációja

A Ψ -eGFP mRNS transzfekciójánál beállított kísérleti körülményeket alkalmaztuk a Ψ -CPD-PL mRNS bevitelénél is. A fotoliáz fehérje expresszióját western blot technika segítségével tudtuk nyomon követni. Mivel CPD fotoliáz elleni antitest nincs forgalomban, kollaborációs partnerünknek, van der Horst professzor úrnak, (Department of Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands) köszönhetően kaptunk a *Potorous tridactylus* CPD fotoliáz fehérjére specifikus poliklonális antitestet ajándékba. A transzfekciót követő 20. órában volt a legmagasabb a fotoliáz fehérje expressziója, az idő elteltével fokozatosan csökkent, így a 72. órában már alig volt detektálható (3. ábra / A). A Ψ -eGFP mRNS-el transzfektált, valamint a kontroll HaCaT sejtekben nem volt kimutatható a CPD fotoliáz termelése (az adat nincs bemutatva). Immunfluoreszcens technikát alkalmazva kimutattuk, hogy a CPD fotoliáz a HaCaT sejtek sejtmagjába lokalizálódik (3. ábra / B). Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a fotoliáz mRNS tranziens transzfekcióval bejuttatható HaCaT sejtekbe és ott hatékonyan termelődik róla fehérje.

A.



B.



3. ábra: A CPD fotoliáz expressziója HaCaT sejtekben

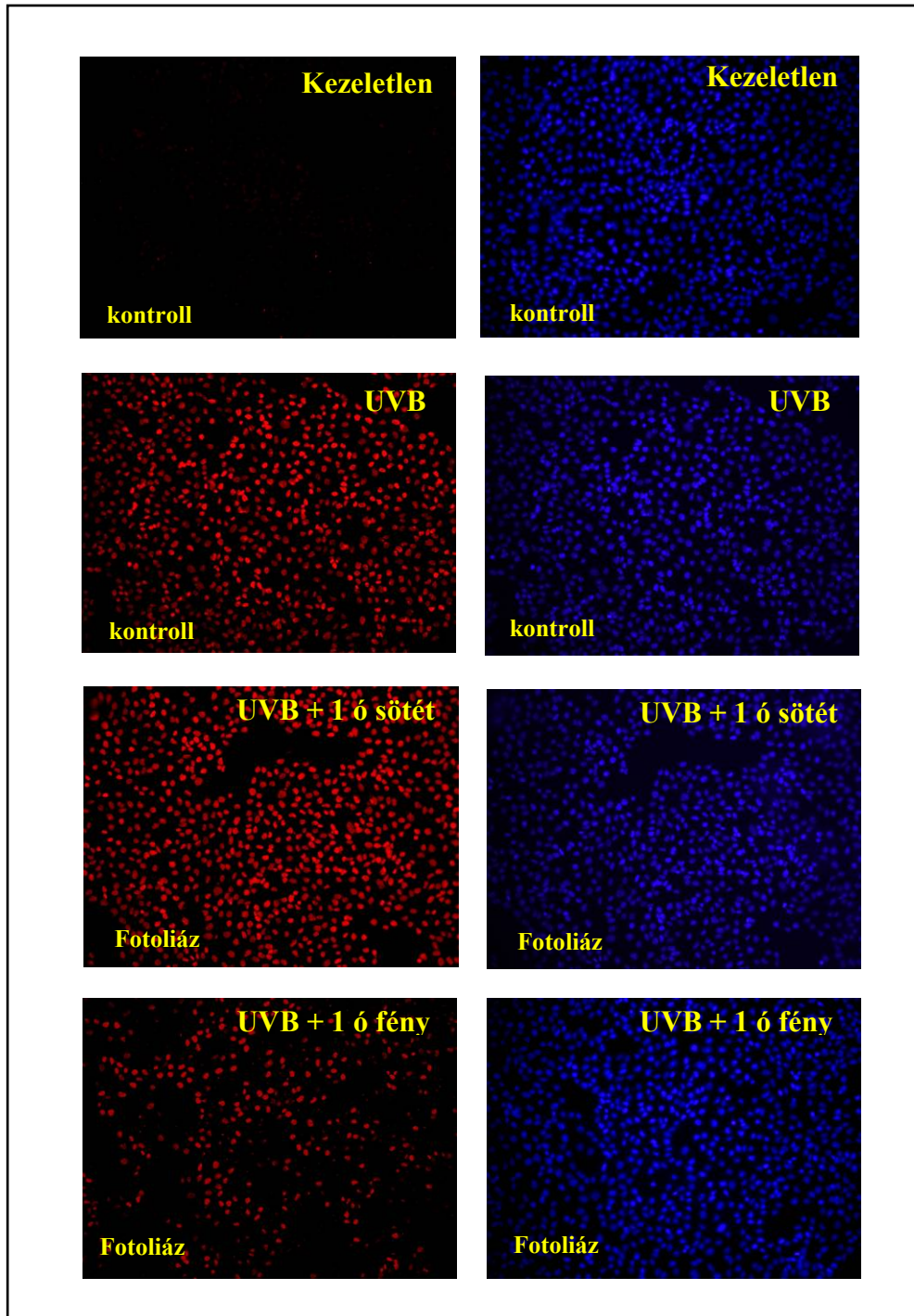
(A) A CPD fotoliáz reprezentatív western blot analízise a Ψ -CPD-PL mRNS-el transzfektált HaCaT sejtekben. A sejtliázatok a transzfekciót követő 20, 48 és 72. órában készültek. Normalizálásra a β -aktin fehérjét használtuk. (B) A CPD fotoliáz immunfluoreszcens detektálása a Ψ -CPD-PL mRNS-el transzfektált HaCaT sejtekben a transzfekciót követő 20. órában (40x nagyítás).

