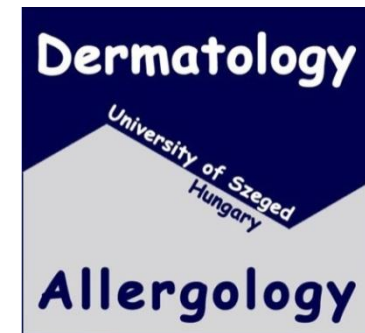
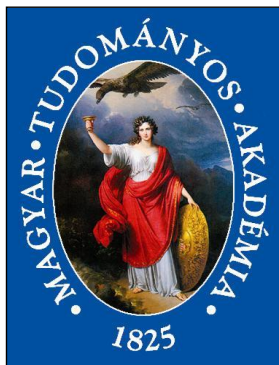




Pikkelysömör betegség patomechanizmusának ex vivo és in vitro vizsgálata

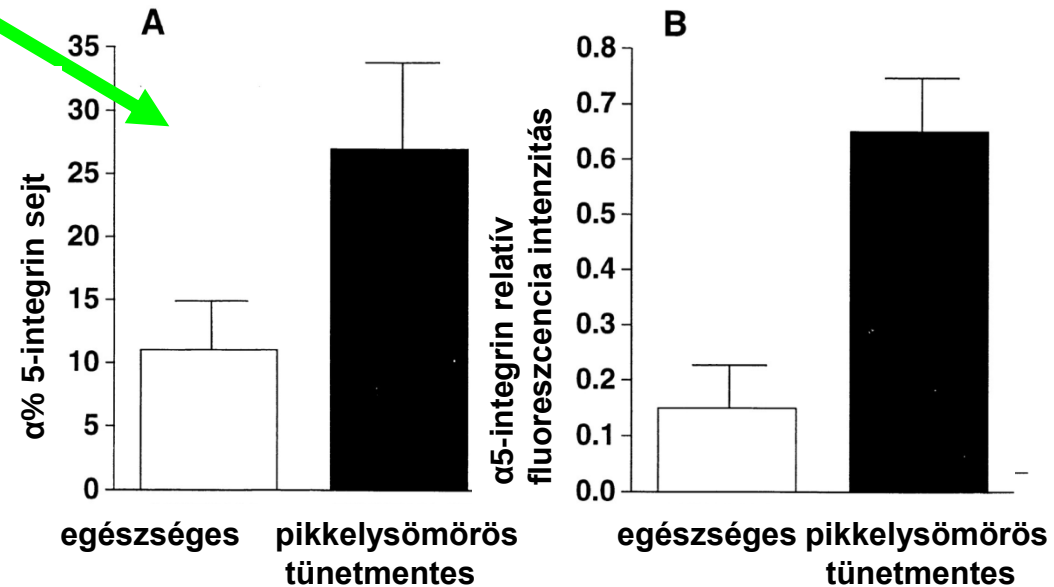
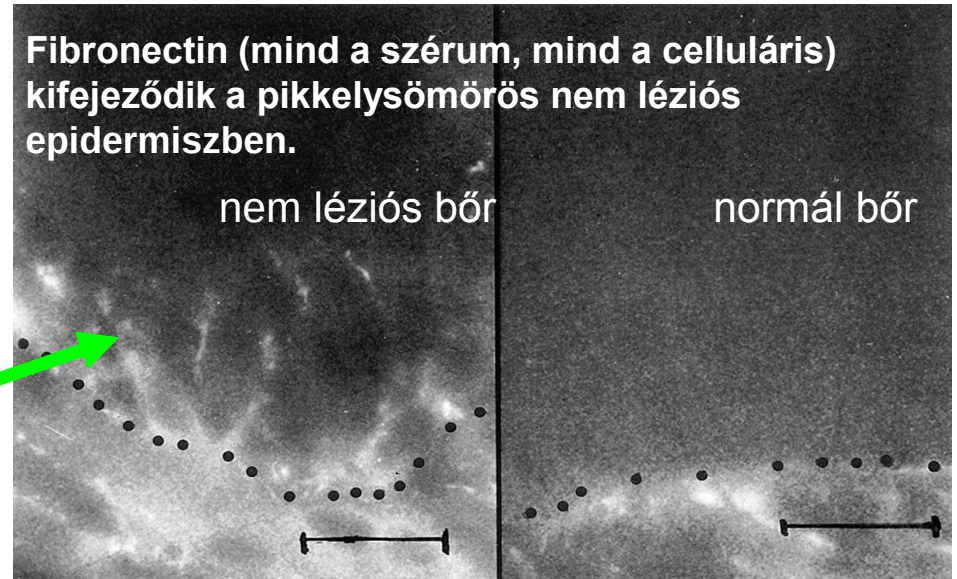
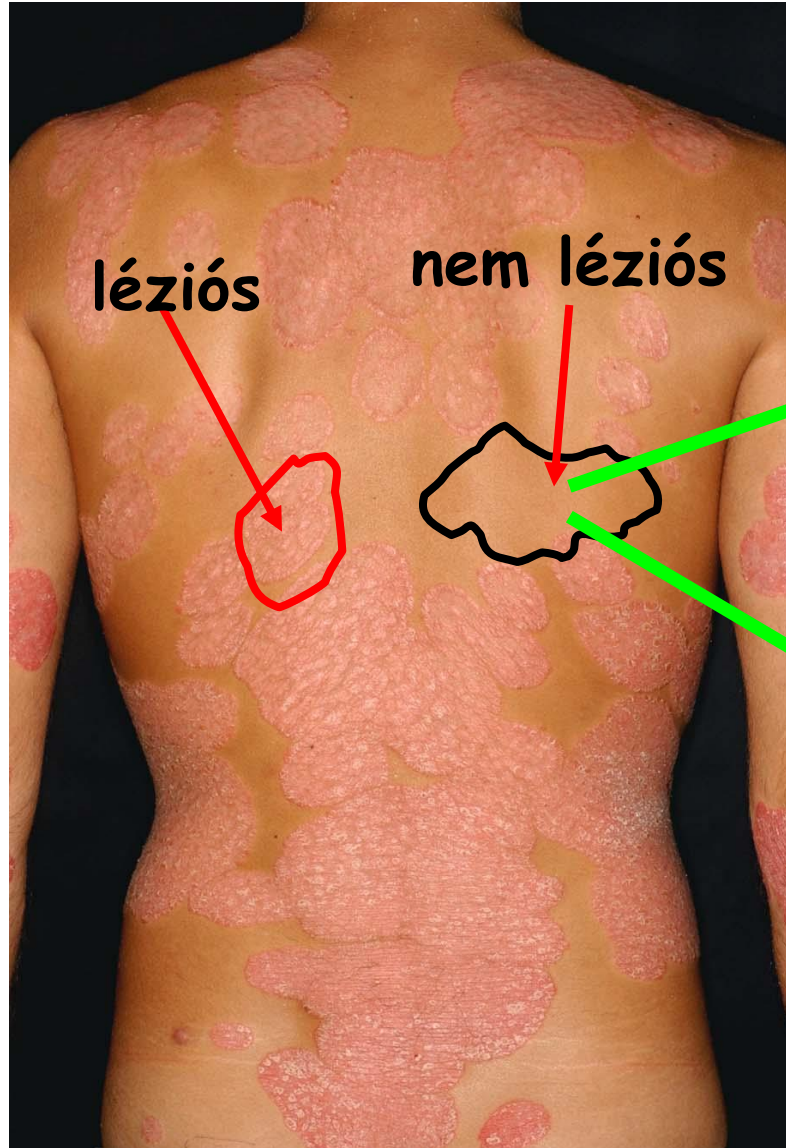
Vas Krisztina¹, Kormos Bernadett^{1,2}, Bebes Attila¹, Konczné Gubán Barbara¹,
Kui Róbert¹, Bende Balázs¹, Kocsis Ádám¹, Széll Márta²,
Kemény Lajos^{1,2}, Bata- Csörgő Zsuzsanna^{1,2}

