

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az UV-indukálta DNS károsodás válasz és a cink homeosztázis
szerepe bőrgyógyászati kórképekben**

Emri Eszter

Témavezető: Prof. Dr. Remenyik Éva, az MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK
DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2015

Az UV-indukált DNS károsodás válasz és a cink homeosztázis szerepe bőrgyógyászati kórképekben

Értekezés a doktori (PHD) fokozat megszerzése érdekében az *egészségtudományok* tudományágban

Írta: **Emri Eszter**, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája (Megelőző orvostan és népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Remenyik Éva, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Gyulai Rolland, PhD

Dr. Oláh Judit, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem NK, Megelőző Orvostani Intézet tárgyalója, 2015. 11. 23. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Szabó Kornélia, PhD

Dr. Szűcs Sándor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Gyulai Rolland, PhD

Dr. Oláh Judit, PhD

Dr. Szabó Kornélia, PhD

Dr. Szűcs Sándor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme, 2015. 11. 23. 13 óra

BEVEZETÉS

A humán bőr szerkezete és funkciói

A bőr, a test kültakarója, a teljes testtömeg 15-20%-át alkotja, felszíne 1,6-2,3 m². Három fő része: az epidermis, dermis és subcutis. A bőr külső rétege, az epidermis, ektodermális eredetű. Fő sejtalkotója, a keratinocita, vertikális differenciációs folyamaton megy keresztül és többrétegű elszarusodó laphámot alkot. A keratinocita differenciáció utolsó lépése a stratum corneumot adja, a legkülső barriert a környezeti behatásokkal szemben. Az epidermis öt rétegre osztható: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum, stratum corneum. Az epidermis további alkotói a melanociták, Langerhans sejtek és a Merkel sejtek. A melanociták a stratum basale sejtei között találhatóak, dendritikus sejt-morfológiát mutatnak, neuroektodermális eredetűek és a melanin pigment termeléséért felelősek. A Langerhans sejtek, melyeket a Birbeck-granulumok jellemeznek, a stratum basale és stratum spinosum rétegeiben helyezkednek el. Ezek a sejtek mesenchymális eredetűek és a monocyták-makrofág rendszer tagjai, mint antigénprezentáló sejtek. A Merkel sejtek a stratum basale rétegében helyezkednek el és idegvégződésekkel kapcsolódnak. A dermis 3 mm vastagságú kötőszövet az epidermis alatt. Két rétegből áll: stratum papillare, stratum reticulare. A subcutis laza kötőszövetből és zsírsejtekből áll, illetve vérereket és idegeket is tartalmaz. A bőr számos funkciót betölt, mint védelem, homeosztázis, érzékszerv, szekréció, excretio, hőszigetelés, tápanyagraktár és immunreguláció.

UV-irradiáció, fénykárosodás és biológiai következményei, az UV-indukált bőrkárosodás klinikai aspektusai, a bőr fénykárosodásának rövidtávú és hosszútávú hatásai, nonmelanoma bőrdaganatok és melanoma

A solaris UV expozíció egyike a legfontosabb környezeti tényezőknek, amik a bőr fiziológiájára hatnak. Az UV sugárzás, az elektromágneses spektrum 200-400 nm hullámhossz-tartománya, a napsugárzás nagyenergiájú összetevője. Az UV a hullámhossz alapján három tartományra osztható. Az UVB sugárzás (290-320 nm) 1-10%-a éri el a Föld felszínét. Az UVB sugarak főként az epidermis sejtjeiben nyelődnek el. Toxikus hatásai elsősorban a fotonok DNS-ben történő direkt abszorpciójából adódnak. Az okozott DNS károsodás az egyazon szálon a szomszédos bázisok között kialakuló dimer fotoproduktumok képződése. A pirimidin-dimerek két formája a ciklobután-pirimidin-dimer (CPD) és a pirimidin-(6-4)-pirimidon fotoproduktum (PP). Emellett az UVB károsítani tudja a fehérjéket, a sejtmembránt is, oxidatív stresszt indukálva. Belső és külső stressz hatásra (pl. a genomi

DNS UV által okozott károsodása, szuboptimális növekedési feltételek) az osztódó sejtekben ún. sejtciklus ellenőrzőpontok aktiválódnak, lehetővé téve a stressz érzékelését és az arra adott stressz választ. A sokféle DNS-lézióval a sejtek komplex DNS károsodás válasz (DDR) kialakítása révén küzdenek meg, ami számos különböző DNS reparációs útvonalat magában foglal, pl. a nukleotid excíziós reparációt (NER), ami által a CPD és a (6-4)PP javítódnak. Az ellenőrzőpontok által okozott sejtciklus gátlás feloldódik, ha a károsodás kijavításra került, míg a kijavíthatatlan DNS-léziókat tartalmazó sejtek végleges sejtciklus késleltetést vagy sejthalált szenvednek el.

1. Apoptosis: az UV sugárzás által generált reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) szolgálnak iniciátorként az apoptoticus intrinsic útvonalának aktiválásában, ahol a ROS mitokondriális károsodást okoz. Az UV emellett sejthalál-receptorokat (CD95/Fas, TRAIL, és TNFR1) aktivál ligandok autocrin felszabadulása révén vagy ligand-független módon. Ezért az UV extrinsic apoptoticus útvonalat is indukál. A korai apoptoticus sejteket a megtartott membrán integritás jellemzi, szemben a kései apoptoticus sejtekkel, amelyeknek a sejtmembránja sérült, hasonlóan a necrotikus sejtekhez, amelyeknek nincs intakt membránja, valószínűleg a pro-inflammatorikus intracelluláris tartalom kiszabadulása miatt.
2. Necrosis: ez egy nem-apoptoticus sejthalál. Az apoptoticus a sejthalálnak egy csendes formája, az intakt sejtek eltűnnek fagocitotikus felvétel által, immunstimuláció nem történik. Ezzel szemben, a necrosis rendszerint a plazmamembrán integritásának a korai felbomlásával jár, ami pro-inflammatorikus sejt-komponensek felszabadulását teszi lehetővé, és immunstimulációhoz vezet. Ezért a két folyamat közötti egyensúly alapvető szerepet játszik abban, hogy vajon a sejt-károsodás és -pusztulás okoz-e produktív immunválaszt vagy sem. Más folyamatok, amelyek szerepet játszanak a sejthalál útvonalakban, az autophagia és a senescencia.

A napégés (erythema), az immunszuppresszió és a barnulás (pigmentáció) az UV exponált normál humán bőr azonnali válaszai; ezek a bőrkárosodás rövidtávú hatásai. Az UVB a leghatékonyabb UV-tartomány az erythema indukcióban, emellett az UVB immunszuppressziót is indukál, illetve melanogenezist (ún. barnulási választ). A hosszútávú hatásokat tekintve, a napfény UVB-tartományának kiemelkedő jelentősége van a fotokarcinogenezis vonatkozásában. Epidemiológiai és molekuláris bizonyítékok is a bőrdaganatok összes formáját az UV-hoz kötik, és az UV felelős a melanomák kb. 65%-áért és a nonmelanoma bőrdaganatok 90%-áért. Az UVB a fő karcinogén ágens a nonmelanoma bőrdaganatok, mint a laphámsejtes karcinoma (SCC) és a bazálsejtes karcinoma (BCC)

kialakulásában, és oki szerepét feltételezik malignus melanomában (MM) is. A kután malignus melanoma (CMM) a bőrrákok legveszélyesebb formája, az áttétképzésnek nagy a rizikója. A malignus melanomák nagy eséllyel alakulnak ki dysplasticus naevusokból, melyeket fiatalkori megjelenés jellemez. A CCM-nek négy fő típusát különböztetik meg: szuperficiálisan terjedő melanoma (SSM), noduláris melanoma (NM), acrolentiginosus melanoma and lentigo maligna melanoma. A tumor kiterjedésének és a metasztázis rizikónak a jellemzésére evidencia-alapú stádiumbesorolási rendszert használnak, jelenleg az American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2009 szerinti tumor-nyirokcsomó-metasztázis (TNM) rendszer van érvényben. Ez magában foglalja a primer tumor vastagságának, ulcerációjának, mitotikus rátájának értékelését. Korábban a Clark inváziós szint is szerepelt a stádiumbesorolási kritériumok között. Az AJCC klinikopatológiai stádiumbesorolási rendszer a prognózis szempontjából a betegeket rizikó kategóriákba sorolja, de a tumor heterogenitás miatt ez nem biztosít megfelelő prognózis meghatározást az egyedi beteg számára.

Ígéretes prognosztikai biomarkerek CMM-ben, a CMM a tumor immunológia szempontjából

Immunhisztokémiailag detektálható szövet-alapú prognosztikus fehérje biomarkerek: Számos lehetséges fehérje biomarkert írtak le, melyek statisztikailag szignifikáns összefüggést mutatnak a melanoma-specifikus mortalitással és a betegségmentes túléléssel. Ígéretes fehérje biomarkerek, a klinikopatológiai paraméterektől független prognosztikai jelentőséggel: az AP-2, ATF-2, NCOA3, PRKCA, Bcl-2, Survivin, CEACAM-1, CXCR4, CD44, MCAM, L1-CAM, MMP2, OPN, Tenascin-C, tPA, HMB45, iNOS, p16/INK4A, p27, CyclinA, MAP-2, Metallothionein (MT), p53, Ki67, bFGF, β -Catenin, Bcl-6, Dysadherin, HNK-1, HIF2alfa, GADD153, Melastatin, MITF, p-Akt, RGS1, RUNX3, RBM3, PUMA és a PHH3. Ugyanakkor, ezek közül még egyet sem vezettek be a rutin klinikai gyakorlatba, mert a vizsgálati eredményeket validálni kell.

