

Kísérletes szekció előadásai

Emri Eszter, Emri Gabriella dr.¹, Egervári Kristóf dr.²,
Beke Livia dr.², Rózsa Dávid¹, Miko Edit¹, Boros Gábor¹,
Nagy Georgina¹, Várvölgyi Tünde dr.¹, Veress Imre dr.¹,
Méhész Gábor dr.², Remenyik Éva dr.¹:

A metallothionein-expresszió melanómában: tumorbiológiával és immunválasszal összefüggést mutató független biomarker
(Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum,
Bőrgyógyászati Klinika, Debrecen¹, Patológiai Intézet, Debrecen²)

Melanoma malignumban az áttétképződés és szisztémás terápia hatékonysága függ a tumorsejtek jellemzőitől, mint mitotikus aktivitás, apoptózis rezisztencia, a sejtheadhéziós tulajdonságok megváltozása, illetve a szervezet immunválaszától. Kevés olyan tanulmány van, ahol egyidőben vizsgálták a tumor invazivitás és a kapcsolatos immunválasz markereit fehérje szinten ugyanazon tumorszöveti mintán. Az utóbbi években írták le, hogy a metallothionein (MT)-expresszió megváltozása nemcsak az emlő, a prosztata, vagy a májrák esetén prognosztikai faktor, de melanómában is jelentőséggel bír, az over-expresszió a beteg túlélési idejének csökkenésével kapcsolatos. Ennek ellenére nem vált széles körben használt prognosztikai tényezővé, leginkább azért, mert nincsenek megerősítő vizsgálatok. Ami miatt ez mégis indokolt, hogy a MT funkcióját tekintve egyrészt antioxidáns, másrészt, mint cink-transzporter, transzkripció faktorok és cink-dependens enzimek működését szabályozó molekula, ezek által a tumorsejtek növekedését, apoptózis-rezisztenciáját egyaránt befolyásolja. Ismert a MT-expresszió és az immunrendszer működésének összefüggése is, de egyelőre nem egyértelmű az összefüggés iránya. Az UV-sugárzás szerepe ismert a melanoma kialakulásában és humán bőrben a krónikus napfény hatására megváltozott MT-expressziót írtak le, így ebből a szempontból is érdekes lehet ennek a fehérjének a vizsgálata.

Jelen projekt keretében tissue microarray analízissel vizsgáltuk klinikánk archivált, áttétet nem adó és haematogén áttétet adó primer kután melanómáiból (n = 47) származó szövettani anyagain a MT-expressziót, ezzel párhuzamosan pedig tumorral asszociált makrofágok (CD68, CD163) és dendritikus sejtek (DC-SIGN, CD1a) jelenlétét. Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a MT-expresszió szignifikánsan nagyobb arányban fordult elő metasztatikus melanómában a Breslow tumorvastagságtól függetlenül. Szignifikánsan gyakoribb volt a CD68⁺ és CD163⁺ makrofágok intratumorális jelenléte is az áttétes melanómákban, míg a CD1a⁺ sejtek peritumorális előfordulása volt gyakoribb a nem áttétes primer daganatokban. Pozitív korrelációt figyeltünk meg a tumor MT pozitivitás és a tumorinfiltráló CD68⁺ makrofágok jelenléte, illetve a peritumorális MT⁺ és CD1a⁺ sejtek között.

Lengyel Zsuzsanna dr.¹, Nagy András dr.², Csernus Valér dr.²,
Battyáni Zita dr.¹:

Cirkadián órágének: per1, per2, clock, és cry1 expressziója melanómában

(Pécsi Tudományegyetem, Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika, Pécs¹, Pécsi Tudományegyetem, Anatómiai Intézet, Pécs²)

Epidemiológiai és genetikai vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a közel 24 órás periódusú biológiai szabályozás (cirkadián ritmus) zavara elősegíti a tumorképződést. Vizsgálatunkban melanómából és mellette lévő normál bőrből vett mintákon elemeztük az órágének – per1, per2, clock és cry1 – expresszióját qRT-PCR módszerrel. Az eredményeket összevetettük a melanoma hisztopatológiai jellemzőivel, lehetséges összefüggést keresve. Eredményeink azt mutatták, hogy per1, per2, clock és cry1 mRNS mennyisége mérsékelten alacsonyabb a melanómában, mint a mellette lévő normál bőrben. A vizsgált órágének közül a clock és cry1 órágének mRNS mennyiségek reciprok összefüggést mutatnak a melanoma következő hisztopatológiai jellemzőivel: Breslow vastagság, mitotikus aktivitás, ulceráció és tumor lokalizáció.

