

mRNS transzfekció 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 ultraibolya sugárzása, amelynek biológiai hatásai hullámhossztól függően eltérőek. Az UVB-sugárzás (280-320 nm) egyik legjelentősebb hatása, hogy a DNS-ben közvetlenül elnyelődve ciklobután 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 transziens transzfeccióval juttattuk be HaCaT sejtekbe és normál humán epidermális keratinocitákba, amelyekben a kódolt fotoliáz western blot és immuncitokémia (ICC) segítségével detektáltuk a transzfecciót követően különböző időpontokban. Annak vizsgálatára, hogy a fotoliáz funkcionálisan aktív-e, az mRNS transzfecciótolt sejteket 20 mJ/cm² UVB dózissal tettük ki, majd rögtön fotoreaktiváltunk egy órára át, 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-indukálta CPD léziók eltávolítására ezekben a sejtekben, így terápiás alkalmazásának megteremtése fontos lépcsőfok lehet a bőrdaganatok megelőzésében.

Manczinger Máté dr.¹, Vörös Andrea dr.², Kemény Lajos dr.¹, Nagy István dr.², Lakatos Lóránd 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 betegségmódel. Célunk volt egy, a vaginalis candidiasist jól modellező rendszerben a betegség kialakulását vizsgálni humán és patogén oldalról egyaránt.

RNA-seq vizsgálatot végeztünk, melyhez a mintát a következő állapotokból vettük: 1. C. albicans sarjadzó, nem patogén állapotban keratinocita táptalajban (0. időpillanat) 2. C. albicans hifázó, patogén állapotban keratinocita táptalajban (3 óra elteltével) 3. C. albicans hifázó, patogén állapotban + PK E6/E7 vaginalis epithelialis sejtek (betegségmódel) 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-plot módszerrel állapítottuk meg. A géneket változások alapján csoportokba osztottuk és funkcionálisan annotáltuk őket.

C. albicansban a szignifikánsan változó gének közül 1476 sejtek jelenlétében és azok hiányában is változik, míg 619 és további 436 genomik lokusz sejtre 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 sejtre 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.¹, 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. toluidinkék festéssel végzett szövettani vizsgálata követett. A TGM3 knockout egéropulációban 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 észlelteteket, 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 transglutamináz (TGM3) is kulcsfontosságú.

newly isolated mice
in the lab.

Nagy Georgina¹, Gáspár Krisztián dr.^{1,2}, Töröcsik Dániel dr.¹, Doan Xuan Quang Minh dr.³, Bacsó 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

a Th17 és Th22 sejtek szerepét is felvetik, bár az erre vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak. A dendritikus sejtek (DC) felszíni kostimulációs molekuláik és az általuk termelt citokinek révén jelentősen befolyásolják a kialakuló effektor T sejt (Th1, Th2, Th17, Th22) válasz minőségét vagy adott körülmények között a tolerancia kialakulását. Mivel AD-ben az egyensúly Th2 irányba tolódik el, azt kívántuk megvizsgálni, hogy a perifériás vérben keringő myeloid DC-knek milyen szerepe van az effektor T sejtek polarizációjában.

Perifériás vérből mágneses beadek segítségével szeparáltunk $CD1c(BDCA1)^+$ myeloid DC-ket, majd *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB) és thymic stromal lymphopoietin (TSLP) együttes alkalmazásával 48 óráig stimuláltuk azokat. Az érett DC-k citokintermelését lézer pásztázó citométerrel mértük. Ezzel egy időben az érett DC-ket együtt tenyésztettük autológ $CD4^+CD45RA^+$ naiv T sejtekkel, majd 5 nap múlva mértük az aktivált T sejtek proliferációját és citokin termelését áramlási citometriával.

Eredményeink szerint a perifériás vérben keringő myeloid DC-k bizonyos fokú érettséget mutatnak, ami a stimulálással csak kisebb mértékben fokozható. Az AD-s betegekben a DC-k IL-12 termelése csökken az egészséges kontrollokhoz képest. Az együtt tenyésztést követően a stimulált DC-vel aktivált T sejtek proliferációja kifejezett mind AD-ben, mind a kontrollokban. A T sejtek polarizációja AD-ben Th2/Th22 irányt mutat, az egészséges donorok Th1 irányú polarizációjával szemben.