¹ Szegedi Tudományegyetem, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika, Szeged

² MTA Dermatológiai Kutatócsoport, Szegedi Tudományegyetem, Szeged

Magyar Dermatológiai Társulat 85. Nagygyűlése
Budapest, 2012. 12. 6-8.

Pikkelysömörös tünetmentes bőr tulajdonságai eltérnek az egészséges bőrtől



epidermális sejtszuszpenzió

Köbner- jelenség



Fényprovokáció



Mechanikai irritáció

Vizsgálataink célja

1. Egészséges és pikkelysömörös tünetmentes bőrben lejátszódó gén- és fehérjeszintű változások megfigyelése mechanikai irritáció nélkül és annak hatására.

- KGF
 - KGFR
 - EDA⁺FN
 - α 5-integrin
- KGF  fokozza az α 5-integrin expresszióját
- KGF  indukálja a keratinociták osztódását
- KGF és EDA⁺FN  kórosan magas a pikkelysömörös bőrben

2. KGF és EDA⁺FN közötti szabályozási mechanizmus megfigyelése fibroblaszt sejteken.

fibroblaszt sejtek termelik  KGF és EDA⁺FN

Bata-Csorgo Zs et al. Fibronectin and alpha5 integrin regulate keratinocyte cell cycling J Clin Invest. 1998 Apr 1;101(7):1509-18.

Széll et al. Proliferating keratinocytes are putative sources of psoriasis susceptibility-related EDA⁺ (Extra Domain A of Fibronectin) oncofetal fibronectin J Invest Dermatol, 123:537-46, 2004

Kísérleti rendszerek

I. Ex vivo: (3 egészséges és 6 pikkelysömörös donor)

KGF, KGFR, EDA⁺FN, α 5-integrin gén- és fehérje expressziós vizsgálatok

1. real-time RT-PCR

Tape stripping után 6 óra múlva kezelt és kezeletlen shave biopszia

2. fluoreszcens immunfestés

Tape stripping után 24 és 48 óra múlva kezelt és kezeletlen punch biopszia

II. In vitro: (egészséges bőrből szeparált fibroblaszt sejtek)

EDA⁺FN gén- és fehérje expresszió követése exogén humán rekombináns KGF hatására

1. real-time RT-PCR (n=4)

2. fluoreszcens immunfestés (n=6)

3. áramlásos citometria (n=4)

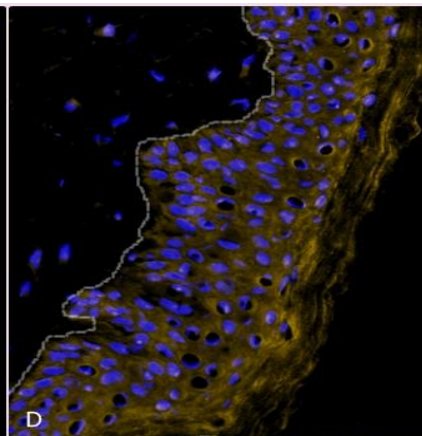
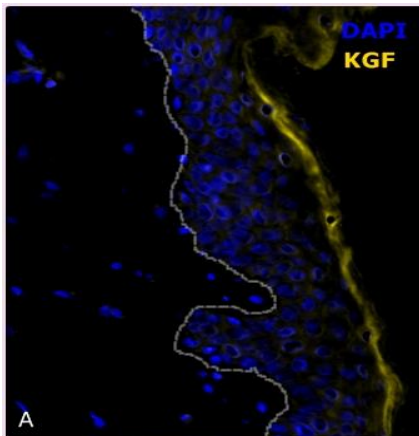
Fibroblaszt sejtek KGF receptorának vizsgálata

1. fluoreszcens immunfestés (n=2)

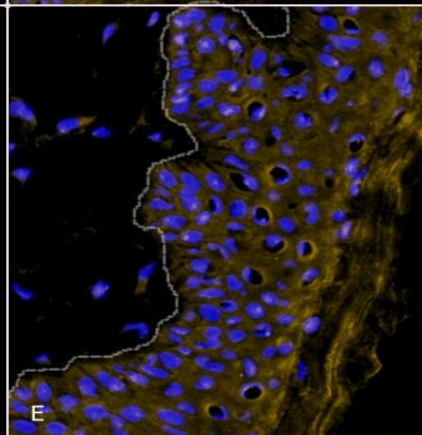
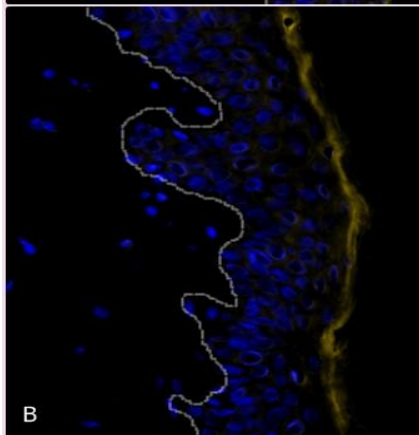
Egészséges

Pikkelysömörös tünetmentes

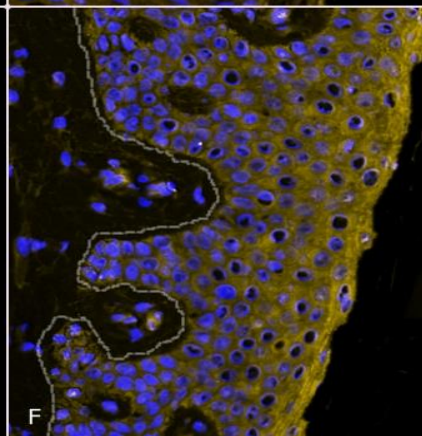
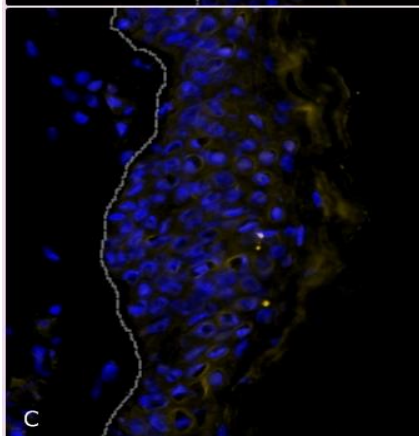
Kezeletlen



