

TARTU ÜLIKOOL
Arstiteaduskond
Füsioloogia instituut

Melanokortiini süsteemiga seotud geenide ekspressiooni uurimine
vitiliigopatsientide nahas

Eerik Aunin

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendajad: Sulev Kõks (Ph.D.), Külli Kingo (Ph.D.), Ursel Soomets (Ph.D.)

Tartu 2007

Sisukord

	Sissejuhatus	4
	Lühendid	5
1	Kirjanduse ülevaade	7
1.1	Vitiliigo	7
1.1.1	Vitiliigo kliiniline kirjeldus	7
1.1.2	Vitiliigo võimalikud tekkepõhjused	7
1.1.3	Autoimmuunsus vitiliigopatsientidel	8
1.1.4	Autotsütotoksilisus vitiliigopatsientidel	9
1.1.5	Melanotsüütide kasvufaktorite puudulikkus	11
1.2	Melanokortiini süsteem	11
1.2.1	Melanokortiini süsteemi üldkirjeldus	11
1.2.2	POMC	12
1.2.3	Melanokortiini retseptorid: MC1R-MC5R	13
1.2.4	Melanokortiini retseptorite agonistid: α -MSH, ACTH	15
1.2.5	Melanokortiini retseptorite antagonistid: ASIP ja AGRP	16
1.3	Signaaliülekanne melanokortiini süsteemilt melanogeneesiensüümideni	17
1.3.1	Melanokortiini süsteemi ja melanogeneesiensüümide vahelise signaaliülekanne üldkirjeldus	17
1.3.2	Melanogeneesiensüümid: TYR, TYRP1 ja DCT	19
1.3.3	Melanogeneesiensüümide transkriptsiooni regulaatorid: MITF-M, LEF1, USF1	20
1.3.4	cAMP signaali MITF-M'le ülekandjad: p38 ja CREB1	21
1.3.5	p38 ja CREB1 aktiivsuste regulaatorid: PI3K ja p70(S6)K	23
1.3.6	Antiapoptootiline faktor BCL2	24
2	Töö eesmärgid	25
3	Materjalid ja meetodid	26
3.1.1	Nahaproovid	26
3.1.2	Patsientide ja kontrollisikute karakteristikud	26
3.1.3	RNA eraldamine nahaproovidest	29
3.1.4	cDNA süntees	29
3.1.5	QRT-PCR	29
3.1.6	Andmete statistiline analüüs	30
4	Tulemused	32
4.1.1	mRNA ekspressiooni detekteerimiseks vajalikud QRT-PCR'i amplifikatsioonitsükli arvud	32
4.1.2	Geenide ekspressioonierinevused vitiliigopatsientide terve ja haige naha ja tervete kontrollisikute naha vahel	32
4.1.3	Korrelatsioonianalüüs geenide ekspressioonitasemete omavaheliste võimalike interaktsioonide leidmiseks	36
5	Arutelu	37
5.1.1	Melanokortiini süsteemi geenid	37
5.1.2	Melanogeneesiensüümid	39
5.1.3	Geenid, mis osalevad signaaliülekanDES melanokortiini süsteemilt melanogeneesiensüümidele	39
5.1.4	Kokkuvõttev joonis uuritud geenide ekspressioonitasemete muutustest vitiliigopatsientide nahas	42
6	Järeldused	43
	Lühikokkuvõte	44
6.1.1	Kokkuvõte	44

	6.1.2	Abstract.....	45
7		Tänuavaldused.....	47
8		Lisad.....	48
9		Viited.....	51

Sissejuhatus

Vitiliigo on krooniline haigus, mille puhul nahale tekivad ebakorrapärase kujuga valged laigud, mis on põhjustatud nendes nahapiirkondades pigmendi tootmise lakkamisest ja melanotsüütide hävimisest. Pole selge, mis melanotsüütide funktsiooni kadumise algpõhjuseks on. Kirjanduse põhjal on teada, et melanogeneesiensüümide ekspressioonitasemed vitiliigopatsientide kahjustatud nahas on kahjustamata nahaga võrreldes langenud. Samas ei ole lõpuni selge, milliste regulaatorsete geenide ekspressioonitasemete muutustest pigmenti tootvate ensüümide ekspressiooni langus tuleneb. Lisaks sellele esineb vitiliigopatsientide nahas häireid seoses nii oksüdatiivse stressi taluvusega kui ka immuunvastusega.

Melanokortiini süsteem on kokkuvõttev nimetus pro-opiomelanokortiini (POMC) posttranslatsioonilisel protsessingul tekkivatele peptiididele, nende peptiidide spetsiifilistele retseptoritele ja nende retseptorite antagonistidele. Melanokortiini süsteem täidab erinevates kudedes väga erinevaid stressivastusega seotud funktsioone, millest nahas on olulisimad pigmentatsiooniensüümide ekspressiooni üles reguleerimine ning põletiku ja oksüdatiivse stressi vähendamine. Seega reguleerib melanokortiini süsteem nahas suures osas samu protsesse, mis on vitiliigopatsientide nahas häiritud.

Varasemast on teada POMC'i protsessingul tekkiva α -melanotsüüte stimuleeriva hormooni (α -MSH) langenud ekspressioonitase vitiliigopatsientide nahas ja vereseerumis, ülejäänud melanokortiini süsteemi geeniekspressioonide tasemeid vitiliigopatsientide nahas seni mõõdetud pole. Samuti pole seni mõõdetud vitiliigopatsientide nahas ekspressioonitasemeid enamikul geenidest, mis on seotud signaaliülekandega melanokortiini süsteemilt melanogeneesiensüümidele. Kirjanduse põhjal teada on ainult, et langenud on selles signaalrajas osaleva mikroftalmiiga seotud transkriptsioonifaktor-M'i (MITF-M) ekspressioon.

Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada melanokortiini süsteemi geenide ja signaaliülekande melanokortiini süsteemilt pigmentatsiooniensüümidele osalevate geenide tähtsust vitiliigo patogeneesis. Selleks mõõdeti kvantitatiivsel pöördtranskriptaasi ahelreaktsiooni (QRT-PCR) meetodil vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata nahas ning tervete kontrollisikute nahas ekspressioonitasemed kolmel geeniderühmal. Esiteks melanokortiini süsteemi geenidel (8 geeni), teiseks geenidel, mis osalevad signaaliülekande melanokortiini süsteemilt pigmenti tootvate ensüümideni (8 geeni), kolmandaks melanogeneesiensüümidel (3 geeni).

Lühendid

6-BH4	6-tetrahüdripteriin
AC	adenülaaditsüklaas
ACTH	adrenokortikotroopne hormoon
AGRP	agouti-taoline valk (<i>agouti related protein</i>)
ASIP	agouti signalseerimisvalk (<i>agouti signaling protein</i>)
BCL2	B-raku lümfoom 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
bFGF	aluseline fibroblasti-kasvufaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
b-HLH-zip	aluseline heeliks-ling-heeliks-leutsiinitõmblukk (<i>basic helix-loop-helix-leucine zipper</i>)
cAMP	tsükliline adenosiinmonofosfaat
CD8	diferentseerumisklaster 8 (<i>cluster of differentiation 8</i>)
cDNA	komplementaarne DNA
cGMP	tsükliline guanosiinmonofosfaat
C-KIT	retseptor-türosiinkinaas CD117
CRE	tsüklilise adenosiinmonofosfaadi vastuselement (<i>cAMP response element</i>)
CREB1	tsüklilise adenosiinmonofosfaadi vastuselemendiga seonduv valk 1 (<i>cAMP response element-binding 1</i>)
CRH	kortikotropiini vabastav hormoon (<i>corticotropin-releasing hormone</i>)
Ct	tsüklilävi (<i>cycle threshold</i>)
DAG	diatsüülgütserool
DCT	dopakroomi tautomeraas
DHICA	5,6-dihüdrosüindool-2-karboksüülhape
FAM	6-karboksüfluorestseiin
FOXO	kahvlipka boksi geen, grupp O (<i>forkhead box gene, group O</i>)
GATA3	(A/T)GATA(A/G) motiiviga seonduv transkriptsioonifaktor 3
GM-CSF	granulotsüütide-makrofaagide kolooniat stimuleeriv faktor
gp100	glükoproteiin 100 kDa
HPRT1	hüpoksantiin-guaaniin fosforibosüül-transferaas-1 (<i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1</i>)
ICAM1	rakusisene adhesioonimolekul 1 (<i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
IP ₃	inositool 1,4,5-trisfosfaat
JAK/STAT	Janus kinaas/signaaliülekanjad ja transkriptsiooniaktivaatorid (<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>)
LEF1	lümfoidi soodustava elemendiga seonduv faktor 1 (<i>lymphoid-enhancer binding factor 1</i>)
M	meeste arv uuringus
MAPK	mitogeeni poolt aktiveeritav valgukinaas (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MART1	T-rakkude poolt ära tuntav melanoomiantigeen 1 (<i>melanoma antigen recognized by T cells 1</i>)
MC1R-MC5R	melanokortiini retseptor 1-5
MCHR1	melaniini kontsentreeriva hormooni retseptor 1
MGB	DNA väikse õnarusega seonduv (<i>DNA minor groove binder</i>)
MHC II	peamine koesobivuskompleks II (<i>major histocompatibility complex II</i>)
MITF-M	mikroftalmiaga seotud transkriptsioonifaktor-M (<i>microphthalmia-associated transcription factor-M</i>)
N	naiste arv uuringus
NO	lämmastik(II)oksiid
p38	38 kDa MAP kinaas
p70(S6)K	70 kDa ribosomaalse valgu S6 kinaas

p90RSK	90 kDa ribosomaalse valgu S6 kinaas
PI3K	fosfoinositiid-3-kinaas
PIK3CB	fosfoinositiid-3-kinaasi katalüütiline subühik p110 β
PKA, PKB,	
PKC, PKG	proteiinkinaas A, B, C, G
POMC	pro-opiomelanokortiin
QRT-PCR	kvantitatiivne pöödranskriptaasi ahelreaktsioon (<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RPS6KB1	p70(S6)K kodeeriv geen
SCF	tüvirakufaktor (<i>stem cell factor</i>)
SEM	keskmiste väärtuste standardviga (<i>standard error of the mean</i>)
SOX	Y-kromosoomi sugu määrava piirkonna taoline boks (<i>sex-determining region of the Y chromosome-like box</i>)
TGF β	kasvaja-kasvufaktor β (<i>tumor growth factor β</i>)
Th1, Th2	T-abistajarakk 1, T-abistajarakk 2 (<i>T-helper 1, T-helper 2</i>)
TNF α	kasvaja nekroosifaktor α (<i>tumor necrosis factor α</i>)
TRAIL	kasvaja nekroosifaktoriga seotud apoptoosi esile kutsuv ligand (<i>tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand</i>)
Treg	regulatoorne T-rakk
TYRP	türosinaasi-taoline valk (<i>tyrosinase related protein</i>)
USF1	ülesvoolu transkriptsioonifaktor 1 (<i>upstream transcription factor 1</i>)
UV	ultraviolett
VIC-TAMRA	VIC-6-karboksü-tetrametüül-rodamiin (<i>VIC-6-carboxy-tetramethyl-rhodamine</i>)
α -, β -, γ -MSH	α -, β -, γ -melanotsüüte stimuleeriv hormoon

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Vitiliigo

1.1.1 Vitiliigo kliiniline kirjeldus

Vitiliigo on omandatud nahahaigus, mille korral esineb laikudena nahapigmentatsiooni kadumine, mis on põhjustatud sellest, et melanotsüüdid minetavad võime pigmenti toota ja seejärel hävivad. Vitiliigo all kannatab 1-2% rahvastikust, haiguse esinemises ei ole olulisi soost, rassist või geograafilisest piirkonnast tingitud erinevusi (Huggins *et al.*, 2005; Howitz *et al.*, 1977).