3.2. Fotoreparáció a HaCaT sejtekben

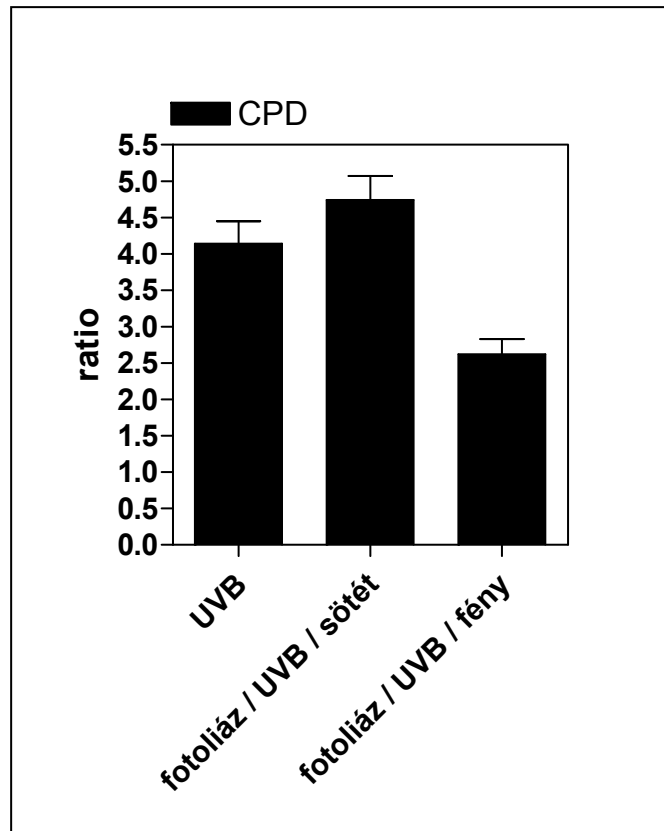
Az UVB indukálta fotoléziók, mint például a CPD-k, javítására a fotoreparáció (fotoreaktiváció) az egyik leghatékonyabb mechanizmus. A HaCaT sejteket fotoliáz mRNS-sel transzfektáltuk, 20 órával a transzfekció után $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB sugárzásnak tettük ki, majd rögtön fotoreaktiváltuk a sejteket 1 órán keresztül, illetve a sejtek másik részét sötétben tartottuk. A fotoliáz működését immuncitokémia és ELISA módszer segítségével vizsgáltuk. Immuncitokémiával az UVB kezelt sejtek magjában kimutattuk a CPD-ket, míg a kezeletlen sejtek magjában nem (4. ábra/A). A fotoreaktivált sejtekben a CPD-k száma csökkent a sötétben tartott sejtekhez képest, bizonyítva azt, hogy a Ψ -CPD-PL mRNS által kódolt fehérje funkcionálisan aktív a keratinocita sejtekben (4. ábra/A). ELISA módszerrel kvantitáltuk a CPD-k mennyiségét és kimutattuk, hogy a fotoliáz a léziók 50 %-át javította ki a sötétben tartott mintákhoz képest (4. ábra/ B). Az Ψ -eGFP mRNS-sel transzfektált mintákban a CPD-k javítása nem történt meg (az adat nincs bemutatva).