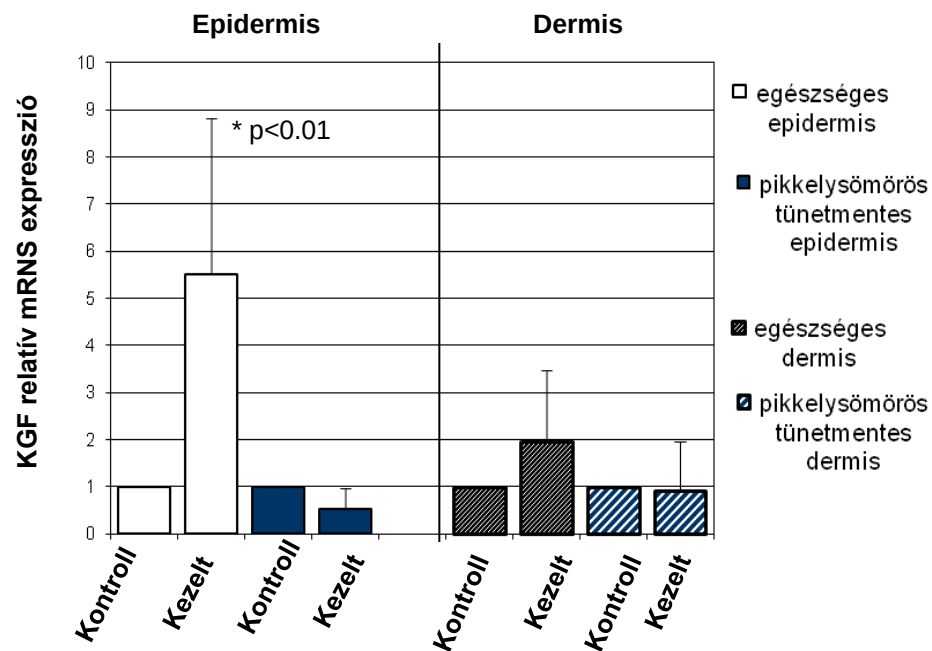
Kezelés után 24 órával



Kezelés után 48 órával



KGF gén- és fehérje expressziós változások detektálása fluoreszcens immunfestés és real-time RT-PCR segítségével



* $p < 0.01$ egyszempontos variancia analízis (ANOVA)

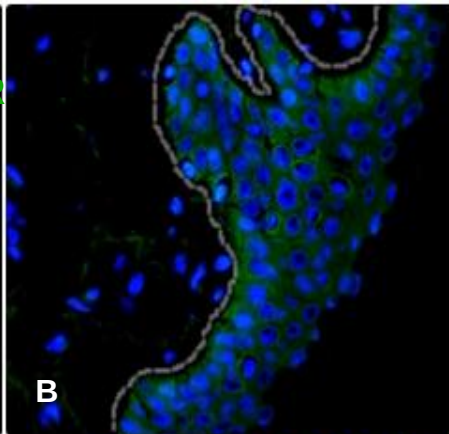
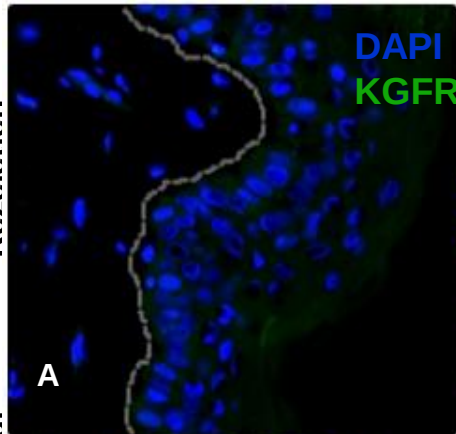
egészséges minta: $n=3$

pikkelysömörös tünetmentes minta: $n=6$

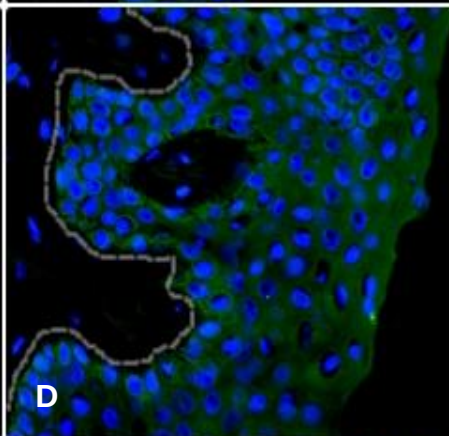
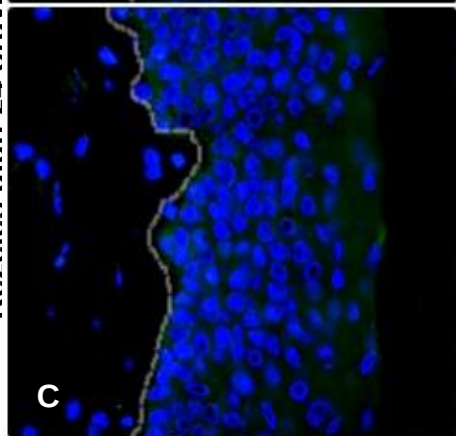
Egészséges

Pikkelysömörös tünetmentes

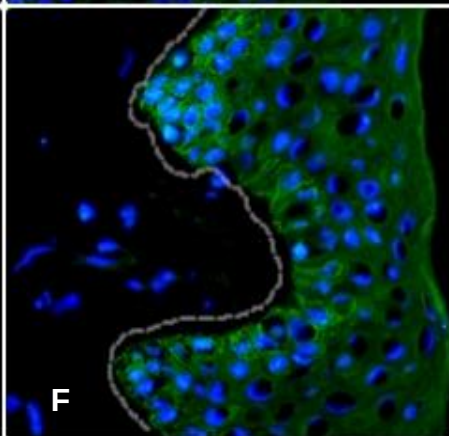
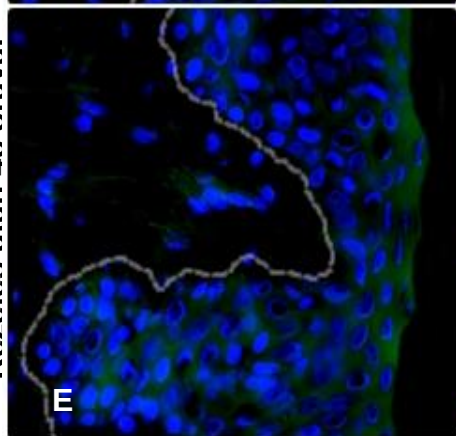
Kezeletlen