A heterogenitás mellett, a CMM-et az immunogenitás is jellemzi. Számos klinikai vizsgálat kapcsolódik az immunrendszer aktivációhoz melanomában, és ezek a megfigyelések erős bizonyítékokat szolgáltatnak arra, hogy az immunrendszer természeténél fogva reagál a melanomára, képes azt akár el is pusztítani vagy kontrollálni. A daganat progresszió során azonban a tumor remodellálja a mikrokozonyetét. A párbeszéd a melanomasejtek és a környező sejtek között elősegíti a metasztázisképződést az angiogenezis, invázió, migráció, és egy másodlagos szervben történő kolonizáció elősegítése révén. Szükség van a CMM egy

sokkal pontosabb jellemzésére, beleértve a tumor mikrokörnyezetet is, hogy jobban megértsük a tumor egyedi viselkedését és személyre szabott terápiát biztosíthassunk.

A cink homeosztázis szerepe a bőrben

A cink esszenciális nyomelem, lényeges szerepe van az egészséges egyedfejlődésben és az egészség fenntartásában. A test cinktartalmának kb. 9%-a a bőrben van, elsősorban az epidermisben ($50\text{--}70 \mu\text{g g}^{-1}$ száraz tömeg). Jelentőségét a bőrben jól mutatja, hogy öröklött vagy szerzett cinkhiány esetén súlyos bőrtünetek, erythemás kiütések, hámló plakkok, fekélyek jelentkeznek, a cink bélből történő felszívódásának genetikai eredetű képtelensége esetén pedig az orificiális területekre és akrákra lokalizálódó súlyos dermatitis, az acrodermatitis enteropathica fejlődik ki. Szisztémás és lokális készítmények formájában a cink javítja a hajhullás, acné és súlyos gyulladáshoz vezető bőrbetegségek tüneteit.

A sejt cink homeosztázisának fenntartásában részt vesznek ZIP (Zrt-, Irt-like) fehérjék, melyek cinket transzportálnak a cytosolba és 14 izoformájuk ismert, illetve ZnT fehérjék, melyek cinket transzportálnak ki a cytosolból és 10 izoformájuk ismert. Becslés szerint a 32000 ismert génnek több mint 3%-a cink-fehérjét kódol. Több mint 300 cink-függő enzimet írtak le és karakterizáltak eddig. Pl. a cink-függő mátrix metalloproteinázok vesznek részt az extracelluláris mátrix struktúrféhrjéinek, mint a kollagének és az elasztinnak a hidrolizálásában; a „zinc-finger” fehérjék közül a DNS és RNS polimerázok szabályozzák a génextpressziót, ami által a cink kapcsolt a sejtproliferációval, a szuperoxid-dizmutáz antioxidáns aktivitása révén kapcsolt a redox homeosztázissal, az alkalikus foszfatáznak szerepe van a gyulladáshoz vezető folyamatok szupprimálásában. Ez utóbbival összefüggésben, a cink szorosan kapcsolt a gyulladással, amit az immunsejtek vizsgálata is alátámaszt. A cink befolyásolja a citokin felszabadulást is, ami kihat az immunsejtek közötti kommunikációra. A cink a sejtekben stabil $2+$ kationos formában van jelen, redox inert, nem vesz részt elektrokémiai reakciókban. Ennek ellenére, fontos résztvevője az oxidációs-redukciós történéseknek. Ugyanis a cink kötődése a fehérjékhez és leválása azokról dinamikus folyamat, amit a környezet redox viszonyai határoznak meg. Ez a cink transzporter MT-re is igaz, melynek ez által fontos szabályozó szerep jut, illetve a cinknek ez a jellemzője valószínűleg lényeges a proteinfunkciók cink általi szabályozásának megvalósulásában. A redox homeosztázis és a különböző fehérjefunkciók cink-függő szabályozásának szoros kapcsolódása fontos, finomhangolást lehetővé tevő kontroll mechanizmust biztosíthat a sejtekben, de ez eddig inkább csak biokémiai szinten volt bizonyítható, és nem vizsgálták

biológiai rendszerekben. Érdeemes megemlíteni, hogy a cink a szuperoxid-dizmutáznak is kofaktora, és a cinkhiány növeli az oxidatív stresszt.

Metallothionein, a cink szerepe az UV-indukált DNS károsodás válaszban és karcinogenezisben

A MT-ek alacsony mólsúlyú (6-7 kDa), magas cisztein-tartalmú fehérjék, melyek fémekkel komplexet alkotnak, bár az affinitásuk a különböző fémekre eltérő. Egy MT molekula hét cink-iont tud megkötni, és a cinkre nézve több nagyságrenddel magasabb kötőképessége által cink „muffler”-ként viselkedik. A MT/thionein pár megköt vagy elenged cinket a helyi redox viszonyoktól függően, ezáltal számos fehérje, transzkripciós faktorok és enzimek működését befolyásolja. Legalább 10 humán MT izoforma létezik. A legfőbb izoformák a MT I/II, melyek minden sejtben jelen vannak. A MT III és MT IV ritkább izoformák, csak specializált sejtekben fordulnak elő.

A cink hatása az UVB által indukált DNS károsodás válasza még nem tisztázott. Korábbi vizsgálatokból annyi ismert, hogy UVB irradáció után a keratinocitákban az intracelluláris cink-szint gyorsan megemelkedik, hogy a MT-szint az epidermisben akut UV expozíció után magasabb, illetve, hogy a MT knockout egerek bőre érzékenyebb az UVB toxicitásra. Továbbá, szerzett cink-deficiencia esetén a betegek bőrtüneteiben kimutatható fokozott apoptózis-arány arra utal, hogy a cinknek fontos szabályozó szerepe lehet a sejtthálál útvonalakban. Emellett, kóros MT fehérje expresszió mutatható ki különböző malignus bőrdaganatokban. A MT1E és MT1G epigenetikai downregulációját közölték nemrégiben CMM vonatkozásában, ám bár valamely MT izoforma tumorszuppresszor szerepére kísérletes bizonyíték még nincsen. Ezzel szemben, számos malignus daganatban a MT overexpresszálódik, és ez, úgy tűnik, korrelál a tumor progresszióval és a betegek alacsony túlélésével. Megnövekedett MT I/II protein szintet mutattak ki keratinocita- és melanocita-eredetű tumorokban is, ami korrelált a daganat-invázióval. Teljes tumor-metszeteket vizsgálva azt találták, hogy primer CMM tumorok magasabb MT I/II expressziója korrelál a tumor progresszióval, a tumorvastagsággal, az inváziós készséggel és az alacsony túléléssel. A MT I/II prognosztikai értékét magasabbnak találták, mint a sentinel nyirokcsomó pozitivitását. Ezért, a MT I/II ígéretes immunhisztokémiai prognosztikai faktor, ugyanakkor a szerepét a metasztázis képződésben még meg kell erősíteni, és bizonyos MT izoformák onkogén szerepére vonatkozó kísérletes bizonyíték is hiányzik.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az eddigi kutatási eredmények arra utalnak, hogy a MT expresszió upregulációja CMM-ben a betegek alacsonyabb túlélési esélyét jelző fontos és független prognosztikai tényező. Ugyanakkor, a MT még nem egy széles körben alkalmazott biomarker, mert nincsenek különböző munkacsoportok által egybehangzó eredmények, minthogy nem történtek ilyen vizsgálatok, ezért célunk volt a MT I/II fehérje expresszió retrospektív vizsgálata primer CMM mintákban tissue microarray (TMA) technika felhasználásával, összehasonlítva haematogén metasztázist nem adó és metasztatizáló melanomákat.
2. Célunk volt továbbá a melanoma szövetminták karakterizálása olyan immunhisztokémiai markerekkel is, melyek a tumor mikrokörnyezetet immunológiai szempontból jellemezhetik, és amelyeket korábban összefüggésbe hoztak a CMM prognózissal. Vizsgálni kívántuk, hogy a MT I/II fehérje expresszió hogyan viszonyul a rutinszerűen használt klinikopatológiai prognosztikai tényezőkhöz, illetve az immunológiai prognosztikai markerek festődési mintázatához.
3. A MTI/II tumorális expressziója és a tumor progresszió közötti összefüggés kapcsán szerettük volna mélyrehatóbban vizsgálni a MT és cink fiziológiás illetve patofiziológiás szerepét a bőrben. A bőr szempontjából fő környezeti károsító faktor az UVB sugárzás. Feltételeztük, hogy a cink homeosztázis befolyásolja az UVB-indukálta DNS károsodásra adott választ; ezért célunk volt nem-toxikus koncentrációjú Zn (II) expozíció humán keratinocyták sejtműködésére kifejtett hatásának in vitro vizsgálata konvencionális, illetve stressz körülmények között. Stresszként UVB-irradiációt alkalmaztunk.

Ezen vizsgálatok hozzájárulnak a bőr patogenezisének jobb megértéséhez, illetve új terápiás lehetőségek találásához.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Beteg kiválasztás szöveti microarray vizsgálatra

A DE Bőrgyógyászati Klinika archivált szövetblokkjain történt a vizsgálat. A betegeket retrospektív módon, az etikai szabályoknak megfelelően választottuk ki, figyelembe véve a betegség kimenetelt. Áttétet nem adó (n= 23, 1998-2003) és haematogén áttétet adó (n= 23, 1998-2006) primer melanomák formalin-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) szövetblokkjaiból hematoxin-eozin (HE) festett metszetek alapján szöveti microarrayt (TMA) készítettünk (6x10 multiblokk; d= 1 mm szövethengerek, TMA MasterTM, TMA Master, USA). Összehasonlításképpen naevus (n= 6) szövetmintákat is beillesztettünk a blokkokba. A multiblokkok sorozatmetszeteit használtuk immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatához, HE festéssel történt ellenőrzést követően.