Eredményeink azt mutatják, hogy a CPD fotoliáz fény-függő reparáció (fotoreaktiváció) során szignifikánsan csökkenti a CPD-k mennyiségét az UVB irradiált keratinocitákban.

A.



B.

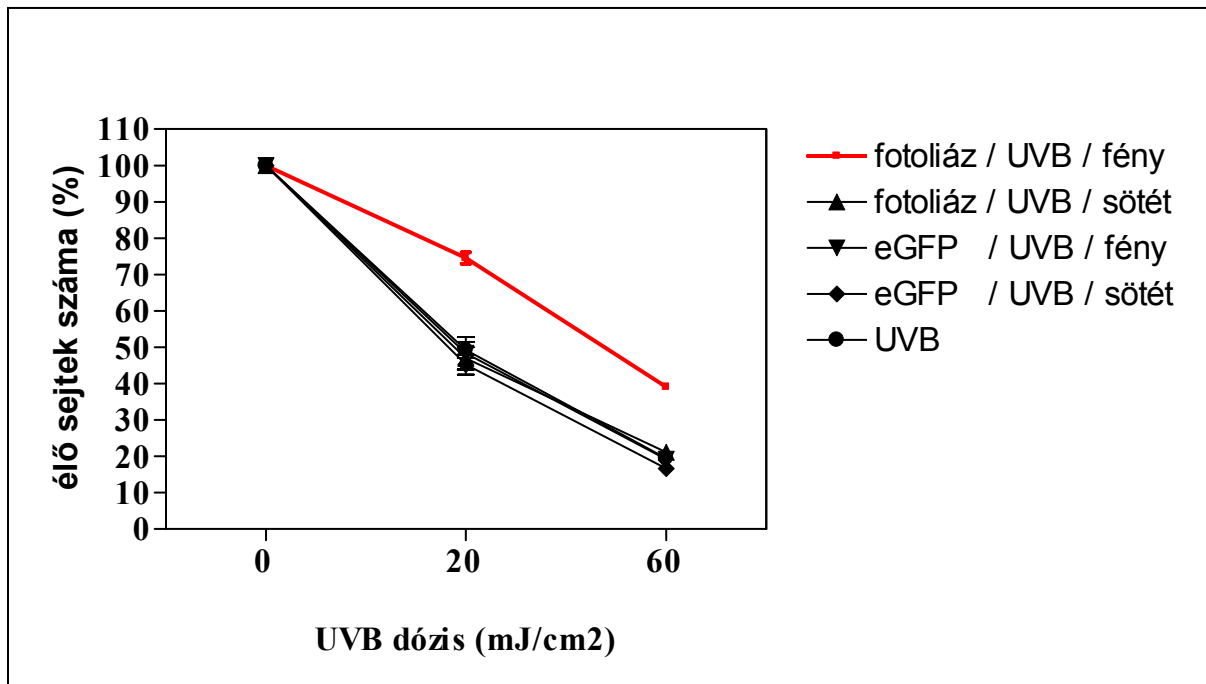


4. ábra: Az UV-indukált CPD-k javítása és relatív kvantitálása fotoreparáció után

A fotoliáz mRNS-sel transzfektált HaCaT sejteket 20 órával a transzfekciót követően 20 mJ/cm² UVB dózissal sugaraztuk be, majd azonnal fotoreaktiváltuk őket 1 órán keresztül. (A) A CPD fotoléziókat immunfluoreszcenciával detektáltuk. Minden minta 1-1 reprezentatív mezőjét mutatjuk be. A CPD-eket Alexa- 568-cal, a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. (B) A CPD dimerek relatív mennyiségének mérése ELISA módszerrel történt. Az eredmény a CPD-k mennyiségét mutatja a nem UVB kezelt, nem mRNS transzfektált sejtekhez képest. Az adat két független kísérlet eredménye.