Mócsai Gábor, Nagy Georgina, Gáspár Krisztián dr.,
Szegedi Andrea dr.:

Barrier funkciók vizsgálata atopiás dermatitisben
(Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum,
Bőrgyógyászati Klinika, Bőrgyógyászati Allergológiai Tanszék,
Debrecen)

A bőr elszarusodó hámja olyan barriert képez, amely képes egyrészt megakadályozni a külvilág szervezetre káros allergénjeinek, mikrobáinak és toxikus vegyületeinek bejutását a szervezetbe, másrészt gátolja a folyadék és elektrolit elvesztését. Ez a fizikokémiai gát az epidermis stratum corneumának alsó sejtsoraira lokalizálódik és magában foglalja mind a keratinocytákat, a közöttük létrejövő sejtkapcsolatokat, mind pedig lipid természetű intercelluláris anyagokat. Bármelyik komponens kiesése/funkcióvesztése károsan befolyásolja a barriert, amely később öngerjesztő módon tovább romolhat. Jó példa erre az atopiás dermatitis, melynek kialakulásában mind a genetikai (filaggrin mutáció), mind a környezeti hatások (tisztálkodási szerek, allergének, stb.) révén létrejött barrier károsodások jelentős szerepet játszanak.

A bemutatásra kerülő vizsgálat fő célja különböző súlyosságú atopiás dermatitisben szenvedő betegek szűrése a filaggrin gén két leggyakoribb mutációjára (R501X, 2282del4) nézve. Emellett bizonyos nemzetközileg is elfogadott barrier funkció vizsgálatokat végeztünk a betegeken, mint a bőr hidratáltságának, faggyútermelésének és transzepidermális vízvesztésének mérése, valamint a bőr mikrocirkulációnak vizsgálata laser-doppler scanninggel. Eredményeink szerint a klinikai tünetek súlyossága, a genetikai mutációk megléte és a barrier funkciók károsodásának foka összefüggést mutat atopiás dermatitises betegekben.

Rózsa Dávid, Boros Gábor, Emri Eszter, Miko Edit, Nagy Georgina,
Emri Gabriella dr., Remenyik Éva dr.:

Humán bőr in vivo transzfektálásának lehetőségei
(Debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum,
Bőrgyógyászati Klinika, Debrecen)

A transzfektációs technikák fejlődésével és a génterápia térhódításával kívánatosá vált a bőrön keresztül történő genetikai anyag bejuttatása. DNS bejuttatásával lehetségessé válik különböző bőrbetegségek kezelése, DNS vakcináció, valamint a keringésbe juttatva egyéb szisztémás betegségek kezelése is. A fő nehézséget a bőr barrier funkciója jelenti; bár állatmodelleken már sok módszer leírásra került, igazán jó metodika kidolgozása még nem sikerült. A transzfektációs technikákat többféleképpen is csoportosít-

hatjuk. Egyrészt elkülöníthetünk virális és nem virális módszereket, melyek közül a biztonságosabb nem virális technikák terjednek. Ezek között elkülöníthetünk kémiai és fizikai módszereket. A kémiai módszerek különféle vegyületekkel történő kezeléssel teszik a bőr str. corneumát átjárhatóvá, vagy kerülik meg azt (pl. liposzómák), a fizikai módszerek ugyanezt a str. corneum fizikai roncsolásával érik el (pl. génpuska, elektroporáció). A génterápia szempontjából olyan módszerek kidolgozása szükséges, melyekkel nukleinsavak bejuttatása lehetséges, méghozzá úgy, hogy a hatás lehetőleg hosszú távú legyen, és ne okozzon a páciensnek kellemetlenséget. A stabil RNS molekulák létrehozásának kidolgozásával lehetővé vált a mellékhatás-mentes, gyors és nagy hatékonyságú transzláció. Az előadásban bemutatásra kerül az *in vivo* bőrön keresztüli transzfektációs technikák fejlődése, valamint az ezen a területen elért néhány saját eredményünk.