Sejtenyésztés, UVB-irradiáció, és ZnCl₂ kezelés

A HaCaT humán keratinocitákat (ATCC) fetalis borjú szérummal (FBS) (10%), L-glutaminnal (2 mM), penicillin G-vel (100 U/ml), streptomycin-szulfáttal (0.1 mg/mL) és amphotericin B-vel (0.25 µg/mL) kiegészített, magas-glükóztartalmú DMEM sejtenyésztő médiumban (PAA, Traun, Austria) tartottuk fenn, 5% CO₂ atmoszférán, 37°C-on. Az irradiáció TL20W/12 RS széles-spektrumú, filterrel ellátott UVB-lámpával (280–370 nm, maximum 312 nm, Philips, Germany) történt, UV radiométer (UVP Inc., San Gabriel, USA) kontroll mellett 20 mJ/cm² dózist alkalmazva. Az UV-irradiáció idejére a médiumot PBS-re (phosphate-buffered saline) cseréltük, majd a besugárzást követően az eredeti médiumot tettük vissza a sejtekre. A cink expozíciós kísérletekben deionizált vízzel készített, 0,2-µm steril filteren átszűrt 0.1-M ZnCl₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) törzsoldatot használtunk, 100 µM végkoncentrációban (hacsak másképpen nem jelöltük).

Immunhisztokémia

Endogén peroxidáz blokkolást (1% H₂O₂-methanol, 20 perc, szobahő) követően citrát pufferes antigénfeltárás (10 mM, pH= 6) történt. Az alkalmazott primer antitestek (1 óra, szobahő): MT I/II – Dako, clone E9, 1:50; melan-A – Dako, clone A103, 1:50; DC-SIGN – R&D Systems, clone 120507, 1 µg/ml; CD68 – Dako, clone KP1, 1:100; CD163 – Novocastra, clone 10D6, 1:100; CD1a – Beckman Coulter, clone O10, 1:3. A reakció láthatóvá tételéhez az Envision/HRP detekciós rendszert (Dako) és VIP peroxidáz szubsztrát kitet (Vectorlabs) használtunk. A magfestés metilzölddel történt. A festődést a metszetek

digitalizálását (Pannoramic Viewer 1.15, 3DHISTECH Ltd.) követően, vakon értékeltük. A MT I/II expresszió jellemzésére szemikvantitatív pontozási rendszert alkalmaztunk: 0 (negatív vagy gyenge diffúz festődés, vagy a naevus sejtek/tumorsejtek <10%-a pozitív), 1 (a naevus sejtek/tumorsejtek >10%-a pozitív). A tumort infiltráló vagy körülvevő sejtek festődését a CD1a, DC-SIGN, CD68, CD163 és MT I/II markerek jelölődésének hiányával vagy jelenlétével jellemeztük.

Apoptosis assay

Huszonnégy órás $ZnCl_2$ előkezelést követően a HaCaT sejt kultúrákat besugaroztuk UVB-vel, majd 24 óra múlva mértük az apoptosist Annexin V/propidium-jodid (PI) assay-vel (Vybrant apoptosis assay Kit, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), áramlási citometria (CyFlow® Space, Partec, Canterbury, United Kingdom) módszerrel. Az Annexin V-PI-sejteket tekintettük élő sejteknek, az Annexin V+PI- sejteket korai apoptotikus sejteknek, míg az Annexin V+PI+ és Annexin V-PI+ sejteket együtt kései apoptotikus/necrotikus sejteknek.

Sejtproliferáció

Az 50, illetve 100 μM $ZnCl_2$ -dal történt 72 órás kezelés hatását a HaCaT sejtek proliferációjára EZ4U assay-vel (Biomedica, Vienna, Austria) néztük. Az optikai denzitást (OD) 450 nm-en Anthos 2020 microplate reader-en (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) mértük.

CPD-ELISA

Az UVB hatására keletkező CPD mennyiségét a HaCaT keratinocytákban a besugárzást követő 0, 1, 3, 6, és 24 órás időpontokban határoztuk meg. Az irradiáció 24 órás $ZnCl_2$ előkezelés után történt vagy a nélkül. A genom DNS-t QIAamp Blood Kittel (Qiagen, Hilden, Germany) tisztítottuk, PBS-hígítást (0,2 $\mu g/mL$) követően denaturáltuk (100°C, 10 perc), majd 0,003% protamin-szulfáttal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) előkezelt 99-lyukú plate-re vittük fel. Szárítást, majd blokkolást (20% FBS, 30 perc, 37°C, PBS-0.05% Tween-20 (PBS-T) mosás előtte és utána) követően alkalmaztuk az elsődleges antitestet (anti-CPD, #TDM-2, Cosmo Bio Co. Ltd., Tokyo, Japan, 1:1000 hígítás, 30 perc, 37°C). A másodlagos antitest torma-peroxidázzal (HRP) konjugált anti-egér IgG antitest volt (BioRad, Hercules, CA, USA, 1:3000 hígítás, 30 perc, 37°C), a szubsztrát pedig o-phenylene diamine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), amit hidrogén-peroxid (H_2O_2), és citrát-foszfát puffer (pH 5.0) közegben alkalmaztunk 10 percig, 37°C-on. Az enzimreakciót 2M H_2SO_4 -gyel

állítottuk le. Az abszorbanciát 492 nm-en Anthos 2020 microplate readeren (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) mértük. A kontroll a nem kezelt sejt kultúra volt.

TaqMan Low-Density Array

A relatív génextpressziót a HaCaT sejtekben 4 és 24 órás ZnCl₂ kezelést követően határoztuk meg a kiválasztott génekre. Párhuzamos kísérletben vizsgáltuk ugyanezen gének expressziójának változását UVB-irradiáció hatására a besugárzás utáni 6 órás időpontban. Az irradiáció 24 órás ZnCl₂ előkezelés után történt, illetve a nélkül. A totál RNS-t Trizol Reagenssel (MRC Inc., Cincinnati, Ohio, USA) izoláltuk, az RNS mennyiséget Nanodrop 2000-rel (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) ellenőriztük. Ezt követően történt a cDNS-szintézis (High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Az alkalmazott Custom TaqMan Array (TLDA) Microfluidic Card-ot (384-well) mi terveztük meg. Kilencvenegy gént választottunk ki, melyekről feltételeztük, hogy a cinkhez és az UVB válaszhoz kapcsolódnak, sejt ciklus-szabályozásban, gyulladásban, apoptózisban, DNS-reparációban, és antioxidáns védelemben szerepet játszó géneket, illetve a celluláris cink-homeosztázishoz kapcsolódó géneket, és néhány gént, melyek promóter régiójában fém általi szabályozó elemet (MRE) leírtak. Az array vizsgálat során Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR rendszert alkalmaztunk. A cDNS-t (100 ng) 1X Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 100 µL-ében vittük fel a TLDA plate mintahelyeire, mindig végeztünk párhuzamos mérést. Az amplifikációhoz használt PCR program: 94°C 1 perc; 94°C 12 másodperc 40 ciklus; és 60°C 45 másodperc. Az adatok 3 független kísérletből származtak, az elemzéshez SDS 2.1 software-t használtunk. Normalizáláshoz az ACTB, GAPDH, SDHA, és PGK1 gének szolgáltak. A relatív génextpressziót a 2-ddCt módszerrel számoltuk ki.

O₂⁻ termelődés mérése

A O₂⁻ termelődést a HaCaT sejtekben dihydroethidium (HE) assay-vel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 2 µM végkoncentráció, 30 perc, 37°C) határoztuk meg. Vizsgáltuk 4 és 24 órás ZnCl₂ kezelés hatását, illetve az UVB irradiáció hatását a besugárzást követő 1, 4, 10, és 24 órás időpontokban. Az irradiáció 24 órás ZnCl₂ előkezelés után történt, vagy a nélkül. A fluoreszcencia intenzitást áramlási citometriával (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, USA) határoztuk meg, a O₂⁻ termelődést átlag HE-fluoreszcencia intenzitásban (MFI) adtuk meg.

Hidrogén-peroxid detektálás

A H₂O₂ termelődést a HaCaT keratinocytákban a 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine assay-vel (Amplex Red, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA, 50- μ M végkoncentráció, 0.1 U/ml torna-peroxidáz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 20 perc, szobahő) határoztuk meg. A fluoreszcenciát Fluoroskan Ascent FL plate reader-en (Thermo Scientific, Vantaa, Finland) mértük, a kezelt sejtek MFI értékéből kivontuk a kezeletlen sejtek MFI értékét. Vizsgáltuk 4, 10, illetve 24 órás ZnCl₂ kezelés hatását a H₂O₂ felszabadulásra.

Western blotting

A ZnCl₂-dal 4, 24, 48, illetve 72 óráig kezelt HaCaT sejteket RIPA pufferben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) lizáltuk. A fehérjekoncentrációt BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) segítségével becsültük meg. A fehérjemintát (20 μ g) 10 vagy 12% SDS-polyacrylamide gélen történő szétválasztást követően elektroblottolással nitrocellulóz membránra vittük át, majd blokkolás (5% alacsony zsírtartalmú tej Tris-buffered saline-0,1% Tween-20-ban vagy PBS-T-ben) következett és az elsődleges antitesttel (anti-heme oxygenase-1 (HMOX1) (#ab13248, Abcam Inc., Cambridge, USA) 1:250, anti-MTI/II (#ab12228, Abcam Inc., Cambridge, USA) 1:1000 5% tejben) történő inkubálás (éjszakán át, 4°C). Mosási lépést követően alkalmaztuk a torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitestet (1 óra, szobahő), majd újabb mosás után az előhívás az ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagenssel (GE Healthcare, Freiburg, Germany) történt. Kontrollként β -actint (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) alkalmaztunk.

Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

A MT I/II fehérje intracelluláris lokalizációját HaCaT sejtekben konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk. A sejteket üveg fedőlemezen tenyésztettük, ZnCl₂-dal kezeltük 24 óráig, illetve besugaraztuk UVB-vel. Az UVB-irradiáció után 3 órával a ZnCl₂-dal előkezelt és nem előkezelt sejteket, illetve a csak ZnCl₂-dal kezelt és a nem kezelt (kontroll) sejteket is fixáltuk (4% paraformaldehid, 20 perc). Permeabilizáció (1% TritonX-100, 10 perc), majd blokkolás következett (20% FBS), majd a mintákra tettük az elsődleges antitestet (anti-MT I/II (#ab12228, Abcam Inc., Cambridge, USA) 1:50, éjszakán át, 4°C). Mosási lépést követően Alexa Fluor 555-jelzett, kecskében termeltetett anti-egér másodlagos antitesttel inkubáltuk a mintákat (2 óra). Anti-fade reagenssel (Vector Laboratories Inc.,

Burlingame, CA, USA) történt fedés után Olympus FV1000S konfokális mikroszkóppal (Olympus Co. Tokyo, Japan) elemeztük a sejteket (Juhász Tamás).

Statisztikai analízis

Az adatok elemzéséhez használt statisztikai tesztek: t-test, Mann-Whitney U-test, Pearson χ^2 -test, Fisher's exact test és Spearman's Rho correlation (GraphPad Prism version 5.03, GraphPAD Software Inc., San Diego, CA, USA; SPSS for Windows, version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A szignifikanciaszint $p < 0.05$ volt.

EREDMÉNYEK

Klinikopatológiai adatok

Negyvenhat primer CMM-et vizsgáltunk, összehasonlítva az áttétet nem adó és haematogén áttétet adó tumorokat. Az áttéttel nem rendelkező betegek követési ideje 8-13 év (átlagosan 10 év) volt. Az átlagos Breslow tumorvastagság szignifikánsan nagyobb volt a metasztatikus csoportban ($p=0,001$), illetve több áttétes eset volt a férfiak között (2,14:1), és kevesebb a nők között (1:2) ($p=0,020$). A metasztatikus csoportban több tumor lokalizálódott a törzsre és fej-nyak régióra, mint a nem áttétes csoportban (78,3% vs. 56,5%), és több volt a nodularis melanoma (43,5% vs. 34,8%). Ezek a különbségek azonban nem voltak szignifikánsak. Az exulcerált CMM-ek aránya a vártnak megfelelően nagyobb volt az áttétes tumorok között (56,5% vs. 13%). Nem volt szignifikáns különbség a két csoport között a betegek életkorát ($p=0,577$) és a Clark inváziós szintet tekintve ($p=0,584$).

A tumorsejtek MT I/II (MTt I/II) expressziója primer CMM-ben

Az áttétet nem adó és áttétet adó primer CMM-eket összehasonlítottuk a MTt I/II festődés intenzitását, kiterjedését, illetve eloszlását tekintve. A bazális keratinociták, a follicularis bulbus proliferáló epitheliuma, az eccrin és apocrin mirigyek ductalis epitheliuma szolgáltak a MT I/II IHC festődés pozitív kontrolljaként. A tumorsejtek magja és citoplazmája is pozitívan festődött. A TMA MTt I/II IHC vizsgálatra való alkalmasságának meghatározására legalább egy mintát vettünk a tumorok epidermalis, dermalis, és centrális régiójából is a multiblokk készítésekor. Bár a legtöbb metasztatikus primer CMM diffúz festődést mutatott, azt találtuk, hogy a dermalis/centrális melanomarész pozitív volt MT-re minden pozitív esetben. A vizsgálatot megelőző előkísérletekben ugyanilyen immunreaktivitási mintázatot láttunk teljes tumor metszeteken. Számos primer tumormintában a fő tumortömegetől távolabbi, egyedülálló tumorsejtekben is figyeltünk meg intenzív MT I/II festődést. A MT I/II jelölődés intenzitását és kiterjedését figyelembe véve szignifikáns különbséget kaptunk az áttétet nem adó és áttétes CMM-ek között, amennyiben a tumorokat negatívnak (0) értékeltük, ha a tumorsejtek <10%-a volt pozitív vagy diffúz halvány volt a festődés, míg pozitívnak (1), ha a tumorsejtek >10%-a volt pozitív ($p=0,018$).

A metasztatikus MTt I/II-pozitív és -negatív CMM-ek medián tumorvastagsága 3,5 mm vs. 3,15 mm volt, míg az áttétet nem adó MTt I/II-pozitív és -negatív primer tumoroké 1,5 mm vs. 1,23 mm, azaz a Breslow tumorvastagság korrelált a metasztázis rizikóval, de nem korrelált a MTt I/II expresszióval. Emellett, a MTt I/II-pozitív CMM-ek ($n=22$) medián

tumorvastagsága 2,8 mm volt, míg MTt I/II-negatív tumoroké (n= 24) 2,6 mm. Érdekesképpen, a MTt I/II pozitivitás korrelált az életkorral (R= 0,349, p= 0,017), de nem volt korreláció a MTt I/II pozitivitás és a nem között.

MT I/II expresszió a naevusokban (MTn I/II)

Benignus pigmentsejtes naevusokban (n= 6; férfi:nő= 1:5; átlagéletkor= 48 év (35-63 év); 4 compound típusú, 1 junctionalis és 1 dermalis naevus) is vizsgáltuk a MT I+II IHC jelölődést. Az összes naevusban találtunk MT I+II expressziót (1), de a festődési mintázat különbözött attól, amit a primer CMM-ekben megfigyeltünk. Míg a pozitív melanomasejt fészkek a tumor centralis/dermalis régiójában helyezkedtek el, a naevusokban a sejtek közvetlenül az epidermis alatt voltak pozitívak MT-re. Emellett, míg a melanomasejtekben intenzíven festődött mind a sejtmag, mind a citoplazma, addig a naevusokban a MT I+II jelölődés feltűnően a sejtmagra lokalizálódott.

Peritumorális MT I/II (MTp I/II) expresszió

Jól ismert tény az epidermis bazális keratinocitáinak MT I+II expressziója, ami az IHC vizsgálat pozitív kontrolljaként is szolgált. Normál humán bőrmintákat vizsgálva, emellett MT I/II-pozitív sejteket figyeltünk meg a dermisben is, dendritikus és orsósejtes morfológiájú sejteket a perivascularis limfocitákhoz asszociáltan. Hasonló morfológiájú MT I/II-pozitív sejtek a melanomasejt fészkek körül is megfigyelhetőek voltak, de jelenlétük nem korrelált a primer CMM-ek metasztatikus tulajdonságával (p= 0,555).

Tumor-infiltráló és peritumorális CD68, CD163, DC-SIGN és CD1a expresszió

A CD68⁺, CD163⁺, DC-SIGN⁺ és CD1a⁺ makrofágok/dendritikus sejtek (DC) jelenlétét külön értékeltük a tumoron belül és a tumorsejt fészkek körül. Szignifikáns különbséget figyeltünk meg az áttétet nem adó és áttétet adó CMM-ek között a tumor-infiltráló CD68⁺ és CD163⁺ makrofágok, illetve a peritumorális CD1a⁺ DC-k jelenléte tekintetében.

Szignifikánsan több metasztatikus CMM volt kapcsolt tumort infiltráló CD68⁺ (p= 0,001) és CD163⁺ (p< 0,001) sejtek jelenlétével, míg tumor körüli CD1a⁺ sejtek jelenlétéhez szignifikánsan kevesebb áttétes CMM kapcsolódott (p= 0,003). Az epidermalis CD1a⁺ Langerhans sejtek minden szövetmintában láthatóak voltak az epidermisben, és nem mutattak különbséget ebből a szempontból az áttétes és nem áttétes CMM-ek. Vizsgáltuk az immunsejtek és a MT I/II pozitív festődés közötti esetleges korrelációkat is.

Sorozatmetszetekben valamelyes átfedést megfigyeltünk a DC-SIGN⁺ és a MT I/II-pozitív peritumorális sejtek lokalizációjában/eloszlásában, de a kapcsolat nem volt bizonyítható. Ugyanakkor, szignifikáns egyenes összefüggést találtunk a tumor-infiltráló CD68⁺ makrofágok jelenléte és a tumorsejtek MT I/II expressziója között (p= 0.003).

A Zn (II) növelte a sejtproliferációt

A sejttenyésztő médiumot ZnCl₂-dal (50, 100 μM) kiegészítve vizsgáltuk a Zn (II) hatását a HaCaT sejtek proliferációjára EZ4U assay-vel. Azt találtuk, hogy a 72 órás, 100 μM ZnCl₂ kezelés szignifikánsan megnövelte a sejtproliferációt (1,3x; p=0,045).