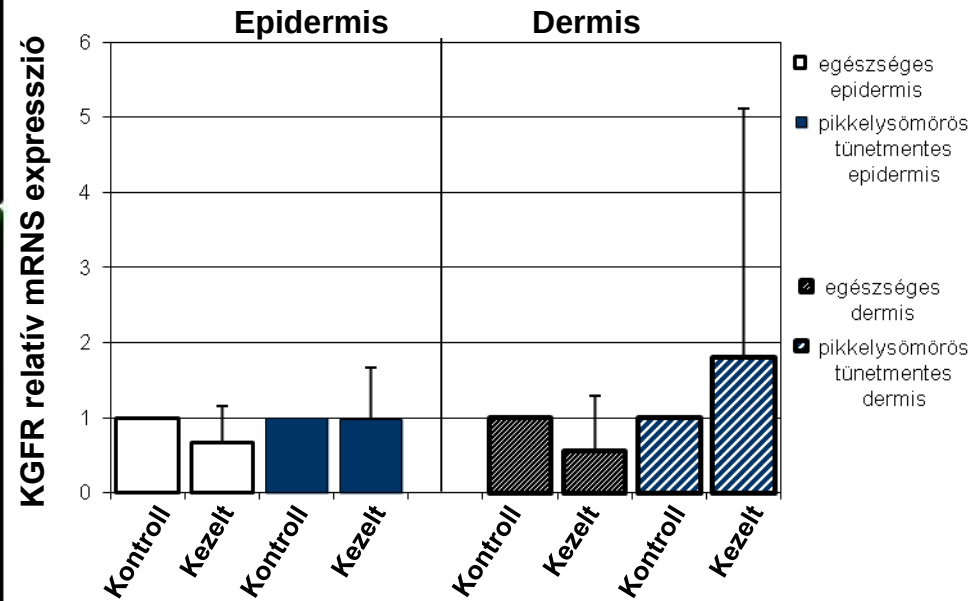
Kezelés után 24 órával



Kezelés után 48 órával



KGFR gén- és fehérje expressziós változás detektálása fluoreszcens immunfestés és real-time RT-PCR segítségével