3.3. Az UVB indukált CPD-k fotoreparációjának hatása a sejtek proliferációjára

A továbbiakban a fotoliáz hatását vizsgáltuk a keratinociták proliferációjára. A fotoreaktivált sejtekben megtörtént a CPD-k gyors javítása, ami szignifikánsan gátolta a sejtek proliferációjának csökkenését, még nagyobb UVB dózis mellett is. A sötétben tartott és csak UVB kezelt sejteknél viszont antiproliferatív hatást mutattunk ki, ami az eGFP-t tartalmazó keratinocitákra is jellemző volt. Az eredményeink azt mutatják, hogy a fotoreaktiváció szignifikánsan csökkentette az UVB dózisok antiproliferatív hatását.



5. ábra: A CPD-k hatása fotoliáz és eGFP mRNS transzfektált HaCaT sejtek életképességére növekvő UVB dózisok mellett fotoreaktivációt követően és anélkül.

A HaCaT sejteket fotoliáz mRNS-sel transzfektáltuk, majd 20 órával a transzfekció után 20 mJ/cm² és 60 mJ/cm² UVB sugárzásnak tettük ki, ezután rögtön fotoreaktiváltuk őket 1 órán keresztül, illetve a sejtek másik részét sötétben tartottuk. Az eGFP mRNS transzfektált sejteket kontrollként használtuk.

4. Összefoglalás

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az *in vitro*-szintetizált mRNS biológiailag igen stabil és magas translációs hatékonysággal rendelkezik, ráadásul nincs toxikus hatással a keratinocitákra. Eredményeink azt mutatják, hogy még kis mennyiségű mRNS (0.25 µg/well) bejuttatása mellett is transzlálódik róla funkcionálisan aktív fehérje a transzfekciót követően 20 órával. Kimutattuk, hogy UVB kezelés után a fotoreaktivált sejtekben a CPD-k száma legalább 50%-kal csökkent a kontroll mintákhoz képest. A CPD léziók nagy részének reparációja fotoliáz mRNS segítségével jelentősen mérsékelte az UVB sugárzás antiproliferatív hatását. Az általunk használt, fotoliáz kódoló, kémiai módosított mRNS hatékonyan javította az UVB indukálta DNS károsodásokat humán keratinocitákban, és ígéretes eszköz lehet a bőrrák megelőzésében. Az *in vitro*-szintetizált mRNS-alapú, más dermatológiai betegségekhez kapcsolt fehérjék expressziója fontos szerepet tölthet be az adott betegség gyógyításában.

Referenciák

- 1. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility.**
Noussipiel T.
Cell Mol Life Sci. 2009 Mar;66(6):994-1009.
- 2. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.**
Sancar A.
Chem Rev. 2003 Jun;103(6):2203-37. Review.

3. Dynamics and mechanism of repair of ultraviolet-induced (6-4) photoproduct by photolyase.

Li J, Liu Z, Tan C, Guo X, Wang L, Sancar A, Zhong D.
Nature. 2010 Aug 12;466(7308):887-890.

4. Femtosecond dynamics of flavin cofactor in DNA photolyase: radical reduction, local solvation, and charge recombination.

Wang H, Saxena C, Quan D, Sancar A, Zhong D.
J Phys Chem B. 2005 Feb 3;109(4):1329-33.

5. CPD-photolyase adenovirus-mediated gene transfer in normal and DNA-repair-deficient human cells.

Chiganças V, Sarasin A, Menck CF.
J Cell Sci. 2004 Jul 15;117(Pt 16):3579-92.

6. Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice.

Schul W, Jans J, Rijksen YM, Klemann KH, Eker AP, de Wit J, Nikaido O, Nakajima S, Yasui A, Hoeijmakers JH, van der Horst GT.
EMBO J. 2002 Sep 2;21(17):4719-29.

7. UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells.

Nakajima S, Lan L, Kanno S, Takao M, Yamamoto K, Eker AP, Yasui A.
J Biol Chem. 2004 Nov 5;279(45):46674-7.

8. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells.

You YH, Lee DH, Yoon JH, Nakajima S, Yasui A, Pfeifer GP.
J Biol Chem. 2001 Nov 30;276(48):44688-94.

9. Photorepair prevents ultraviolet-induced apoptosis in human cells expressing the marsupial photolyase gene.

Chiganças V, Miyaji EN, Muotri AR, de Fátima Jacysyn J, Amarante-Mendes GP, Yasui A, Menck CF.
Cancer Res. 2000 May 1;60(9):2458-63.

10. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability.

Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D.
Mol Ther. 2008 Nov;16(11):1833-40.