Jókai Hajnalka dr.¹, Szakonyi József dr.¹, Barna Gábor dr.²,
Kontár Orsolya dr.¹, Kárpáti Sarolta dr.¹, Holló Péter dr.¹:

A cutan lymphocytaasszociált antigén prognosztikai szerepe psoriasis TNF-alpha gátló kezelésében
(Semmelweis Egyetem, Bőr- Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika,
Budapest¹, Semmelweis Egyetem, I. Patológiai Intézet,
Budapest²)

A TNF-alpha gátlók a súlyos psoriasisban szenvedő betegek jelentős részénél nagy terápiás hatékonysággal alkalmazott biológiai válaszmódosító szerek. Ennek ellenére a betegek nem elhanyagolható hányadánál hosszútávú kezelés során a bőrtünetek, izületi panaszok markáns relapszusa tapasztalható. A terápia tartós hatékonyságát hitelesen előrejelezni képes, könnyen vizsgálható klinikai/laboratóriumi/genetikai markerre vonatkozóan egyelőre nem áll rendelkezésre adat az irodalomban.

A cutan lymphocytaasszociált antigén (CLA) a bőrbe vándorló T-lymphocyta-sejtfelszíni, szövetspecifikus homing-molekulájaként fontos szerepet tölt be a psoriasis pathogenezisében.

Vizsgálatunk elsődleges céljaként a CLA prognosztikai jelentőségével kapcsolatos korábbi eredményeink bővítését, nagyobb vizsgált beteganyag adataival történő alátámasztását tűztük ki.

38, súlyos krónikus plakkos psoriasisban szenvedő páciensünkől perifériás vérmintát gyűjtöttünk a TNF-alpha gátló biológiai terápia megkezdése előtt, majd a kezelés kezdetétől számított 2 és 6 hét elteltével. A vérmintákból áramláscitometriai módszer segítségével határoztuk meg a keringő lymphocyta, valamint a $CD3+CD4+$ és $CD3+CD8+$ T-lymphocyta szubpopulációk CLA-expresszióját. A kiindulási értékeket 5 egészséges kontroll mért expressziós adataival hasonlítottuk össze. A CLA+ lymphocyta számának alakulását a klinikai állapotot tükröző, meghatározott időpontokban (kezelés előtt, 2. és 6. hét, 3. és 6. hónap) regisztrált PASI ponttérréssel vetettük össze.

Mind a 38 betegnél jelentős PASI-csökkenést (átlag 80%) találtunk a terápia 6. hetének végén. Az utánkövetési periódusban (6. hónap vége) nyert adatok alapján azonban a betegeket klinikai állapotuk változását tekintve két csoportra tudtuk osztani: javuló (32/38) és visszaeső (romló) (6/38) csoport. A két csoport kezdeti CLA-expressziójának vonatkozásában szignifikánsan magasabb értékeket detektáltunk a későbbiekben visszaesést mutató betegeknél. (CLA+ lymphocyta-szám a teljes keringő sejtpopulációhoz viszonyítva -CLA tot%-: $p=0,013617$; CLA+ lymphocyta-szám a keringő lymphocyta-khoz viszonyítva -CLA lymph%-: $p=0,042639$; CLA+ $CD3+CD4+$ T-lymphocyta-szám a teljes keringő sejtpopulációhoz viszonyítva -CLA $CD4+$ Tlymph%-: $p=0,033745$; CLA+ $CD3+CD8+$ T-lymphocyta-szám a teljes keringő sejtpopulációhoz viszonyítva -CLA $CD8+$ Tlymph%-: $p=0,042345$). A terápia kezdetétől számított 6 hetes vizsgálati időszakban szignifikánsan növekvő expressziós rátát észleltünk a javuló csoportban (CLA tot% $p=0,000019$), míg szignifikánsan csökkent a visszaesőknél (CLA tot% $p=0,042607$).

A kapott eredmények megerősítik feltevésünket, miszerint a CLA a psoriasisban alkalmazott biológiai terápia hosszútávú eredményességének hiteles, könnyen mérhető prognosztikai markerül szolgálhat.