egészséges minta: n=3

pikkelysömörös tünetmentes minta: n=6

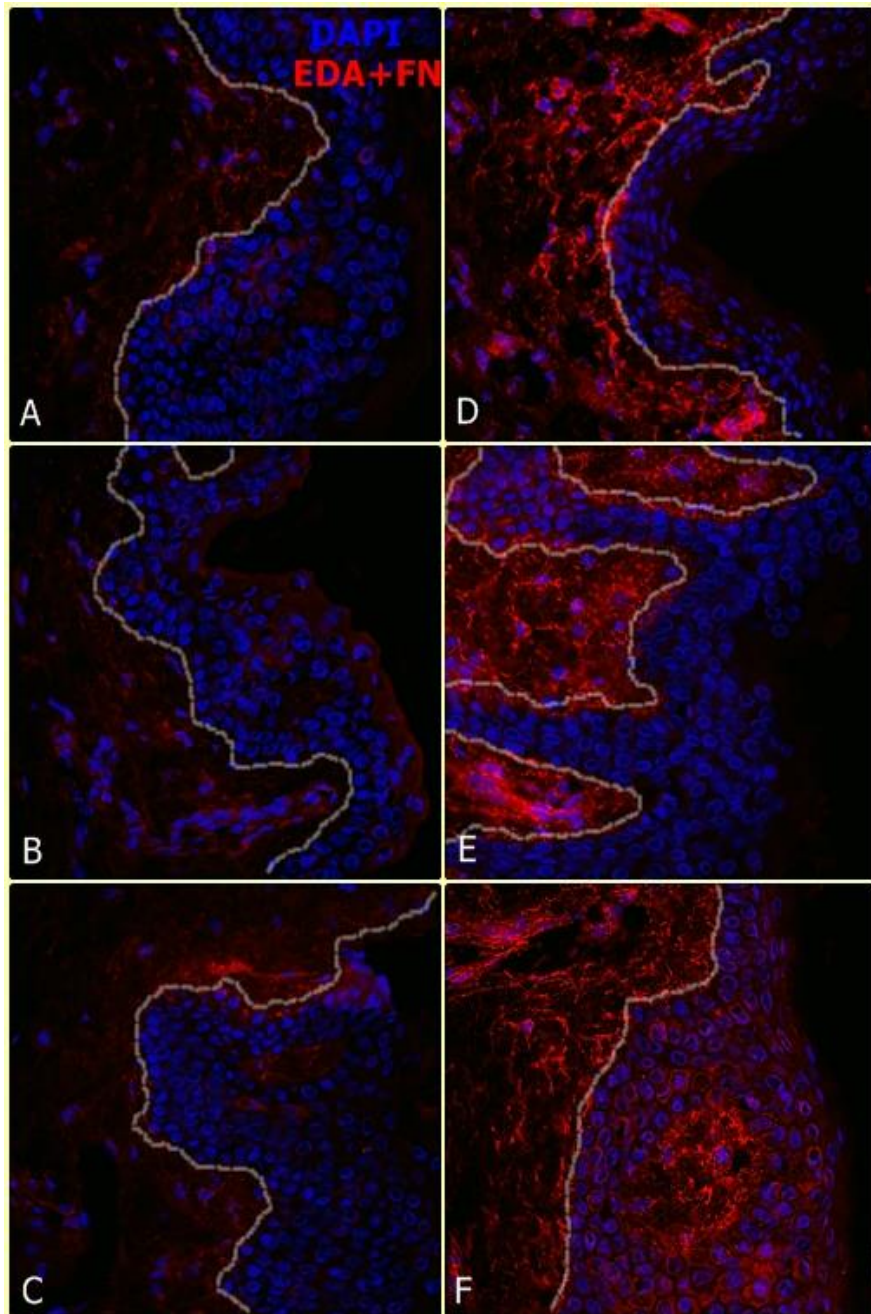
Egészséges

Pikkelysömörös tünetmentes

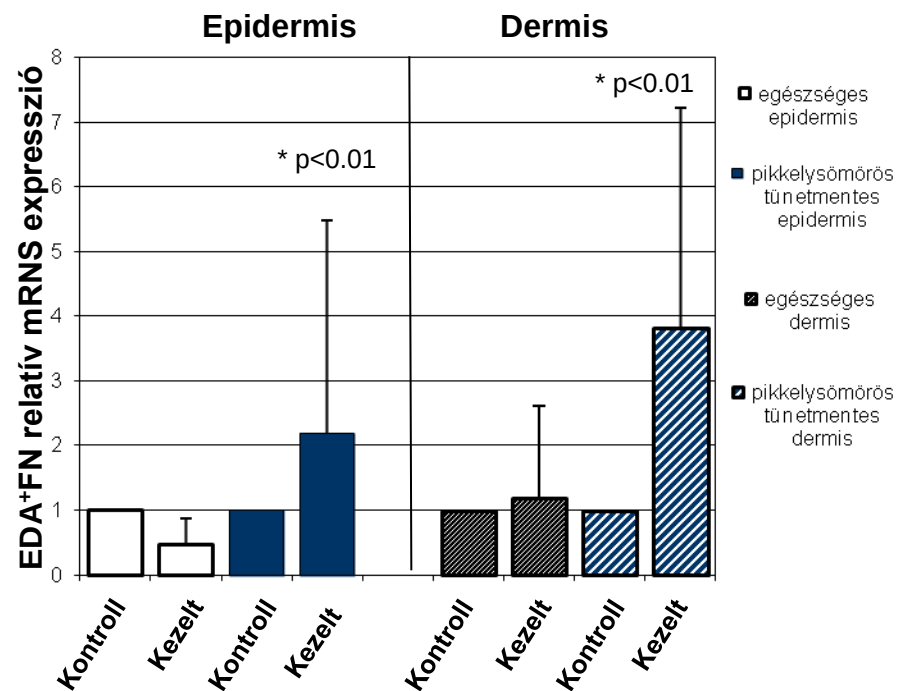
Kezeletlen

Kezelés után 24 órával

Kezelés után 48 órával



EDA+FN gén- és fehérje expressziós változás detektálása fluoreszcens immunfestés és real-time RT-PCR segítségével



* $p < 0.01$ egyszempontos variancia analízis (ANOVA)

egészséges minta: $n = 3$

pikkelysömörös tünetmentes minta: $n = 6$

Egészséges

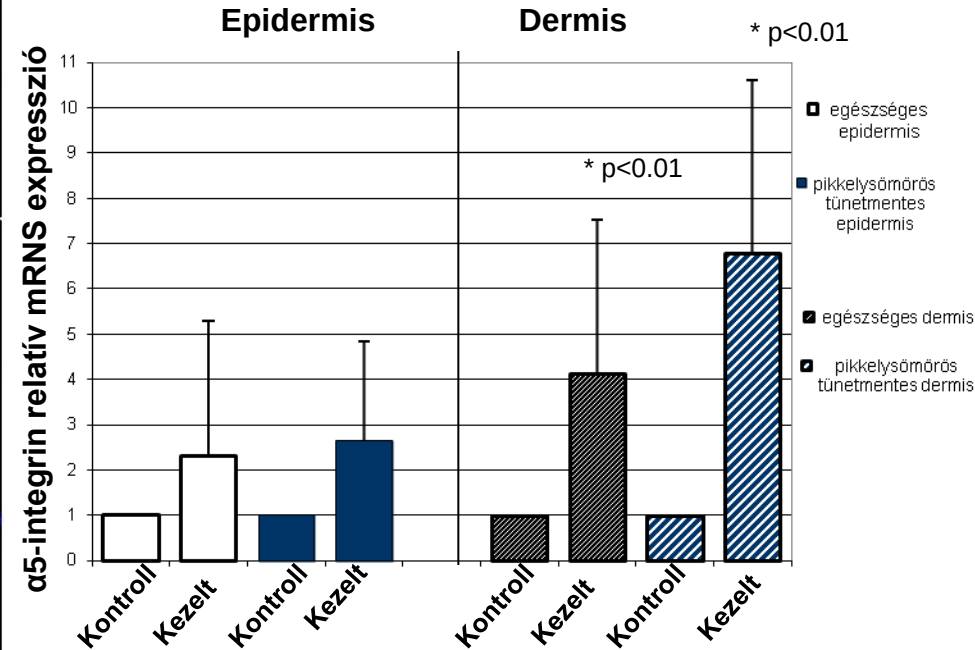
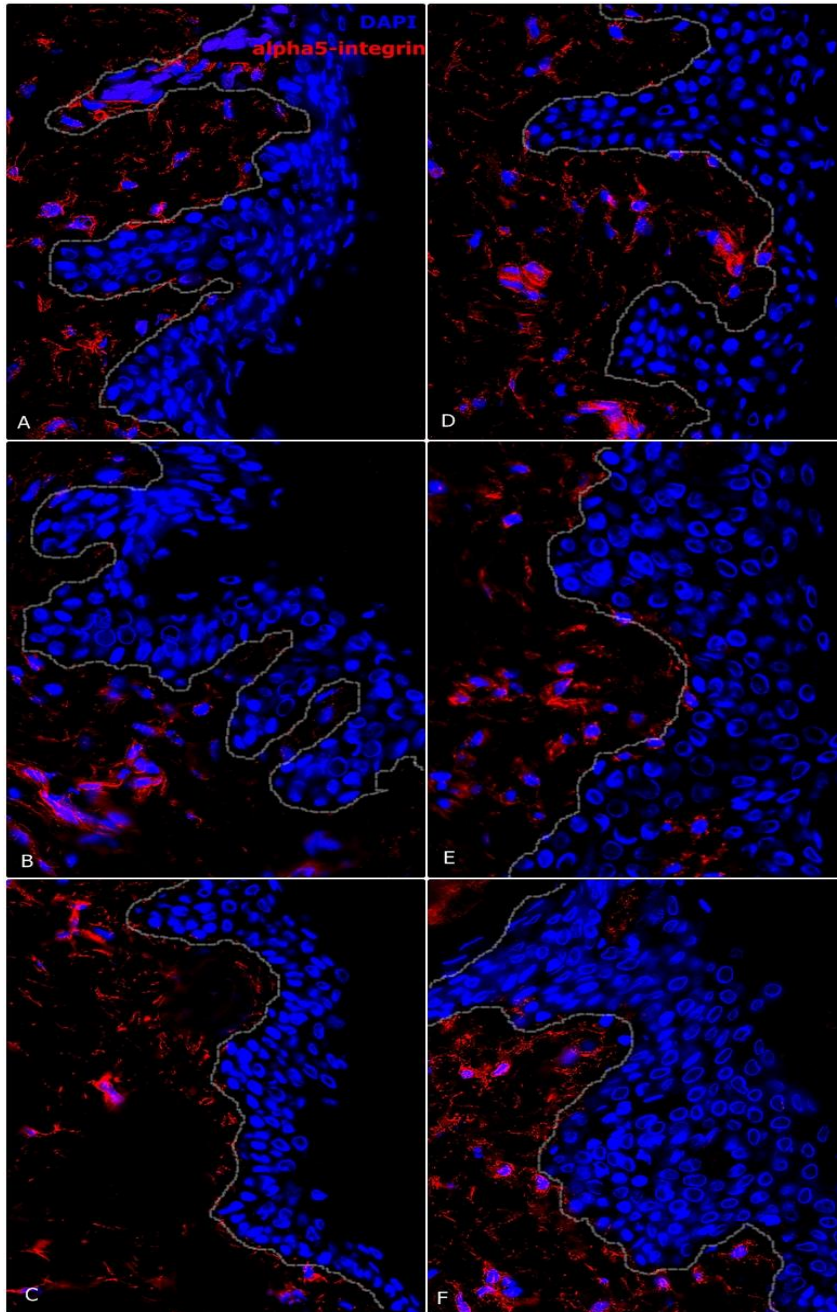
Pikkelysömörös tünetmentes