A Zn (II) expozíció befolyásolta a cink homeosztázisban, antioxidáns védelemben, sejtéletképességben és gyulladásban szerepet játszó gének expresszióját HaCaT keratinocitákban

Ezt követően, TLDA módszerrel vizsgáltuk a 100 μM Zn (II)-tartalmú médium hatását a génexpresszióra. Hat, ZnCl₂ kezelést követően szignifikánsan up-regulált (≥1,5x) gént azonosítottunk. A MT különböző izoformái alapszinten eltérő transzkripcionális aktivitást mutattak. Az MT2A expressziója volt a legmagasabb, ezt követte az MT1X, az MT1E, majd az MT1F. A ZnCl₂ expozíció hatására bekövetkező génexpresszió változás mértéke az egyes izoformákra eltérőnek bizonyult. Négy órás Zn (II) kezelés a MT izoformák expresszióját indukálta, ám jóval nagyobb mértékű emelkedést eredményezett az MT1F, MT1X, illetve MT1E izoformák mRNS-szintjében, mint az MT2A gén expressziójának szintjében. A legnagyobb mértékű up-regulációt az MT1F gén esetén láttuk (4 órás kezelést követően 40,86x, 24 órás kezelést követően 12,92x). Emellett, a MT1X és a HMOX1 gén expressziója is több mint 10-szeresére emelkedett 4 órás ZnCl₂ kezelés után. Az MT1E, az MT2A és az SLC30A1 gének expressziója legalább 2-szeresére emelkedett 4, illetve 24 órás Zn (II) expozíciót követően. A notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1) gén expressziója is mérsékelten, de szignifikáns mértékben megemelkedett (1,47x) 4 órás ZnCl₂ kezelés hatására. Ugyanakkor kismértékű, de szignifikáns génexpresszió csökkenést figyeltünk meg az IL8, a prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), illetve a cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) gének vonatkozásában (0,63x, 0,68x, illetve 0,63x relatív génexpresszió). Az egyes MT izoformákra specifikus antitestek jelenleg még nem elérhetők, fehérjeszinten csak MT I/II (több izoforma együtt) expresszió vizsgálható. Western blot analízissel igazolni tudtuk a kontrollhoz képest megemelkedett MT fehérje-expressziót, amely maximumát 48 órás Zn (II) kezelésnél mutatta.

A Zn (II) expozíció befolyásolta a HMOX1 gén expresszióját és szignifikáns $O_2^{\bullet-}$ képződést indukált

A HMOX1 génexpressziót fehérjeszinten is vizsgáltuk 4 és 24 órás $ZnCl_2$ kezelést követően Western blot analízissel. A 34-kDa HMOX1 protein a 4 órás Zn (II) kezelésnél volt detektálható mennyiségben jelen. Az antioxidáns védelemben fontos HMOX1 fehérje észlelt indukciója arra indított bennünket, hogy megvizsgáljuk, vajon a Zn (II) kezelés vezet-e reaktív oxigén szabadgyökök keletkezéséhez. A $O_2^{\bullet-}$ termelődés meghatározására áramlási citometria-alapú HE assay-t alkalmaztunk. A kontrollhoz képest a 4 órás $ZnCl_2$ kezelés szignifikáns mértékű emelkedést okozott a celluláris $O_2^{\bullet-}$ szintben ($p=0,006$). Ezt követően a $O_2^{\bullet-}$ dizmutáció következtében létrejövő H_2O_2 termelődést is megvizsgáltuk. A H_2O_2 szint szignifikáns mértékű megemelkedését a médiumban az extracelluláris diffúzió következtében 24 órás $ZnCl_2$ kezelés után tudtuk kimutatni ($p=0,019$).

A Zn (II) előkezelés csökkentette az UVB által indukált CPD mennyiségét, de növelte a $O_2^{\bullet-}$ képződést

Az UVB sejt-válasz cink-mediált folyamatainak jobb megismerése céljából vizsgáltuk az UVB-irradiáció által indukált $O_2^{\bullet-}$ termelődést és CPD képződést a HaCaT sejtekben 24 órás $ZnCl_2$ előkezelést követő vagy a nélkül történt besugárzás után. A nem előkezelt keratinocytákban az UVB-irradiáció jelentős mennyiségű CPD-t indukált, illetve a besugárzást követően a $O_2^{\bullet-}$ szint a kontrollhoz képest szignifikánsan ($p<0,001$) megemelkedett, elérve 10 óránál egy plateau-t. Azt találtuk, hogy $ZnCl_2$ előkezelés mind a CPD indukciót, mind a szuperoxid termelődést képes befolyásolni. A Zn (II) előkezelt sejtekben a nem előkezelt sejtekhez képest szignifikánsan (19,64%-kal) kevesebb CPD-t detektáltunk 3 órával a besugárzás után ($p=0,0082$). Ugyanakkor, 10 órával az irradiációt követően a nem előkezelt sejtekhez képest szignifikánsan nagyobb mértékű $O_2^{\bullet-}$ képződést mértünk a $ZnCl_2$ előkezelt sejtekben ($p<0,001$).

A Zn (II) előkezelés nem befolyásolta a teljes sejt túlélést UVB-irradiáció után, de megváltoztatta az indukált sejthalál típusát

Annak vizsgálatára, hogy az UVB által indukált CPD mennyiségének Zn (II) előkezelés hatására bekövetkezett csökkenése, illetve a megemelkedett $O_2^{\bullet-}$ termelődés milyen hatással van a sejt további sorsára, áramlási citometria-alapú apoptosis assay-t és

EZ4U sejt-viabilitás assay-t használtunk. Azt találtuk, hogy 24 órával az UVB besugárzást követően a sejttúlélés ugyanolyan mértékű volt ZnCl₂ előkezelés után és a nélkül.

Az élő sejtek aránya a kontroll mintában 88,69% volt, az UVB-irradiált mintában ez az arány 48,2%-ra csökkent. A ZnCl₂ kezelés az élő sejtek arányát nem befolyásolta (91,71%), és a Zn (II) előkezelt mintákban az UVB ugyanúgy csökkentette ezt az arányt (50,1%-ra). Ugyanakkor, a ZnCl₂ előkezelést követő UVB-irradiáció után szignifikánsan kisebb arányban voltak jelen korai apoptotikus sejtek (Annexin V⁺PI⁻; 5,94%-os csökkenés, illetve 0,57-szeres relatív változás, p=0,0286), míg szignifikánsan nagyobb arányban voltak láthatóak a kései apoptotikus/necrotikus sejtek (Annexin V⁺PI⁺ és Annexin V⁻PI⁺; 4,61%-os növekedés, illetve 1,12-szeres relatív változás, p=0,0026).

A Zn (II) előkezelés módosította az UVB által kiváltott transzkripcionális választ

Annak vizsgálatára, hogy mi okozhatta a ZnCl₂ előkezelés hatására bekövetkezett UVB sejtválasz módosulást a HaCaT keratinocitákban, TaqMan Low-Density Array-t használtunk. Hat órával az UVB-irradiáció után a vizsgált gének közül 39 gén esetében találtunk a kontrollhoz képest szignifikánsan eltérő mRNS szintet. Tizenkét gén volt up-regulált ($\geq 2x$), 27 gén volt down-regulált ($\leq 0,5x$). A legnagyobb mRNS expresszió emelkedést ($>10x$) a TNF, a PTGS2, és az IL-8 génekben tapasztaltuk, míg a legnagyobb mértékű expresszió csökkenést (0,12) a MT1E génre kaptuk. Az MTF1 mRNS szint is szignifikánsan alacsonyabb volt (0,32x) a kontrollhoz képest UVB-irradiáció után. A Zn (II) előkezelt és UVB-irradiált sejteket a csak UVB-irradiált sejtekhez viszonyítva a génexpresszióban csak mérsékelt változásokat észleltünk. A homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2) génexpresszió UVB által indukált szuppresszióját a Zn (II) előkezelés szignifikánsan enyhítette, és mérséklődött a polymerase (DNA directed), beta (POLB), és a RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (*S. cerevisiae*) (RAD51) gének UVB okozta alaphoz enyhébb mértékű down-regulációja is. Ugyanakkor, a ZnCl₂ hatására megemelkedett MT mRNS szint (kivéve MT1E) jelentős különbség volt a Zn (II) előkezelést követően és előkezelés nélkül besugározott sejtek között.

A MT fehérje eloszlása a Zn (II) kezelt és UVB irradiált HaCaT sejtekben

Konfokális mikroszkópia segítségével kimutatható volt, hogy a MT I/II a kontroll sejtekben főként a sejtmagra lokalizálódik. ZnCl₂ kezelés hatására kifejezett immunjelölődés jelent meg a citoplazmában, majd UVB-irradiáció után 3 órával megemelkedett a sejtmagban a MT mennyisége, valószínűleg a citoplazmából történt transzlokáció által.

DISZKUSSZIÓ

A Zn (II) számos fiziológias folyamat résztvevője, és a cinkhiány jelentős következményekkel jár, mint pl. súlyos bőrtünetek. A cink-tartalmú helyi készítményeket széles körben használják a bőrgyógyászok a bőr regenerációjára, és különféle gyulladásozó bőrtünetekre gyakorolt egyértelműen jótékony hatása miatt. Ugyanakkor, a celluláris cink homeosztázis szabályozása komplex, és jelenleg még kevésbé ismert folyamat. A MT-nek kulcsszerepe van az intracelluláris labilis Zn (II) szint stabilan tartásában, illetve reverzibilis Zn (II)-kötő képessége révén biztosítani tudja a szükséges Zn (II)-et sokféle sejtbiológiai folyamathoz. Az eddigiekben leírt funkciói az oxidatív károsodás elleni védelem, a szöveti regeneráció elősegítése, az immunválasz moduláció. Továbbá, ismert, hogy a MT overexpresszió különféle daganatokban hozzájárulhat egy agresszívabb fenotípushoz, terápiareszisztenciához, ezáltal rossz prognózishoz. A MT szerepe a metasztázis képződésben nem ismert, és kísérletes bizonyíték sincs esetleges onkogén funkciójára. Másrészt, az UVB, a legfőbb környezeti károsító tényező a bőr vonatkozásában, és a legfontosabb rizikótényező a bőrrákok kifejlődésében, intracelluláris cink-felszabadulást vált ki a keratinocitákban, ami arra utal, hogy a Zn (II)-nek lehet funkcionális szerepe az UV stressz válaszban. A cink homeosztázis elemeinek és hatásának a vizsgálata fiziológias és stressz körülmények között betekintést engedhet a Zn (II) bőrbetegségek folyamatában betöltött szerepének megértésébe, és új terápiás célpontokat tárhat fel.