Liszky Gabriella dr., Plótár Vanda dr., Serester Orsolya dr.:

BRAF mutáció melanoma malignumban

(Országos Onkológiai Intézet, Budapest)

Az onkogén BRAF mutáció előfordulási gyakorisága melanoma malignumban mintegy 40-60%. Ha mutáció kimutatható, célzott kezeléssel a konvencionális kemoterápiánál mintegy kilencszeres objektív válaszarány érhető el.

A mutáció gyakoriságát különböző lokalizációjú és etiológiájú, szövettani típusú melanómáknál, valamint azok metasztázisainál vizsgáltuk melanoma malignum miatt kezelt betegeinknél.

37 primer melanománál és metasztázisnál valós idejű PCR és olvadáspont analízist végeztünk formalin fixált paraffinba ágyazott mintákból izolált DNS-ből BRAF mutáció kimutatására.

A 37 primer tumorból 21-nél (57%) találtunk BRAF mutációt. 28 UV sugárzással összefüggésbe hozható melanómából 18 (64%) bizonyult mutánsnak, míg a napfénnel nem érintkezett területekről kiinduló melanómáknál mindössze 3 (33%) volt BRAF mutációt hordozó (p=0,075). 13 szuperficiálisan terjedő melanoma vizsgálatakor 7 esetben (54%) találtunk BRAF mutációt, 11 noduláris melanómából 8 (75%), 4 lentigo maligna melanómából 3 (75%) míg 3 nyálkahártyából kiindult tumornál 1 (33%), 3 acralis melanománál szintén 1 (33%) esetben mutattunk ki mutációt. Mindhárom dezmoplasztikus melanoma vad típusú volt. 21 BRAF mutációt hordozó primer tumor metasztázisából 14 esetben (66%) igazoltuk a mutációt. A 16 BRAF mutációt nem hordozó, vad típusú primer tumor metasztázisának felében 8 (50%) kimutattunk BRAF mutációt.

A melanoma malignum komplex onkológiai diagnosztikájának és korszerű terápiajának a közeljövőben elengedhetetlen része lesz a tumor BRAF mutációjának ismerete. Nem elegendő azonban a primer daganat vizsgálata, hiszen a primer tumor és a metasztázis – mint tanulmányunkban is kimutattuk – BRAF mutáció tekintetében is különbözhet.

Miko Edit^{1,2}, Remenyik Éva dr.¹, Scholtz Beáta dr.²:

A mikroRNS-ek és lehetséges szerepük a tumoros fenotípus kialakításában

(Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,
Bőrgyógyászati Klinika, Debrecen¹, Biokémiai és Molekuláris
Biológiai Intézet, Klinikai Genomika Központ, Debrecen²)

A mikroRNS-ek (miRNS) rövid, 18-24 nukleotid hosszúságú, egyszálú, nemkódoló RNS molekulák, melyek a génexpresszió szabályozásában vesznek részt. A target mRNS-hez kapcsolódva gátolják azok transzlációját, illetve bizonyos esetekben az mRNS degradációját váltják ki. A miRNS-ek számos sejtbioológiai folyamatban részt vesznek, mint például a fejlődés, differenciáció, proliferáció és apoptózis.

Az elmúlt néhány év kutatási eredményei azt mutatják, hogy a miRNS-ek szerepet játszanak a tumorok kialakulásának, differenciálódásának folyamatában is. A tumorbiológiában betöltött szerepüket alátámasztja az a tény is, hogy az ismert miRNS-ek nagy százaléka olyan genomi régiókban található, melyek tumorokban amplifikálódnak vagy deletálódnak. Ma már számos daganattípusban kimutatták a miRNS-ek aberráns expresszióját, valamint azt is, hogy számos tumorgátló gén, illetve onkogén szabályozásában is részt vesznek. Ismert az is, hogy fontos szereppel bírnak a bőr morfogenezisének, homeosztázisának szabályozásában és aberráns expressziójuk számos bőrbetegség kialakulásához vezethet. A miRNS-ek pontos szerepének megértése az egyes daganattípusok progressziójában és metasztázis képzésében hozzájárulhat a miRNS-ek terápiai alkalmazásához.