$\alpha 5$ -integrin gén- és fehérje expressziós változás detektálása fluoreszcens immunfestés és real-time RT-PCR segítségével

Kezeletlen

Kezelés után 24 órával

Kezelés után 48 órával



* $p < 0.01$ egyszempontos variancia analízis (ANOVA)

egészséges minta: $n = 3$

pikkelysömörös tünetmentes minta: $n = 6$

Kísérleti rendszerek

I. Ex vivo: (3 egészséges és 6 pikkelysömörös donor)

KGF, KGFR, EDA⁺FN, α 5-integrin gén- és fehérje expressziós vizsgálatok

1. real-time RT-PCR

Tape stripping után 6 óra múlva kezelt és kezeletlen shave biopszia

2. fluoreszcens immunfestés

Tape stripping után 24 és 48 óra múlva kezelt és kezeletlen punch biopszia

II. In vitro: (egészséges bőrből szeparált fibroblaszt sejtek)

EDA⁺FN gén- és fehérje expresszió követése exogén humán rekombináns KGF hatására

1. real-time RT-PCR (n=4)

2. fluoreszcens immunfestés (n=6)

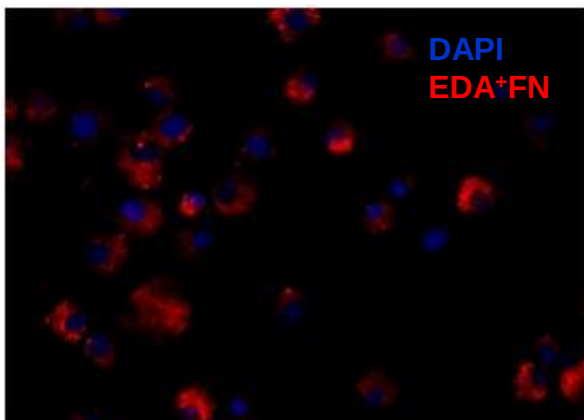
3. áramlásos citometria (n=4)

Fibroblaszt sejtek KGF receptorának vizsgálata

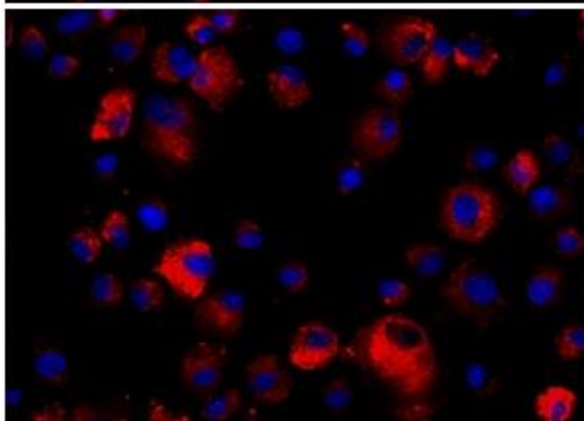
1. fluoreszcens immunfestés (n=2)

Exogén KGF kezelés hatására a fibroblaszt sejtekben szignifikánsan növekedett az EDA⁺FN termelés

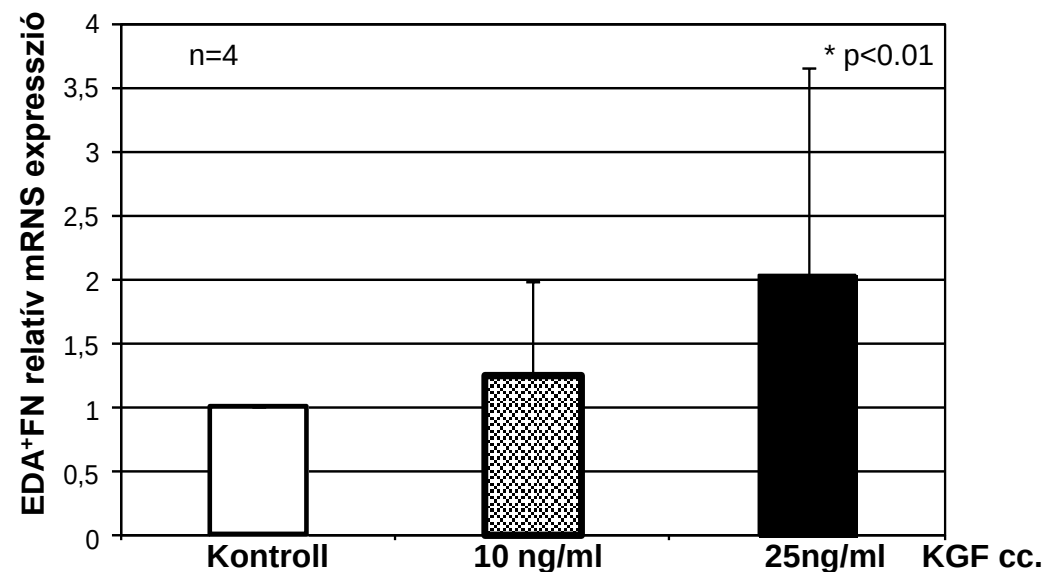
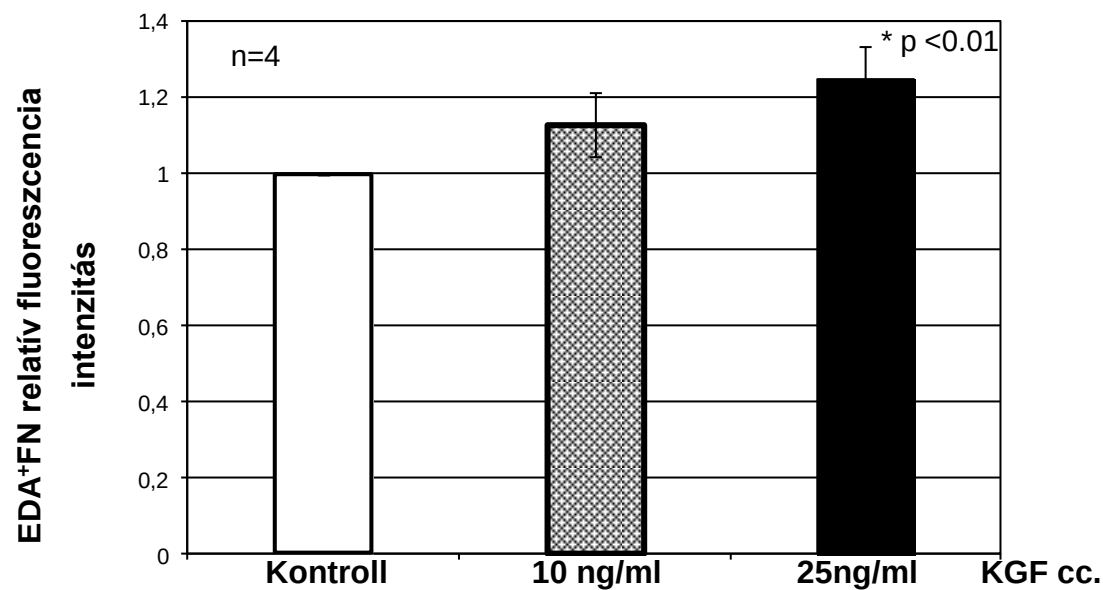
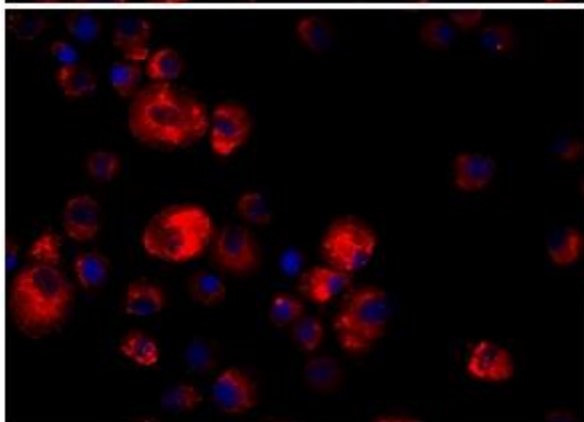
Kontroll