Eristatakse vitiliigo kahte alatüüpi: mittesegmentaalne ja segmentaalne, neist esimene moodustab 72-95% kõigist vitiliigojuhtudest, teine 5-28% (Huggins *et al.*, 2005). Mittesegmentaalse vitiliigo korral on haiguslaigud enamasti sümmeetriliselt jaotunud (sarnane paigutus mõlemal kehapoolel), uued haiguskolded võivad tekkida kogu patsiendi elu jooksul. Segmentaalse vitiliigo haiguslaigud on ebasümmeetrilised (ainult ühel kehapoolel korraga), dermatoomse paiknemisega (Huggins *et al.*, 2005).

Segmentaalne vitiliigo erineb mittesegmentaalsest nii etioloogia, esinemissageduse kui ka ravimisviiside osas. Mittesegmentaalsel vitiliigol on tugev assotsiatsioon autoimmuunhaigustega, segmentaalsel vitiliigol see puudub. Segmentaalse vitiliigo tekkimisel oletatakse neurokeemilist mehhanismi: arvatavasti on tegemist sümpaatiliste närvijätkete regulatsiooni häirega (Huggins *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2000).

1.1.2 Vitiliigo võimalikud tekkepõhjused

Vitiliigo tekkepõhjused ei ole senini täiel määral selged. Haiguslaigud tekivad sageli kerge nahatrauma järel (Bahadoran *et al.*, 2003), võimalik on ka nende teke kokkupuutel kemikaalidega nagu katehhoolid ja alküleeritud fenoolid (Boissy ja Manga, 2004) või kaneelaldehüüd (Mathias *et al.*, 1980). Vitiliigole vastuvõtlikkust suurendab psühholoogiline stress, kui see on põhjustatud paljude kontrollimatute sündmuste poolt (Picardi *et al.*, 2003).

Kolm peamist hüpoteesi vitiliigo tekkimise osas on autoimmuunne mehhanism, autotsütotoksiline mehhanism ja melanotsüütide kasvufaktorite puudulikkus (Kovacs, 1998; Moretti *et al.*, 2002; Ongenae *et al.*, 2003). Välja on pakutud ka vitiliigo konvergentsiteooria, mille kohaselt need kolm mehhanismi annavad nii eraldi kui ka koos esinedes ühesuguse tagajärje: melanotsüütide kadumise nahast, ja sõltub

patsiendist, millise mehhanismi osatähtsus on kõige suurem (Le Poole *et al.*, 1993a). Lisaks sellele on olemas melanotsütorraagia teooria, mille kohaselt vitiliigo patogenees saab alguse melanotsüütide ja rakuvälise maatriksi valkude vahelise adhesiooni kadumisest (Gauthier *et al.*, 2003a).

1.1.3 Autoimmuunsus vitiliigopatsientidel

Vitiliigo autoimmuunse tekkehüpooteesi kohaselt saab vitiliigo alguse immuunsüsteemi melanotsüütide vastu suunatud rünnakust, melanotsüütide metaboolsed häired ja apoptoos loetakse selle rünnaku tagajärjeks (Oyarbide-Valencia *et al.*, 2006; Ongenae *et al.*, 2003). Autoimmuunse tekkemehhanismi võimalikkusele viitab hulk erinevaid kliinilisi ja eksperimentaalseid andmeid.

Esiteks on vitiliigo assotsieerunud selliste autoimmuunsete haigustega nagu autoimmuunne türeoidiit, reumatoidartriit, psoriaas, täisealisena alguse saav insuliinist sõltuv diabeet ja Addisoni tõbi (Laberge *et al.*, 2005).

Teiseks kinnituseks autoimmuunsuse osalemise kohta vitiliigo patogeneesis on leiud, mis on seotud antikehadega. Vitiliigopatsientide seerumis on olemas melanotsüütide-spetsiifiliste valkude vastased antikehad ja nende antikehade hulk on korrelatsioonis haiguse aktiivsusega (Harning *et al.*, 1991). Näiteks esineb vitiliigopatsientidel autoantikehi, mis on suunatud peamise pigmenti tootva ensüümi türosinaasi vastu, sellised antikehad puuduvad tervetel kontrollisikutel (Song *et al.*, 1994; Baharav *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1997a). Vähesemal määral on vitiliigopatsientide seerumis ka teiste melanogeneesiga seotud valkude (türosinaasi-taoline valk 1 (TYRP1), dopakroomi tautomeraas (DCT), 100 kDa glükoproteiin (gp100), melaniini kontsentreeriva hormooni retseptor 1 (MCHR1), Y-kromosoomi sugu määrava piirkonna taoline boks 10 (SOX10)) vastaseid antikehi (Kemp *et al.*, 1997b; Okamoto *et al.*, 1998; Kemp *et al.*, 1998b; Kemp *et al.*, 1998a). Oletust autoantikehade vitiliigo patogeneesis osalemise kohta toetab ka see, et vitiliigopatsientide antikehad võivad põhjustada depigmentatsiooni: vitiliigopatsientide seerum avaldab melanotsüütide rakukultuurile lüüsimist, mis tuleneb komplemendi aktivatsioonist ja antikehadest sõltuvast rakulisest tsütotoksilisusest (Norris *et al.*, 1988). Vitiliigo korral esinevad autoantikehad avaldavad melanotsüütidevastast toimet mitte ainult rakukultuuris, vaid ka organismi tasemel: vitiliigopatsientide seerumist puhastatud immunoglobuliin G süstimine hiirtele, kellele

on siirdatud inimese nahatükk, kutsus siirdatud nahas esile depigmentatsiooni (Gilhar *et al.*, 1995).