Boros Gábor¹, Miko Edit¹, Rózsa Dávid¹, Emri Eszter¹,
Nagy Georgina¹, Juhász Attila dr.¹, Juhász István dr.¹,
Gijsbertus van der Horst dr.², Hiromi Muramatsu dr.³,
Drew Weissman dr.⁴, Karikó Katalin dr.³, Horkay Irén dr.¹,
Remenyik Éva dr.¹, Emri Gabriella dr.¹:

mRNS transzferáció segítségével elért fotoliáz szintézis *in vitro* humán keratinocita monolayeren

(Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Bőrgyógyászati Klinika, Debrecen¹, Department of Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam², Department of Neurosurgery, University of Pennsylvania, Philadelphia³, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia⁴)

Patogenetikai szempontból a bőrt érő egyik legjelentősebb környezeti hatás a napfény ultrabolya sugárzása, amelynek biológiai hatásai hullámhossztól függően eltérőek. Az UVB-sugárzás (280-320 nm) egyik legjelentősebb hatása, hogy a DNS-ben közvetlenül elnyelődve ciklobutan pirimidin dimereket (CPD) indukál. A CPD-k a legkárosabb és leggyakoribb UVB-okozta DNS-léziók közé tartoznak. A CPD fotoliáz egy igen gyors és fényfüggő reakcióban képes kijavítani ezeket a fotoproduktumokat, de ez az enzim hiányzik a méhlepényes emlősekből. Jelen tanulmányban bemutatunk egy új mRNS-alapú génterápiás módszert, amelynek segítségével funkcionális fotoliáz szintetizáltunk humán keratinocita sejtekben. A *Potorous tridactylus* fotoliáz génjét kódoló mRNS-t *in vitro* transzkripcióval hoztuk létre. A szekvencia kodon-optimalizálásával, valamint az mRNS-be történő nukleozid módosítások, hosszú poly(A) farok és cap1 struktúra beépítésével magas transzlációs hatékonyságot, és biológiai stabilitást értünk el. Az mRNS-t tranziens transzferációval juttattuk be HaCaT sejtekbe és normál humán epidermális keratinocitákba, amelyekben a kódolt fotoliáz western blot és immuncitokémia (ICC) segítségével detektáltuk a transzferációt követően különböző időpontokban. Annak vizsgálatára, hogy a fotoliáz funkcionálisan aktív-e, az mRNS transzferált sejteket 20 mJ/cm² UVB dózissal tettük ki, majd rögtön fotoreaktiváltunk egy óráig, vagy sötétben tartottuk a sejteket. ELISA és ICC módszerek felhasználásával azt figyeltük meg, hogy a fotoreaktivált sejtekben a CPD-k száma 50%-kal csökkent, a fotoliáz aktivációjához szükséges energiaforrást nélkülöző sejtekhez képest. A fotoreaktiváció még a 60 mJ/cm² UVB dózis antiproliferatív hatását is szignifikánsan csökkentette, növelve a sejtek életképességét. A keratinocitákba juttatott fotoliáz mRNS megfelelő lehetőség az UVB-indukált CPD léziók eltávolítására ezekben a sejtekben, így terápiás alkalmazásának megteremtése fontos lépésszok lehet a bőrdaganatok megelőzésében.

Manczinger Máté dr.¹, Vörös Andrea dr.², Kemény Lajos dr.¹

Nagy István dr.², Lakatos Lóránt dr.¹

Candida albicans és PK E6/E7 vaginalis epithelialis sejtvonal kölcsönhatásának vizsgálata

(Szegedi Tudományegyetem, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika, Szeged¹, BZAKA BAYGEN: Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiák Intézet, Szeged²)

Mind a systemás, mind a lokális candidiasis egyre gyakrabban fordul elő az primer, szekunder és a terápiás kezelés során immun-szuprimált állapotban lévő betegek számának növekedésével. A betegség vizsgálatára eddig nem állt rendelkezésünkre megfelelő betegségmodell. Célunk volt egy, a vaginalis candidiasist jól modellező rendszerben a betegség kialakulását vizsgálni humán és pathogén oldalról egyaránt.

RNA-seq vizsgálatot végeztünk, melyhez a mintát a következő állapotokból vettük: 1. C. albicans sarjadzó, nem pathogén állapotban keratinocita táptalajban (0. időpillanat) 2. C. albicans hifázó, pathogén állapotban keratinocita táptalajban (3 óra elteltével) 3. C. albicans hifázó, pathogén állapotban + PK E6/E7 vaginalis epithelialis sejtek (betegségmodell) 4. PK E6/E7 sejtek 0. időpillanatban keratinocita táptalajban 5. PK E6/E7 sejtek 3h elteltével keratinocita táptalajban. A mintákból RNS-t izoláltunk, majd RNA-seq használatával transzkriptóma analízist végeztünk. A változások szignifikanciáját MA-plót módszerrel állapítottuk meg. A géneket változásuk alapján csoportokba osztottuk és funkcionálisan annotáltuk őket.

C. albicansban a szignifikánsan változó gének közül 1476 sejtet jelenlétében és azok hiányában is változik, míg 619 és további 436 genomi lókuszt sejt specifikus változást mutat. Ezen gének nagy része alapvető sejtéleti folyamatokban szerepelnek.