A MT a CMM prognózis ígéretes biomarkere

Áttétet nem okozó és haematogén áttétet okozó primer CMM-ek immunhisztokémiai vizsgálatában szignifikánsan több tumor volt MTt I/II pozitív (a tumorsejtek >10%-ában kimutatható intenzív MT I/II jelölődés) a metasztatikus melanomák között, mint a nem metasztatikusak között. A tumorsejtekben mind a citoplazma, mind a sejtmag intenzíven festődött MT I/II-re. Az egész tumor vagy legalább a tumor dermalis része pozitívan jelölődött, ezért a TMA-t alkalmasnak ítéltük meg a MTt I/II expresszió vizsgálatára CMM-ben. Ez fontos, mivel elegendő mennyiségű szövetminta szükséges a terápiaválasztást meghatározó, növekvő számú genetikai teszthez, és a prognózis pontosabb becslését szolgáló többfajta immunhisztokémiai marker vizsgálatához is, ami miatt szükséges „szövet-spóroló” technikák alkalmazása. Nem volt szignifikáns korreláció a Breslow tumorvastagság és a MTt I/II pozitivitás között ($R= 0,102$, $p= 0,501$), ami arra utal, hogy a két paraméter egymástól független prognosztikai tényező.

Vizsgáltuk a CMM mintákat immun-mikrokörnyezet szempontjából is, ehhez dendritikus sejt markereket, mint CD1a és DC-SIGN, makrofág markereket, mint CD68 és CD163, illetve T-sejt markereket, mint CD45RO és CD8 használtunk. Lineáris korrelációt találtunk a primer CMM metasztázis rizikója és a tumor-infiltráló CD68⁺ és CD163⁺ makrofágok jelenléte között, illetve fordított arányosságot a metasztázis rizikó és a peritumorális CD1a⁺ sejtek jelenléte között. A tumor mikrokörnyezetnek fontos szerepe lehet a melanoma progresszióban. Már korábban felvetették, hogy CMM-ben a tumort infiltráló makrofágok jelenléte rossz prognózissal társul, mert elégtelen tumor-ellenes citotoxikus T-sejt válasszal, szöveti átépüléssel és érújdonképződéssel jár együtt. A CD8⁺ citotoxikus T-sejtek jelenléte a mi mintáink esetén is fordítottan arányos volt a metasztázis rizikóval. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy ezek az immunparaméterek nem voltak független prognosztikai markerek, hanem a tumorvastagsággal voltak arányban. Új megfigyelésnek bizonyult viszont a pozitív korreláció a tumor-infiltráló CD68⁺ makrofágok jelenléte és a MTt I/II expresszió között. A primer tumorban a tumorból felszabaduló citokinek, növekedési faktorok, enzimek szabályozzák a makrofágok bevándorlását. Tumor eredetű faktorok befolyásolják a tumor-asszociált makrofágok funkcióját is. Az M1 makrofág funkció pro-inflammatorikus citokin felszabadulást és Thelper1 immunválasz indukciót jelent, ami a tumorsejteket képes elpusztítani, illetve gátolni a tumor-növekedést és -inváziót. A tumor progressziója során azonban makrofág funkcióváltás következik be (M2), és ez jellemzi főként a tumor-asszociált makrofágokat. Az M2 makrofágok gátolják a gyulladásos választ, az antigén-prezentációt, a Thelper1 immunválaszt, szöveti átépülést indukálnak és neoangiogenesisist, elősegítve a tumor-növekedést és -inváziót. Gyulladásos mediátorok MT I/II up-regulációt idéznek elő. Kísérletes encephalitis állatmodellen korábban kimutatták, hogy stressz körülmények között, főként a reaktív astrociták által, megnő a szöveti MT I/II expressziós szint, ami a gyulladásos mikrokörnyezet megváltozásával jár, csökken az IL-6 és TNF- α felszabadulás a makrofágokból, csökken a neuronok és oligodendrociták apoptosisa, és szöveti regeneráció figyelhető meg. A sejtekből felszabaduló (extracelluláris) MT-ről kimutatták, hogy leukocita kemotaktikus funkcióval bír, valamint az immunsejtek (limfociták, makrofágok) felszínén kötődve befolyásolja azok funkcióját (pl. csökkenti az éretlen T-sejtek citotoxikus T-limfocita irányú differenciálódását). Mindezek arra utalnak, hogy a MT-nek szerepe lehet az immun-mikrokörnyezet szabályozásában, és alátámasztják, hogy a MT I/II over-expresszió szerepet játszhat CMM-ben a makrofágok tumorba vándorlásában és a tumor progresszióinak kedvező mikrokörnyezet kialakulásában.

Egy nemrégiben megjelent összefoglaló közlemény a mi vizsgálatunk eredményeire is hivatkozva jelölte meg a MT I/II expressziót mint ígéretes prognosztikai faktort CMM-ben. Továbbá, egy másik, nemrégiben megjelent cikk a normál bőr alacsony, míg a spinocelluláris carcinoma magas MT III expressziójára hívta fel a figyelmet, megerősítve, hogy a MT fehérjék bőrrákok kialakulásában és progressziójában játszott szerepét fontos tovább vizsgálni.

MT expresszió humán keratinocitákban

A MT kisméretű, 6-7 kDa molekulásúlyú, nagy cisztein-tartalmú fehérje. Fontos szerepe van az intracelluláris Zn (II) reverzibilis kötése által a cink-függő sejt-biológiai folyamatokban. Bozym és mtsai. vizsgálták a sejtenyészítő médium cink-tartalmának hatását az intracelluláris Zn (II) koncentrációra, és azt találták, hogy mind a sejt, mind a médium típusa befolyásolja az intracelluláris szabad Zn (II) szintet adott koncentrációjú Zn (II) expozíció során, ezért a hozzáadott Zn (II) toxicitására figyelni kell, mivel az eltérő lehet azonos expozíciós koncentráció mellett. Korábbi vizsgálatokban 100 μM ZnCl_2 expozíció nem volt toxikus a keratinocitákra, és az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között sem. Bozym és mtsai. számításai nyomán 100 μM Zn (II) kezelés kb. 100-nM emelkedést idéz elő az intracelluláris Zn (II) szintben. Annak érdekében, hogy betekintést kapjunk a Zn (II) sejtbiológiai funkcióiba humán HaCaT keratinocitákban, nem-toxikus koncentrációjú ZnCl_2 -dal kezelt sejtekben a transzkripcionális választ vizsgáltuk, többek között a MT izoformák mRNS expresszióját. Több mint 10 funkcionális humán MT izoforma ismert, melyeket 4 csoportba osztanak. Vizsgálatunkban a MT I/II csoportokba tartozó 9 MT izoforma mRNS expresszióját elemeztük. Alapszinten 4 MT izoforma expresszióját detektáltuk a HaCaT sejtekben (MT2A>MT1X>MT1E>MT1F). Nagyon kevés ilyen irányú vizsgálatot találunk az irodalomban. Lim és mtsai. szintén a MT2A-t találták a legnagyobb mennyiségben jelenlévő MT izoformának a keratinocitákban. A MT expresszió szintje függ a sejtciklus-fázistól, korai S-fázisban a MT nukleáris transzlokációja mutatható ki. Az a tény, hogy az egyes MT1 izoformákat különböző gének kódolják, illetve, hogy az eddig elvégzett néhány vizsgálatban eltérő MT1 izoformák prognosztikai jelentőségű expressziós változása volt kimutatható daganatokban, a mi vizsgálati eredményeinkkel együtt, arra utalnak, hogy az egyes izoformák specifikus szabályozó funkcióval rendelkeznek, amiről még nagyon keveset tudunk. Vizsgálatunkban a Zn (II) expozíció szignifikánsan növelte mind a 4 MT izoforma és az SLC30A1 mRNS expresszióját. Az MT1F, 1X és 1E transzkripcionális változása sokkal kifejezettebb volt az MT2A mRNS szint változásához képest, azaz ezeknek az izoformáknak

az expressziója érzékenyebbnek tűnik az intracelluláris Zn (II) koncentráció változására. Western blottal a MT I/II fehérje expressziójának időfüggő emelkedése volt kimutatható ZnCl₂ kezelés hatására. A MT celluláris lokalizációjának vizsgálata során azt találtuk, hogy a kontroll sejtekben a MT fehérje elsősorban a sejtmagban volt jelen, mintegy utalva a fehérje lehetséges szerepére a genom védelemben és/vagy a sejtnövekedésben. Ez egybehangzik az immunhisztokémiai vizsgálataink eredményével, melyben nukleáris MT festődést láttunk a naevusokban. Ugyanakkor, 24 órás ZnCl₂ kezelés után a sejtek citoplazmájában detektáltunk nagy mennyiségű MT-t, és alig volt észlelhető fluoreszcens jelölődés a sejtmagban. A MT Zn (II)-koncentrációtól függő intracelluláris lokalizációja az eltérő MT izoforma összetételt tükrözheti.