10 ng/ml KGF kezelés

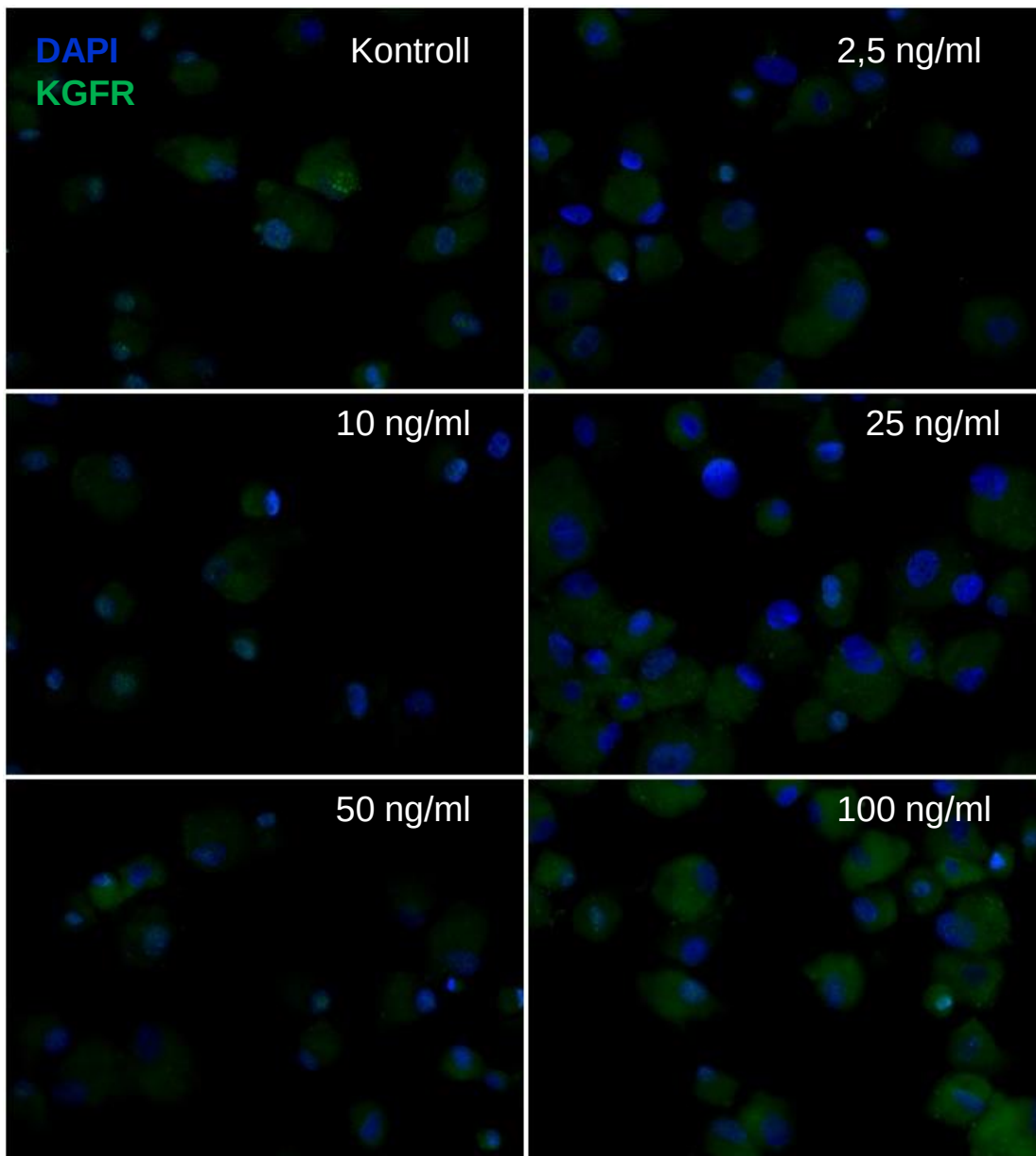


25 ng/ml KGF kezelés



*p<0.01 egyszempontos variancia analízis (ANOVA)

Normál humán fibroblaszt sejtek KGFR kifejeződése KGF kezelés nélkül és kezelést követően



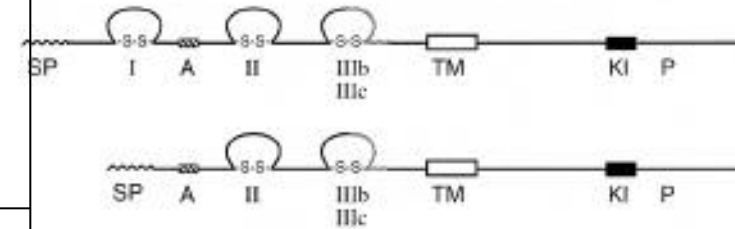
KGF (FGF-7): humán rekombináns

Elsődleges Ab: Bek (C-17), rabbit PoAb,

Másodlagos Ab: anti-rabbit Alexa Fluor 488

FGF receptor család és kifejeződése

FGF receptorok				
név	méret (kDa)	variáns	specifititás	sejtfelszíni expresszió
FGF- R1	150	IIIb	FGF-1	fibroblaszt, endothel, érfal simaizom
		IIIc	FGF-1,2,4	macrophag, tumor sejt hematopoetikus progenitor
FGF-R2 bek	135	IIIb	FGF-1,2,7	keratinocyta
		IIIc	FGF-1,2,4	fibroblaszt, érfal simaizom, lymphocyta, astrocyta, hematopoetikus progenitor sarcoma
FGF-R3 cek-2	135	IIIb	FGF-1,2	keratinocyta
		IIIc	FGF-1,4,9	fibroblaszt, monocyta, hematopoetikus progenitor, érfal simaizom
FGF-R4	110		FGF-1,2,6	multipotens őssejt