Kolmandaks asjaoluks, mille põhjal oletatakse vitiliigo autoimmuunset teket, on T-rakkude aktiivsus vitiliigohaigete nahas. Vitiliigopatsientide haiguskollete servades on suurenenud aktiveeritud T-rakkude ja makrofaagide hulk; diferentseerumisklaster 8+ (CD8+) T-rakud on koondunud kaduvate melanotsüütide lähedusse ja ekspresseerivad tsütolüütilisi valke perforiini ja gransüüm B'd (van den Wijngaard *et al.*, 2000a; Sharquie *et al.*, 2004). Vitiliigo haiguskolde servast saadud T-rakukloonid on valdavalt Th-1 tsütokiiniprofiiliga, seega põletikku soodustavad (Le Poole *et al.*, 2004). Tüüp-1 polarisatsiooni ulatus vitiliigohaigete tervest nahast saadud T-rakukloonidel korreleerub mikroskoobis nähtud melanotsüütide destruktsiooni ulatusega kahjustatud nahapiirkonnas; haiguskolde servast on leitud melanotsüütide suhtes tsütotoksilisi CD8+ T-rakke (Wankowicz-Kalinska *et al.*, 2003).

Autoimmuunse vitiliigo tekkemehhanismi võimalikkusele viitab ka melanotsüütide kõrge immunogeensus: melanoomipatsientidel on täheldatud, et mitmed melanosoomivalgud (nagu näiteks türosinaas, T-rakkude poolt ära tuntav melanoomiantigeen 1 (MART1) ja gp100) on rakulise immuunvastuse sihtmärkideks (Sakai *et al.*, 1997). Melanotsüütide immunogeensust võib seostada ka nende võimega toota nii tüüp-1 kui ka tüüp-2 tsütokiine (Kruger-Krasagakes *et al.*, 1995). Samuti aitab immunogeensusele kaasa vitiliigo ja melanoomi korral esinev melanotsüütide võime fagotsüteerida ja presenteerida peamise koesobivuskompleksi II (MHC II) vahendusel antigeene, stimuleerides nii viisi T-rakke (Le Poole *et al.*, 1993c; Le Poole *et al.*, 1993b; Overwijk ja Restifo, 2000).

Immuunsüsteemi osalusele vitiliigo patogeneesis viitab ka see, et vitiliigo ravis on osutunud efektiivseks immunosupressandid (Njoo *et al.*, 1998; Lepe *et al.*, 2003; Parsad *et al.*, 1998).

1.1.4 Autotsütotoksilisus vitiliigopatsientidel

Autotsütotoksilise vitiliigo tekkehüpooteesi kohaselt saab vitiliigo alguse metaboolsest väär-regulatsioonist ja autoimmuunsus on sellega sekundaarselt kaasnev nähtus (Dell'anna ja Picardo, 2006; Agrawal *et al.*, 2004).

Ühe võimalusena on oletatud, et vitiliigo korral on esmaseks patogeenseks sündmuseks vabadest radikaalidest põhjustatud kahjustus (Koca *et al.*, 2004). Seda hüpooteesi toetab asjaolu, et vitiliigokolde servast eraldatud melanotsüüdid on

oksüdatiivse stressi suhtes tundlikumad kui normaalsed melanotsüüdid (Jimbow *et al.*, 2001). Vitiliigo korral on mitmesuguste pro-oksüdantide tasemed kõrgenenud ja paljude antioksüdantide tasemed alanenud: vitiliigopatsientidel toimub H₂O₂ akumulatsioon nahas (Schallreuter *et al.*, 1999b), langenu on superoksiidi dismutaasi ja ksantiini oksüdaasi tase vitiliigopatsientide seerumis (Koca *et al.*, 2004) ja katalaasi tase vitiliigohaigete normaalselt pigmenteerunud nahas (Maresca *et al.*, 1997). Oksüdatiivne stress võib takistada melanogeneesi, kuna kõrge H₂O₂ tase põhjustab lisaks muudele rakukahjustustele türosinaasi inhibitsiooni türosinaasi positiivsete regulaatorite pärssimise tõttu (Jimenez-Cervantes *et al.*, 2001). Muuhulgas oksüdeerib H₂O₂ melanogeneesi reguleerivaid POMC peptiide, muutes nad mittefunktsionaalseteks (Spencer *et al.*, 2007).