A Zn (II) hatása a HaCaT keratinociták sejtműködésére

Vizsgálatunkban szignifikáns sejt-proliferációs előnyt figyeltünk meg 100 µM ZnCl₂ expozíció esetén, ami egybehangzott egy korábbi irodalmi eredménnyel. Bár a Zn (II) hatása az intracelluláris szignalizációs folyamatokra nem kellően ismert, a Zn (II) pozitív befolyása a sejt-proliferációra tulajdonítható lehet, legalábbis részben, a foszfatázokat gátló hatásának, ami miatt elhúzódóbb tirozin-kináz hatás érvényesülhet. Emellett, a Zn (II) expozíció által kiváltott megnövekedett kalcium felvételnek vagy génexpresszió (pl. NOTCH1) up-regulációnak is szerepe lehet. Továbbá, mint korábban említettük, az öregedő bőrben, amit a csökkent epidermális sejtregenerációs képesség jellemez, alacsonyabb a MT expresszió, míg az epidermis proliferatív sejtrétegében magas MT szint mutatható ki. Az az eredményünk is, miszerint a MT overexpresszált a rossz prognózisú CMM-ben, arra utal, hogy a MT hozzájárulhat a sejtek hiperproliferatív kapacitásának a megőrzéséhez.

A Zn (II) sejt-szignalizációra gyakorolt hatásának mechanizmusát nem ismerjük jól. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a Zn (II) befolyásolhatja a ROS-szenzitív szignálútvonalakat. Elsőként figyeltük meg, hogy a nem-toxikus ZnCl₂ expozíciónak kitett tenyésztett humán keratinocitákban magas HMOX1 expresszió indukálódik. A HMOX1 fontos tagja az antioxidáns funkciójuk révén citoprotektív fázis-II enzimek családjának. Ismert sejthalál-gátló és gyulladást szabályozó szerepe is. A nem-toxikus Zn (II) expozíció alatt nem-toxikus, de szignifikáns mennyiségű O₂⁻ képződést, és ezt követően H₂O₂ felszabadulást detektáltunk, ami magyarázhatja a HMOX1 expresszió indukciót. Bár a Zn (II)-ről ismert, hogy facilitálva a mitokondriális és extra-mitokondriális ROS képződést oxidatív stresszt indukál, nem-toxikus Zn (II) expozícióval kapcsolatban még nem írtak le ROS indukciót. A kísérleteinkben tapasztalt sejt-proliferáció fokozódás és ROS szint

megemelkedés nem mond ellent egymásnak, hiszen ismert, hogy a növekedési faktorok és onkogének hatására NAD(P)H oxidázok aktiválódnak, ami $O_2^{\cdot-}$ képződéshez vezet, és alacsony dózisu fotodinamiás kezelés, ami szintén megnöveli a ROS szintet, megnöveli a sejtproliferációt is. Továbbá, NADPH oxidáz által mediált nuclear factor-kappa B (NF κ B) és HMOX1 indukciót megfigyeltek humán colon carcinoma sejtekben anélkül, hogy sejthalál indukciót láttak volna. Meg kell még említeni, hogy redox-szenzitív transzkripciós faktorok (pl. AP-1) részt vesznek az immunválasz szabályozásában, és az IL8 és PTGS2 proinflammatorikus mediátorok mRNS szintű down-regulációját tudtuk kimutatni ZnCl₂ kezelés hatására a HaCaT keratinocitákban.

A cink biológiai szerepe az UVB által indukált stressz válaszban humán bőr HaCaT keratinocita modellben

Az UVB expozíció a bőrdaganatok kialakulásának elsődleges rizikótényezője. Azt, hogy a cinknek szerepe van az UVB indukált sejthalál folyamatában, már korábban felvetették. Stork és mtsai. az UVB irradiáció után elpusztuló/elpusztult sejtekben megemelkedett intracelluláris cinkszintet detektáltak, és ebből azt a következtetést vonták le, hogy az UVB által kiváltott cinkfelszabadulás egy fontos lépés lehet az UVB-hez asszociált sejthalál mechanizmusban. Az UVB indukált direkt (főleg CPD) és indirekt (szabadgyök-képződés általi) DNS-károsodás következményei a sejtciklus-késleltetés, DNS-reparáció és a sejthalál-útvonalak aktiválódása, illetve napégés, gyulladás, immunszuppresszió és melanogenezis kialakulása a bőrben. Kísérleteinkben mértük a CPD-, és a szuperoxid-képződést is. A DNS-reparáció következtében a CPD mennyisége időben csökkent, míg a ki nem javított DNS-károsodást hordozó sejtek apoptosissal eliminálódtak. Saito és mtsai. eredményeihez hasonlóan, a sejtek 24 órás Zn (II) előkezelése nem volt elegendő ahhoz, hogy a sejt túlélés javuljon, bár az indukált CPD szintje a besugárzást követően 3 órával alacsonyabb volt az előkezelt sejtekben a nem előkezelt sejtekhez képest. Feltételezhetően a MT-nek szerepe lehetett a CPD mennyiségének csökkenésében, mivel a Zn (II) kezelés hatására megnövekedett mennyiségű MT-nek a részleges nukleáris transzlokációja volt megfigyelhető 3 órával az UVB expozíció után. Ugyanakkor, 24 órával a besugárzást követően, amikor az apoptózis a maximumát eléri, a sejthalál elemzés során a korai apoptotikus sejtek arányának szignifikáns csökkenését, és a kései apoptotikus/necrotikus sejtek arányának szignifikáns növekedését detektáltuk a Zn (II) előkezelt sejtekben a nem előkezelt sejtekhez képest. Ezzel kapcsolatban visszautalunk arra, amit Stork és mtsai. megfigyeltek, miszerint az intracelluláris cinkszint megnövekszik az UVB besugárzást

követően elpusztuló/elpusztult sejtekben. Továbbá, nem várt eredményként, az UVB expozíció után képződő és maximumát 10 órával a besugárzás után elérő szuperoxid mennyiségének a szignifikáns megemelkedése volt detektálható a Zn (II) előkezelte sejtekben. Nemrégiben közölt adatként a ROS indukált cink-felszabadulás és a cink által fokozódó mitokondriális ROS képződés örögi köre szerepet játszik a neuronális sejthalál folyamatában. Ismert, hogy nem apoptotikus sejthalál-útvonal indukálása a daganatsejtekben növelheti a sejthalál immunogenitását. Azt, hogy vajon a Zn (II) előkezelés következtében megváltozott sejthalál folyamat befolyásolja-e a bőrsejtek UV-károsodása által kiváltott immunválaszt, ami kihathat pl. autoimmun vagy daganatos bőrbetegség kialakulásának rizikójára, tovább kell vizsgálni.

Érdekes, hogy az MT1E és MTF1 mRNS expresszió a besugárzást követően 6 óra múlva mérve szignifikánsan alacsonyabb volt az UVB expozíciónak kitett keratinocitákban, és ezt nem befolyásolta a Zn (II) előkezelés sem. Az MT1E epigenetikus down-regulációja kimutatható volt korábban malignus melanomában, ami az MT1E tumor-szuppresszor funkcióját vetette fel. A Zn (II) előkezelés, összességében, az UVB expozíció által kiváltott génexpressziós változásokat csak kismértékben befolyásolta a vizsgált génekre nézve. Ugyanakkor, a Zn (II) előkezelés hatására a legnagyobb változást az UVB regulált gének közül a HIPK2 expressziója mutatta, ami a DNS-károsodás válasz kulcsfehérjéinek, mint pl. a p53-nak a foszforilálás útján történő szabályozásában vesz részt. Továbbá, a p53 target gének szelektív transzaktivációját a képződött ROS is befolyásolni tudja.

ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori disszertáció célja az volt, hogy a cink homeosztázis és UVB okozta DNS károsodásra adott válasz szempontjából adjon betekintést a bőrbetegségek patogenezisébe.

A MT I/II fehérje kifejeződésének összehasonlítása az áttétet nem adó és haematogén áttétet adó primer kután malignus melanoma (CMM) szöveti mintákban:

Statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk a nem áttétes és metasztatikus CMM között a tumorális MT I/II expressziót tekintve, ami a Breslow tumor vastagságtól független prognosztikai faktornak bizonyult. Ezen kívül, elsőként vizsgáltuk az összefüggést a tumor MT I/II expressziója és a tumor immun mikrokörnyezet összetétele között. Azt találtuk, hogy a MT I/II expressziót mutató melanoma sejtek jelenléte korrelált a daganatot infiltráló CD68+ makrofágok jelenlétével.

Nem-toxikus Zn (II) expozíció hatásának vizsgálata humán epidermális keratinocitákban fiziológiás és stressz körülmények között:

Vizsgálatainkban a sejtproliferációt fokozta a nem-toxikus cink expozíció. Elsőként írtuk le, hogy ezzel egyidőben toxicitást nem okozó mértékben, de megemelkedik a szuperoxidszint a bőr keratinocitákban és, valószínűleg ezzel összefüggésben, fokozódik a HMOX1 expresszió. Továbbá kimutattuk, hogy bár a cinkkel előkezelt keratinocitákban az UVB besugárzás utáni korai időpontban kevesebb az UVB-indukálta ciklobután pirimidin dimerek mennyisége a kontrollhoz képest, jelentősen nagyobb mértékű a szuperoxid termelődés az UVB expozíció utáni későbbi időpontban. Nem találtunk eltérést az UVB-irradiációt követően 24 órával mért teljes sejttúlélés tekintetében a cinkkel előkezelt és a kontroll sejtek között, azonban a korai apoptotikus sejtek aránya csökkent, míg a késői apoptotikus/nekrotikus sejtek aránya növekedett a cink előkezelés hatására.

Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a megváltozott MT expresszió, és ezen keresztül a cink diszhomeosztázis hozzájárulhat a melanoma progressziójához. A nem-toxikus cink expozíció során egy valószínű Zn (II) és cistein-tiol molekuláris interakció következtében megváltozhat fehérjék funkcionalitása, ezáltal reakciókészsége és redox reakciókban való részvétele, ami ROS képződéshez vezet. Ez hatással lehet további szignál transzdukciós útvonalakra, és megváltoztathatja a sejtek stresszre kiváltott viselkedését. Megfigyeléseink befolyásolják a bőrbetegségek patogeneziséről alkotott felfogásunkat, s felhívják a figyelmet a cink homeosztázis szerepének további vizsgálatára a bőrben.