Eredményeink alapján a gomba pathogenitáshoz nem elég csupán a morfológiai változás, további 619 gén sejt specifikus expresszió-változása történik meg a gazda-pathogén interakció során. Ezek további vizsgálatával új pathogenitási faktorok megismerésére nyílik lehetőségünk.

Bognár Péter dr.¹, Németh Ilona¹, Hársing Judit dr.¹,

Mazán Mercédesz^{1,2}, Paulsson Mats dr.⁴, Smyth Neil dr.⁴,

Buzás Edit dr.³, Kárpáti, Sarolta dr.¹, Temesvári Erzsébet dr.¹:

További bizonyítékok a bőr barrier funkciójának károsodására transglutamináz 3 (TGM3) knockout egértörzsön fluorescein-izotiocianáttal (FITC) végzett szenzibilizációs kísérletek során

(Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika, Budapest¹, Magyar Tudományos Akadémia, Molekuláris Biológiai Kutatócsoport, Budapest², Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Budapest³, Center for Biochemistry and Center for Molecular Medicine, Cologne, University of Cologne⁴)

Számos, a normál bőr barrier funkció kialakításához szükséges struktúrfehérjét és enzimet ismerünk, melyek hiánya, vagy abnormis szerkezete a barrier funkció sérülésén keresztül percutan szenzibilizációra hajlamosít.

Korábban már igazoltuk, hogy a TGM3 knockout, fluorescein-izotiocianáttal (FITC) kezelt egerek esetében nagyobb arányban és mértékben alakul ki FITC re-expozíciókor fülvastagodás („mouse ear swelling test”, MEST) ill. kontakt dermatitis, melynek hátterében nem megfelelő barrier funkció állhat.

Jelen kísérleteinkben a FITC-el történt szenzibilizációt követően, a drenáló nyirokcsomókban az aktivált CD4, CD25 pozitív T-sejtek arányát vizsgáltuk flow-cytometriás analízissel, egyúttal RT-PCR módszerrel mértük az IL4, IL12, GATA3, IFN- γ gének expresszióját.

A FITC-el 24 óráig tartó epicutan occlusioban alkalmaztuk a kísérlet első és hetedik napján, a re-expozíció a 15. napon a fülek ecsetelésével történt, melyet 24, ill. 48 óra múlva a fülek vastagságának mérése, majd hematoxillin-eosin ill. toluidin-kék festéssel végzett szövettani vizsgálata követett. A TGM3 knockout egérpopulációban a MEST értékek szignifikánsan magasabbak voltak, ezzel összhangban a gyulladás szövettani jelei kifejezettebbnek mutatkoztak, mint a vad genotípus esetében.

A FITC-el kezelt TGM3 knockout egerek esetében a drenáló nyirokcsomókban mért aktivált T-sejtek aránya szignifikánsan magasabbnak mutatkozott, mint a vad típus esetében, ugyanakkor az IL4, IL12, IFN- γ , GATA 3, HGPRT housekeeping génhez viszonyított expressziójában nem mutatkozott különbség a knockout és vad genotípusú egerek között.

A TGM3 knockout, FITC-cel kezelt egerek nyirokcsomóiban tapasztalt, emelkedett aktivált T-sejt populáció arány megerősíti a korábban MEST, ill. hisztológiai vizsgálatok során észlelteket, a kifejezettebb gyulladás károsodott barrier funkciót jelez.

A fenti adatok további bizonyítékot szolgáltatnak azon feltételezésünk igazolására, hogy a funkcionálisan intakt bőr barrier kialakításához ezen egértörzs esetében az epidermális transzglutamináz (TGM3) is kulcsfontosságú.

novi kizárta az
TGM3-t

Nagy Georgina¹, Gáspár Krisztián dr.^{1,2} Törőcsik Dániel dr.¹,
Doan Xuan Quang Minh dr.¹, Bacso Zsolt dr.³, Remenyik Éva dr.¹,
Szegedi Andrea dr.^{1,2}:

Myeloid dendritikus sejtek szerepének vizsgálata az atopiás dermatitisre jellemző effektor T sejt polarizáció kialakításában

(Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Bőrgyógyászati Klinika, Debrecen¹, Bőrgyógyászati Allergológiai Tanszék, Debrecen², Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen³)

Az atopiás dermatitis (AD) egy krónikus, gyulladásos bőrbetegség, mely a fejlett országokban egyre növekvő gyakorisággal van jelen. A betegségre a bőrben akut fázisban, a perifériás vérben mind akut és krónikus fázisban Th2 dominancia jellemző. Emellett