Võimalikuks patogeneesi alguspunktiks loetakse ka häiret katehhoolide biosünteesis, kuna vitiliigopatsientidel on kõrgenenud katehhoolamiinide ja nende metaboliitide plasma- ja uriinitase (Cucchi *et al.*, 2000; Morrone *et al.*, 1992; Cucchi *et al.*, 2003). Kõrgenenud katehhoolamiinide tase melanotsüütide ümbruses võib põhjustada melanotsüütide hävimist kahel viisil: esiteks katehhoolamiinide otsene tsütotoksilisus: näiteks dopamiini kõrge kontsentratsioon kutsub oksüdatiivse stressi tekitamise tõttu esile melanotsüütide apoptoosi (Stokes *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 2006). Teiseks võimalikuks kahjustuste tekitamise viisiks on põletiku teke nahas, kuna katehhoolamiinid mõjutavad nahas paiknevate dendriitrakkude aktivatsiooni regulatsiooni (Seiffert ja Granstein, 2006). Katehhoolamiinide kõrgenenud kontsentratsioon melanotsüütide ümbruses võib tekkida katehhoolamiine vabastavate autonoomsete närvide häire tõttu (Wu *et al.*, 2000). Sellise mehhanismi osalust oletatakse segmentaalse vitiliigo patogeneesis, kuna segmentaalse vitiliigo patsientidel toimub haiguskoldes kolmekordne verevoolu suurenemine ja tõus α - ja β -adrenergilises signaaliüleandes (Wu *et al.*, 2000). Teiseks viisiks, mismoodi katehhoolamiinide kontsentratsioon tõusta võib, on türosinaasi inhibitsioon, mis põhjustab melanotsüütides dopamiini sünteesitaseme tõusu (Higashi *et al.*, 2000).

Autotsütotoksilisus vitiliigo korral võib tekkida ka türosinaasi inhibeeriva kofaktori 6-tetrahydrobiopterini (6-BH₄) oksüdeerumisest melanotsüütide destruktsiooni põhjustavaks 6-biopteriniks (Schallreuter *et al.*, 1999b). Kuna vitiliigopatsientide epidermises on kõrgenenud H₂O₂ tase, toodetakse ka 6-biopterini rohkem kui normaalses nahas (Schallreuter *et al.*, 1999b; Schallreuter *et al.*, 2001).

1.1.5 Melanotsüütide kasvufaktorite puudulikkus

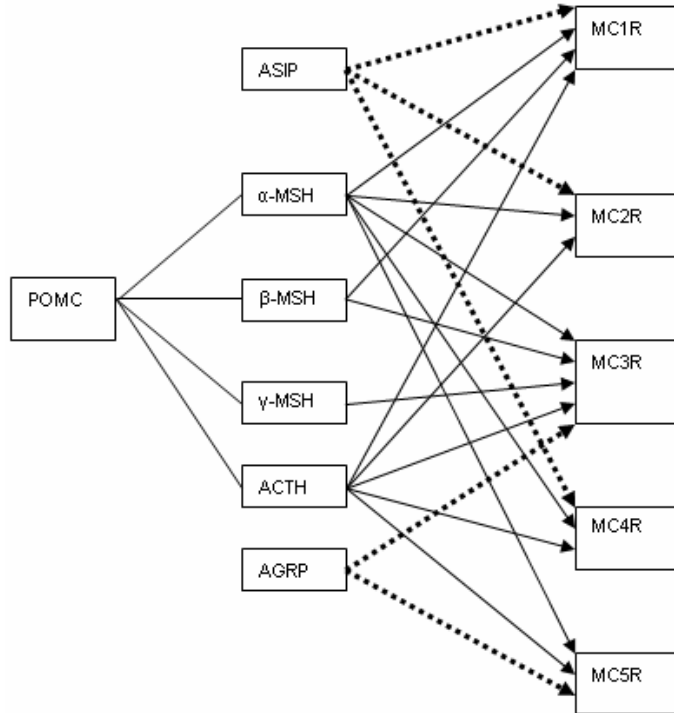
Melanotsüütide kasvufaktorite puudulikkuse hüpoteesi kohaselt saab vitiliigo alguse nahatrauma tagajärjel tekkivast keratinotsüütide defektist või apoptoosist ja edasi toimub melaniini sünteesi peatumine ja melanotsüütide hävimine keratinotsüütide poolt toodetavate faktorite puudumise tõttu (Lee *et al.*, 2005). Seda hüpoteesi toetab asjaolu, et vitiliigohaigete normaalselt pigmenteerunud nahas on osa keratinotsüütidest vigased - toimub vakuoolide degeneratsioon (Moellmann *et al.*, 1982; Bhawan ja Bhutani, 1983). Defektsed on ka vitiliigopatsientide kahjustatud naha keratinotsüüdid: mehhaanilise trauma tagajärjel lähevad vitiliigo haiguskolde keratinotsüüdid võrreldes vitiliigopatsientide normaalselt pigmenteerunud naha keratinotsüütidega kergemini apoptoosi (Lee *et al.*, 2004). Keratinotsüütide defektsus mõjutab kasvufaktorite sünteesi nahas: vitiliigopatsientide haiguskolde on langenud keratinotsüütide poolt toodetavate melanotsüüte stimuleerivate valkude nagu granuloosüütide-makrofaagide kolooniat stimuleeriva faktori (GM-CSF) ja aluselise fibroblasti-kasvufaktori (bFGF) tasemed (Moretti *et al.*, 2002). Tüvirakufaktoril (SCF) on vitiliigo haiguskolde kõrgenenud mRNA ekspressioon (Kitamura *et al.*, 2004), aga alanenud valgutase (Moretti *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). Alanenud on melanotsüütides paikneva SCF'i retseptoriks oleva retseptor-türosiinkinaasi (C-KIT) ekspressioonitase vitiliigo haiguskolde (Kitamura *et al.*, 2004). SCF'i olemasolu on vajalik pigmendi tootmiseks, kuna ilma SCF'ta lähevad melanotsüüdid apoptoosi (Lee *et al.*, 2005).