Nyilvántartási szám: DEENK/166/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Emri Eszter
Neptun kód: SBIFQ6
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Emri, E.**, Mikó, E., Bai, P., Boros, G., Nagy, G., Rózsa, D., Juhász, T., Hegedűs, C., Horkay, I., Remenyik, É., Emri, G.: Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes.
Metallomics. 7 (3), 499-507, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C4MT00287C>
IF:3.585 (2014)
2. **Emri, E.**, Egervári, K., Várnölgyi, T., Rózsa, D., Mikó, E., Dezső, B., Veres, I., Méhes, G., Emri, G., Remenyik, É.: Correlation among metallothionein expression, intratumoural macrophage infiltration and the risk of metastasis in human cutaneous malignant melanoma.
J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 27 (3), e320-e327, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-3083.2012.04653.x>
IF:3.105





További Közlemények

3. Boros, G., Mikó, E., Muramatsu, H., Weissman, D., **Emri, E.**, van der Horst, G.T.J., Szegedi, A., Horkay, I., Emri, G., Karikó, K., Remenyik, É.: Identification of Cyclobutane Pyrimidine Dimer-Responsive Genes Using UVB-Irradiated Human Keratinocytes Transfected with In Vitro-Synthesized Photolyase mRNA.
PLoS One. 10 (6), e0131141-, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131141>
IF:3.234 (2014)
4. Boros, G., Mikó, E., Muramatsu, H., Weissman, D., **Emri, E.**, Rózsa, D., Nagy, G., Juhász, A., Juhász, I., van der Horst, G., Horkay, I., Remenyik, É., Karikó, K., Emri, G.: Transfection of pseudouridine-modified mRNA encoding CPD-photolyase leads to repair of DNA damage in human keratinocytes: A new approach with future therapeutic potential.
J. Photochem. Photobiol. B. 129, 93-99, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.09.010>
IF:2.803

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,727

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 6,69

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.08.31.



Az értekezéshez kapcsolódó nemzetközi konferencia részvételek:

E Emri: Correlation among metallothionein expression, intratumoural macrophage infiltration and the risk of metastasis in human cutaneous malignant melanoma. 44th ESDR Annual ESDR Meeting, Copenhagen, Denmark, 10-13 September 2014 *oral presentation*

E Emri, E A Janka, G Boros, L Beke, Cs Hegedus, B Nagy, G Mehes, E Remenyik, G Emri: Correlation among anti-tumour T cell response and the redox homeostasis in human cutaneous malignant melanoma. 44th ESDR Annual ESDR Meeting, Copenhagen, Denmark, 2014; *J Invest Dermatol* 134: S90-S97 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2014.350

E Emri, E Miko, E Remenyik, G Emri: Zinc chloride exposure modulates cytokine expression and induces heme oxygenase-1 in human keratinocytes. International Investigative Dermatology Edinburgh, Scotland 2013; *J Invest Dermatol* 133: S191-S208 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2013.103

E Emri, G Emri, K Egervari, I Veres, G Mehes, E Remenyik: Prognostic role of CD68, CD163 and CD1a expression in human primary cutaneous malignant melanoma. 75th Anniversary of Albert Szent-györgyi's Nobel Prize Award, 22-25 March, 2012. *oral presentation*

E Emri, E Miko, G Nagy, G Boros, D Rozsa, G Mocsai, G Emri, E Remenyik: Modulating effect of zinc on cutaneous UVB-response. 42th ESDR Annual ESDR Meeting, Venice, Italy, 2012; *J Invest Dermatol* 132: S118-S123 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2012.306

E Emri, G Emri, K Egervari, L Beke, T Varvolgyi, I Veres, G Mehes, I Horkay, E Remenyik: Immunohistochemical characterization of metallothionein expression in primary cutaneous malignant melanoma. 41th ESDR Annual ESDR Meeting, Barcelona, Spain, 2011; *J Invest Dermatol* 131: S1-S115 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2011.214 79

G Emri, T Varvolgyi, A Begany, Z Hargitay, L Toth, E Emri, E Remenyik: Immunohistochemical markers as prognostic factors in primary cutaneous malignant melanoma. 39th Annual ESDR Meeting, Budapest, Hungary, 2009; *J Invest Dermatol* 129: S1-S103 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2009.232

Az értekezéshez kapcsolódó hazai konferencia részvételek:

Emri E, Janka E A, Boros G, Beke L, Hegedűs Cs, Méhes G, Remenyik É, Emri G: A tumor-ellenes T-sejt válasz és a redox homeosztázis közötti összefüggés kután melanoma malignumban. Magyar Dermatológiai társulat 87. nagygyűlése, Budapest, Hungary; 27 November 2014. *oral presentation*

Emri E, Miko E, Boros G, Nagy G, Bai P, Mócsai G, Rózsa D, Hegedűs Cs, Remenyik É, Emri G: A cink homeosztázis befolyásolja a citokin-expressziót és hem-oxigenázt indukál humán keratinocitákban. Magyar Dermatológiai társulat 86. nagygyűlése, Budapest, Hungary; 12-14 December 2013. *oral presentation*

Emri E, Miko E, Nagy G, Boros G, Rózsa D, Mócsai G, Remenyik É, Emri G: A cink UVB sugárzás utáni sejtválaszra gyakorolt hatása keratinocitákban. Magyar Dermatológiai társulat 85. nagygyűlése, Budapest, Hungary; 6-8 December 2012. *oral presentation*

Emri E, Emri G, Egervári K, Beke L, Rózsa D, Miko E, Boros G, Nagy G, Várvölgyi T, Veress I, Méhes G, Remenyik É: A metallothionein-expresszió melanómában: tumorbiológiával és immunválasszal összefüggést mutató független biomarker. Magyar Dermatológiai társulat 84. nagygyűlése, Budapest, Hungary; 8-10 December 2011. *oral presentation*

További konferencia részvételek:

G Boros, E Miko, H Muramatsu, D Weissman, **E Emri**, G van der Horst, I Horkay, K Karikó, G Emri and E Remenyik: Effect of cyclobutane pyrimidine dimer on gene expression is mediated by activation of c-Jun kinase in UVB irradiated human keratinocytes. 44th ESDR Annual ESDR Meeting, Copenhagen, Denmark, 2014; *J Invest Dermatol* 134: S83-S89 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2014.349

Cs Hegedűs, G Boros, **E Emri**, E Mikó, K Karikó, G Emri, P Bai, É Remenyik: The implication of mitochondria in the UVB-driven pathways, 44th Annual ESDR Meeting Copenhagen, Denmark, 2014; *J Invest Dermatol* 134: S83-S89 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2014.349

G Boros, E Miko, **E Emri**, G van der Horst, H Muramatsu, D Weissman, I Horkay, G Emri, K Kariko, E Remenyik. 43rd Annual ESDR Meeting. Edinburgh, Scotland, 2013; *J of Invest Dermatol* 133: S209–S221 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2013.104

G Boros, E Miko, **E Emri**, G van der Horst, H Muramatsu, D Weissman, I Horkay, G Emri, K Kariko, E Remenyik: CPD-dependent gene expression changes in photolyase mRNA-transfected human keratinocytes irradiated by UVB. 42th ESDR Annual ESDR Meeting, Venice, Italy, 2012; *J Invest Dermatol* 132: S118-S123 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2012.306

G Boros, D Rozsa, **E Emri**, G Nagy, E Miko, A Juhasz, I Juhasz, G van der Horst, H Muramatsu, D Weissman, K Kariko, G Emri, E Remenyik, I Horkay: Enhanced repair of UVB-induced DNA lesions in photolyase mRNA-transfected keratinocytes. 41th ESDR Annual ESDR Meeting, Barcelona, Spain, 2011; *J Invest Dermatol* 131: S1-S115 *poster presentation* DOI:10.1038/jid.2011.214

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt, szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Remenyik Éva professzornőnek a folyamatos támogatást a PhD alatt, és a lehetőséget, hogy a Bőrgyógyászati Klinikán dolgozhattam.

Hálás vagyok Emri Gabriellának a kutatási megbeszélésekért, a motiváció fenntartásáért, és a hasznos tanácsokért.

Hálás vagyok Horkay Irén professzornőnek, aki nélkül ez a munka nem lett volna lehetséges.

Köszönettel tartozom Méhes Gábor tanár úrnak, a Patológiai Intézet igazgatójának, hogy dolgozhattam az intézetével együttműködésben.

Hálás vagyok Bay Péternek a segítségéért a szuperoxid mérésben, illetve a hasznos diskusszióért és a cikkíráshoz nyújtott instrukciókért.

Szeretném megköszönni a segítséget a patológusoknak, Egervári Kristófnak, Dezső Baláznak és Veres Imrének, illetve a hisztológiai, immunhisztokémiai munkában a folyamatos segítséget és hasznos megbeszéléseket Beke Líviának.

Köszönöm Kertészné Erzsikének és Csapóné Sandra Ildikónak a kitűnő technikai segítséget.

Nagyon hálás vagyok minden kollégámnak, akikkel együtt dolgoztam ezek alatt az évek alatt, és a Bőrgyógyászati Klinika összes dolgozójának.

Végül, szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak, hogy minden időben mellettem álltak és támogattak,

és szeretném megköszönni Istennek a támogatását és biztatását:

“Nem erővel, sem hatalommal, hanem az én Lelkemmel! azt mondja a Seregeknek Ura.”

Zakariás 4:6