FGF receptor struktúrája

SP: signal peptide

A: acidic region

I, II, III: Ig-like domains

TM: transmembran

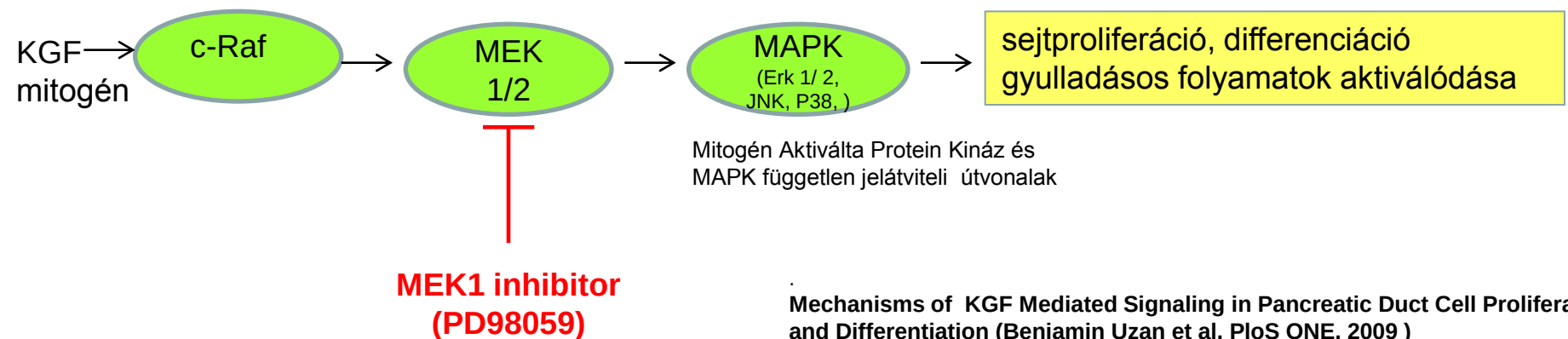
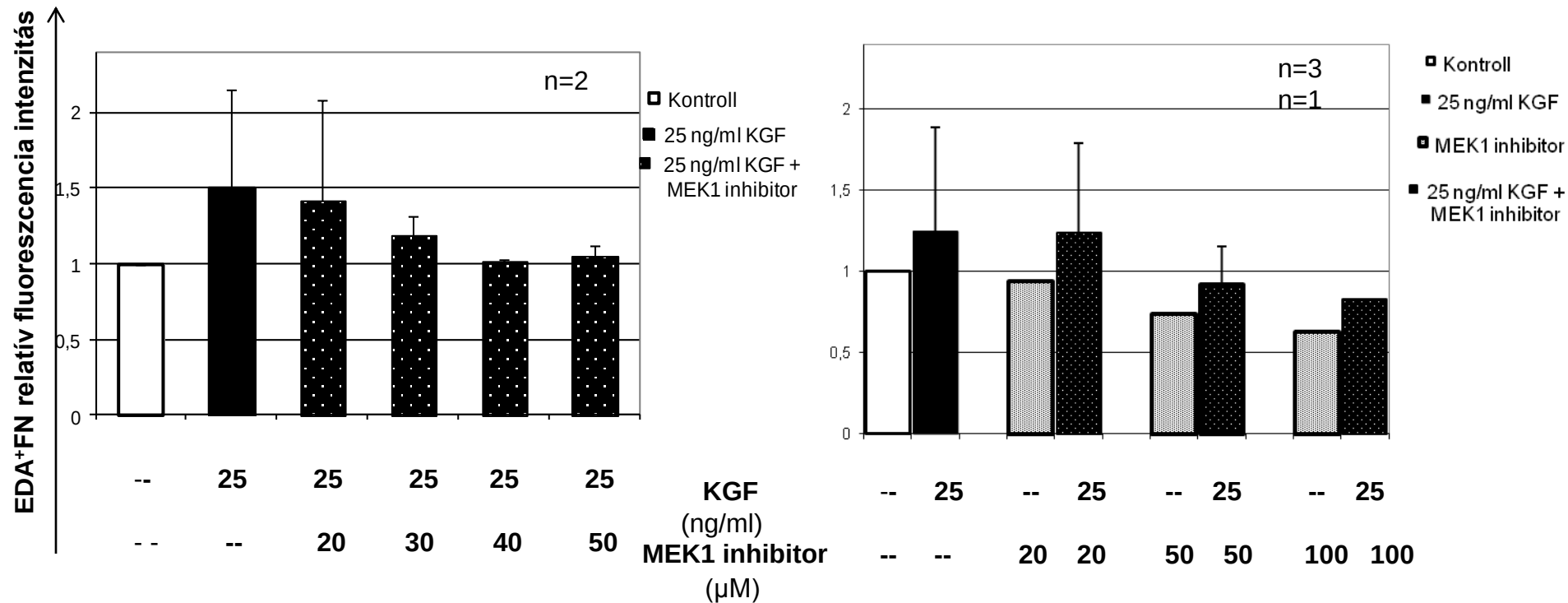
KI: kinase insert

P: putative site of autophosphorylation

s-s: disulfide bond

FGF-7 : KGF

MEK1 inhibitor hatására csökken a normál humán fibroblasztok EDA+FN termelése



Összefoglalás

I. Ex vivo kísérletek:

1. Mechanikai stressz nélkül és annak hatására az egészséges- és a pikkelysömörös tünetmentes bőrben detektált gén- és fehérje expressziós eltérések bizonyítják, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőr homeosztázisa abnormális.

II. In vitro kísérletek:

1. Exogén KGF (25 ng/ml) kezelés hatására a fibroblaszt sejtekben gén- és fehérje szinten fokozódik az EDA⁺FN termelés. („pikkelysömör-modell”)
2. Mivel az exogén KGF kezelés hatással van a fibroblaszt sejtek EDA⁺FN termelésére, ezért feltételezhető, hogy a sejtek KGF-t kötő receptorral rendelkeznek.
3. MEK1 inhibitor hatására csökken a normál humán fibroblasztok EDA⁺FN termelése.
4. A fibroblaszt sejtek EDA⁺FN és KGF termelésének nemcsak paracrin (keratinocyták) hanem autocrin (fibroblaszt) hatása is van.