1.2 Melanokortiini süsteem

1.2.1 Melanokortiini süsteemi üldkirjeldus

Melanokortiini süsteem on väga paljude erinevate geenide ekspressiooni mõjutav regulatoorne üksus. Sellesse kuuluvad viis melanokortiini retseptorit (MC1R-MC5R), nende retseptorite neli agonisti (α -, β - ja γ - melanotsüüte stimuleerivad hormoonid (MSH) ja adrenokortikotroopne hormoon ehk ACTH) ja kaks antagonistit (agouti-taoline valk ehk AGRP ja agouti signaliseerimisvalk ehk ASIP) (Gantz ja Fong, 2003). Melanokortiini süsteemi koostisosad on esitatud joonisel 1. Melanokortiini süsteem täidab erinevates kudedes erinevaid rolle, reguleerides mitmesuguseid füsioloogilisi protsesse, nagu pigmentatsioon, põletik, steroidogenees, energiahomöostaas, eksokriinne sekretsioon, sugufunktsioon, valutundlikkus, kehatemperatuur, südame ja veresoonkonna ning lihaste tegevus (Gantz ja Fong, 2003). Melanotsüütides on

melanokortiini süsteemi peamiseks funktsiooniks melanogeneesi soodustamine melaniini tootmisega seotud ensüümide ekspressioonitasemete ülesreguleerimise teel (Wood *et al.*, 2006). Lisaks sellele pärsib melanokortiini süsteem melanotsüütide poolset proinflammatoorsete tsütokiinide tootmist (Slominski *et al.*, 2000).



Joonis 1: melanokortiini süsteem.

- ▶ retseptori agonist
- ▶ retseptori antagonist
- POMC'i protsessimine

1.2.2 POMC

POMC on prohormoon, mille translatsiooni-järgse protsessimise tulemusel tekivad melanokortiini retseptori agonistid α -, β - ja γ -MSH ja ACTH (Wood *et al.*, 2006). Lisaks nendele on POMC'i protsessinguproduktideks veel ka opioidpeptiid β -endorfiin, peptiidhormoonid kortikotropiinaoline vahepeptiid (CLIP) ning β - ja γ -lipotropiin (Raffin-Sanson *et al.*, 2003). POMC'i ekspressioonitase on kõige kõrgem ajus, aga ekspressioon on olemas ka mitmesugustes perifeersete kudede rakkudes, sealhulgas sekreteerivad POMC'i ka melanotsüüdid ja keratinotsüüdid (Kono *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2007). Vitiliigopatsientide nahas on langenud POMC'i protsessimise tase, kuna alanenud on prohormooni konvertaaside valguekspressiooni tasemed (Graham *et al.*, 1999).

Nii inimesed kui hiired, kes on sündinud defektse POMC geeniga, on ülekaalulised, häiritud pigmentatsiooniga (inimeste puhul on juuksed punased: puudub eumelaniini süntees) ja neerupuudulikkusega (Yaswen *et al.*, 1999; Hinney *et al.*, 1998; Krude *et al.*, 1997).

POMC'i sekretsiooni peamiseks stimulaatoriteks on kortikotropiini vabastav hormoon (CRH) ja vasopressiin; POMC'i ekspressiooni soodustavad ka proinflammatoorsed tsütokiinid ja ultraviolettkiirgus (UV); ekspressiooni suruvad alla glükokortikoidid ja kasvaja-kasvufaktor β (TGF β), mis on rakutsükli regulaator (Slominski *et al.*, 2000).

1.2.3 Melanokortiini retseptorid: MC1R-MC5R

Melanokortiini retseptorid on G-valgu seoselised ja nende kõigi stimuleerimisel toimub adenülaadi tsüklaasi aktivatsiooni kaudu tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) kontsentratsiooni tõus rakus (Gantz ja Fong, 2003). Kõrgenenud cAMP tase melanotsüütides viib mitogeeni poolt aktiveeritavate valgukinaaside (MAP-kinaaside) aktiveerumiseni, mis omakorda tõstab melanogeneesi ensüümide ekspressiooni (Englaro *et al.*, 1995). Lisaks sellele aktiveerivad melanokortiini retseptorid ka muid signaalradu. MC1R'i, MC3R'i, MC4R'i ja MC5R'i stimuleerimine on seotud inositol 1,4,5-trisfosfaadi (IP₃) taseme tõusuga ja sellest tuleneva Ca²⁺ rakusisese kontsentratsiooni suurenemisega (Konda *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997; Mountjoy *et al.*, 2001). Melanokortiini retseptorite toimeks on ka rakuvälise Ca²⁺ raku sisse voolamise suurendamine (Kojima *et al.*, 1985), Jak/STAT (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) raja aktivatsioon (Buggy, 1998) ja PKC (proteiinkinaas C) raja aktivatsioon (Kapas *et al.*, 1995). PKC aktivatsioon on lisaks cAMP taseme tõusule vajalik melanogeneesi käivitamiseks (Slominski *et al.*, 2000).

Melanokortiini retseptoritest enimekspressseeritav on MC1R, mille ekspressioon on kõrgeimal tasemel melanotsüütides (Roberts *et al.*, 2006). Nahas ekspresseeruvad ka MC2R (Slominski *et al.*, 2000), MC4R (Bohm *et al.*, 2006b) ja MC5R (Slominski *et al.*, 2000). MC3R'i mRNA ekspressiooni nahas kirjeldavaid artikleid pole senini ilmunud.

MC1R tundum funktsioon on pigmentatsiooni reguleerimine (eumelaniini sünteesitaset tõstev toime); MC1R'i geen on kõrge polümorfisusega ja selle alleelid on seotud nahavähiriskiga, punaste juustega ja tedretähnidega (Motokawa *et al.*, 2007). Uuritud on ka MC1R'i polümorfismide seost vitiliigoga, leiti mõningate alleelide sagedasem esinemine vitiliigopatsientidel võrreldes tervete kontrollidega, aga

erinevused ei olnud statistiliselt olulised (Na *et al.*, 2003). MC1R on ekspresseeritav ka monotsüütides ja dendriitrakkudes, kus ta α -MSH poolt stimuleerituna avaldab põletikuvastast toimet (Bhardwaj *et al.*, 1996; Bhardwaj *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 1999). Kõige tugevamateks MC1R'i agonistideks on α -MSH ja ACTH, nendest vähesemal määral avaldavad agonistlikku toimet ka β -MSH ja γ -MSH (Gantz ja Fong, 2003).

MC1R'i mRNA ekspressioonitase melanotsüütides sõltub raku väliskeskkonnast: ekspressiooni reguleerivad üles mitmesugused nahastressi korral sekreteeritavad faktorid nagu proinflammatoorsed tsütokiinid, MC1R'i agonistid α -MSH ja ACTH ning kasvufaktorid endoteliin-1 ja bFGF (Slominski *et al.*, 2000). MC1R'i ekspressiooni tõstavad ka melaniini eellasmolekulid L-türosiin ja fosforüleeritud 3,4-dihüdroksü-L-fenüülalaniin (L-DOPA) (Slominski *et al.*, 2000). MC1R'i taset melanotsüütides tõstab ka naissuguhormoon β -östradiol, testosteroon on seevastu ekspressiooni langetava toimega (Scott *et al.*, 2002). Ekspressiooni reguleerib alla ka MC1R'i antagonist ASIP (Rouzaud ja Hearing, 2005). MC1R'i mRNA tase tõuseb adenülaadi tsüklaasi ja PKC stimuleerimise toimet; seega kuna MC1R ise tõstab cAMP ja PKC radade aktiivsust, on MC1R iseene positiivne regulaator (Scott *et al.*, 2002). MC1R'i ja MC2R'i aktivatsiooniks on vajalik rakuvälise Ca^{2+} olemasolu (Eshel ja Salomon, 1994).

MC2R on peamiselt tuntud steroidogeneesi regulaatorina adipotsüütides, aga ekspresseerub ka melanotsüütides; peamiseks MC2R'i agonistiks on ACTH (Slominski *et al.*, 2000). Kuna ACTH omab pigmentatsiooni esilekutsuvat toimet, on ka MC2R pigmentatsiooniregulaatoriks (Hunt *et al.*, 1994b).

MC3R omab peamist funktsiooni energiahomöostaasi regulaatorina, MC3R'i stimuleerimine kesknärvisüsteemis vähendab söögiisu, suunates seega organismi negatiivse energiabalansi poole (Butler, 2006). Kõik melanokortiinid omavad ligikaudu võrdset afiinsust MC3R'i suhtes, sealjuures on see retseptor kõigist melanokortiooni retseptoritest kõige tugevama γ -MSH sidumise võimega (Gantz ja Fong, 2003). MC3R'i stimuleerimine aktiveerib nii cAMP kui ka inositol 1,4,5-trisfosfaat/diatsüülglütserool (IP_3 /DAG) signaalradu, aga cAMP rada on IP_3 /DAG raja suhtes inhibeeriva toimega; seetõttu madala agonisti kontsentratsiooni juures aktiveeruvad mõlemad rajad, kõrge kontsentratsiooni juures ainult cAMP rada (Konda *et al.*, 1994).

MC4R on sarnaselt MC3R'ga kesknärvisüsteemis energiabalansi negatiivne regulaator, sealjuures mõjutab MC4R toidu koguse valikut, aga mitte söömissagedust (Adan *et al.*, 2006). Lisaks sellele reguleerib MC4R tsentraalselt veel ärevust, ravimi- ja

narkootikumisõltuvust, valutundlikkust ja reproduktiivfunktsiooni (Chaki ja Okuyama, 2005). Kõige tugevamateks MC4R'i agonistideks on α -MSH ja ACTH, vähesema afiinsusega toimivad agonistidena ka β - ja γ -MSH (Gantz ja Fong, 2003). Erinevalt MC3R'st käivitab MC4R'i stimuleerimine ka MAPK signaalraja (Daniels *et al.*, 2003). MAP kinaaside aktivatsioon MC4R'i poolt toimub fosfoinositiid-3-kinaasi (PI3K), aga mitte proteiinkinaas A (PKA) vahendusel (Vongs *et al.*, 2004). Nahas avaldab MC4R põletikuvastast toimet, surudes alla rakusisesese adhesioonimolekul-1 (ICAM1) ekspressiooni (Bohm *et al.*, 2005).

MC5R on eksokriinsete näärmete tegevuse regulaator. MC5R-defektsetel hiirtel on nahas langenud rasulipiidide tootmine, samuti häiritud muude välisnõrenäärmete tegevus (Chen *et al.*, 1997). MC5R omab ka põletikuvastast toimet, osaledes regulatoorsete T-rakkude (Treg) indutseerimisel (Taylor *et al.*, 2006). MC5R'i tugevaimaks agonistiks on α -MSH, vähesemal määral avaldavad agonistlikku toimet ka ACTH ja β - ja γ -MSH (Gantz ja Fong, 2003).

1.2.4 Melanokortiini retseptorite agonistid: α -MSH, ACTH

α -MSH on melanokortiini retseptorite agonist, mis nahas on toodetav nii keratinotsüütide kui melanotsüütide poolt (Thody ja Graham, 1998; Slominski *et al.*, 2000). α -MSH ekspressioonitase melanotsüütides on vitiliigo korral langenud (Graham *et al.*, 1999). Lisaks sellele on vitiliigopatsientidel langenud ka α -MSH plasmataseme (Pichler *et al.*, 2006). Melanotsüütides reguleerib α -MSH spetsiifiliselt eumelaniini (musta pigmendi) sünteesi (Thody, 1999). Melanokortiini retseptorite stimuleerimisel α -MSH'ga toimub cAMP signaalraja aktiveerumine (Tsatmali *et al.*, 2000a).

α -MSH omab rolli ka türosinaasi ensümaatilise aktiivsuse regulatsioonis: 6-BH4 on türosinaasi inhibiitor, α -MSH omab võimet seondumise teel 6-BH4 inaktiveerida. (Schallreuter *et al.*, 1999a). Samas inhibeerib α -MSH ise otsese seondumise teel türosinaasi. Seetõttu on türosinaasi valguline aktiivsus soodustatud olukorras, kus α -MSH ja 6-BH4 kontsentratsioonid on 1:1, vastasel juhul on türosinaas inhibeeritud (Schallreuter *et al.*, 1999a).

α -MSH/6-BH4 1:1 kompleks toimib ka antioksidandina, komplekseerumata α -MSH antioksidantsed omadused seevastu on väga nõrgad (Spencer *et al.*, 2007).

Lisaks sellele mõjutab α -MSH melanotsüütide dendriitsust ja rakuväliste maatriksvalkudele kinnitumist (Rouzaud ja Hearing, 2005). α -MSH soodustab melanotsüütide adhesiooni laminiinile ja fibronektiinile ja pärsib kasvaja-nekroosifaktor

α (TNF α) poolt stimuleeritavat ICAM1 ekspressiooni melanotsüütides (Slominski *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 1997). Ka see α -MSH funktsioon võib olla oluline vitiliigo patogeneesis, kuna vitiliigopatsientide kahjustamata nahas on melanotsüütide adhesioon rakuvälistele valkudele häiritud (Gauthier *et al.*, 2003a).

Veel üheks α -MSH funktsiooniks melanotsüütides on lämmastik(II)oksiidi kontsentratsiooni tõstmine (Tsatmali *et al.*, 2000b). Lämmastik(II)oksiid (NO) täidab nahas mitmesuguseid rolle, nagu melanogeneesi algatamine, erüteemi teke, immunosupressioon ja keratinotsüütide kaitsmine UV-kiirguse poolt põhjustatava apoptoosi eest (Cals-Grierson ja Ormerod, 2004)

ACTH on POMC peptiid, mida nahas sekreteerivad nii keratinotsüüdid kui melanotsüüdid (Slominski *et al.*, 2000). Inimese nahas on ACTH melanokortiini retseptori agonistidest kõige kõrgema ekspressiooniga; melanokortiini retseptorite stimuleerimine ACTH'ga viib nii cAMP kui ka IP₃/DAG radade aktivatsioonini (Tsatmali *et al.*, 2000a). Arvestades seda, et ACTH avaldab mõju juba väga madalate kontsentratsioonide juures, on oletatud, et ACTH osalus pigmentatsioonis on füsioloogiliselt olulisem α -MSH omast (Hunt *et al.*, 1994b; Hunt *et al.*, 1994a). Vitiliigopatsientidel on ACTH plasmataase kõrgenenud (Pichler *et al.*, 2006). Juba seitsmekümnendatel aastatel on proovitud vitiliigot ACTH abil ravida, ligikaudu kolmandikul patsientidest kutsus ACTH esile naha repigmenteerumise (Hernandez-Perez, 1979). ACTH abil saab esile kutsuda ka vitiliigohaigete nahast tehtud koekultuuri pigmenteerumist (Iyengar *et al.*, 1995).

1.2.5 Melanokortiini retseptorite antagonistid: ASIP ja AGRP

ASIP on melanokortiini retseptorite antagonist, mis ekspresseerub inimestes kõige kõrgemini rasvkoos (Voisey ja van Daal, 2002), aga on olemas ka nahas (Slominski *et al.*, 2000). ASIP on tugev MC1R, MC2R ja MC4R inhibiitor, aga avaldab võrdlemisi nõrka mõju MC3R ja MC5R'le (Yang *et al.*, 1997). ASIP'i homoloogi Agouti't ektoopilisel ekspresseerivad hiired on kollase karvavärviga ning ülekaalulised, mis viitab MC1R, MC3R ja MC4R pidevale blokaadile (Voisey ja van Daal, 2002). Agouti toimeks on ka intratsellulaarse Ca²⁺ taseme tõstmine (Kim *et al.*, 1997). Kõrgenenud rakusisese Ca²⁺ tase põhjustab ektoopilise Agouti ekspressiooniga hiirtel pankreases insuliini sekretsiooni tõusu ja sellest tulenevat insuliiniresistentsust (Zemel *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 1999).

AGRP on MC3R'i ja MC4R'i pöördagonist, mis esiteks takistab agonistidel nende retseptoritega seondumist, teiseks vähendab nende retseptorite spontaanset (ilma agonisti osaluseta) aktiveerumist (Chen *et al.*, 2006). Lisaks sellele vähendab AGRP MC3R'i ja MC4R'i hulka rakupinnal, kutsudes esile nende endotsütoosi (Breit *et al.*, 2006).

1.3 Signaaliülekanne melanokortiini süsteemilt melanogeneesiensüümideni

1.3.1 Melanokortiini süsteemi ja melanogeneesiensüümide vahelise signaaliülekanne üldkirjeldus

Peamised kolm rada inimese melanotsüütides, mille kaudu signaal jõuab melanokortiini süsteemilt melanogeneesiensüümide TYR'i, TYRP1 ja DCT'ni on cAMP/PKA rada, IP₃/DAG/PKC rada ja lämmastik(II)oksiid/proteiinkinaas G (NO/PKG) rada (Slominski *et al.*, 2004). Lihtsustatud kujul (välja on jäetud radade kõrvalharud ja tagasisidemehhanismid) on need rajad esitatud joonisel 2a. Melanokortiini süsteemi ja melanogeneesiensüümide vahelises signaaliülekanandes osalevate geenide peamised teadaolevad omavahelised regulatsiooniseosed on kujutatud joonisel 2b.

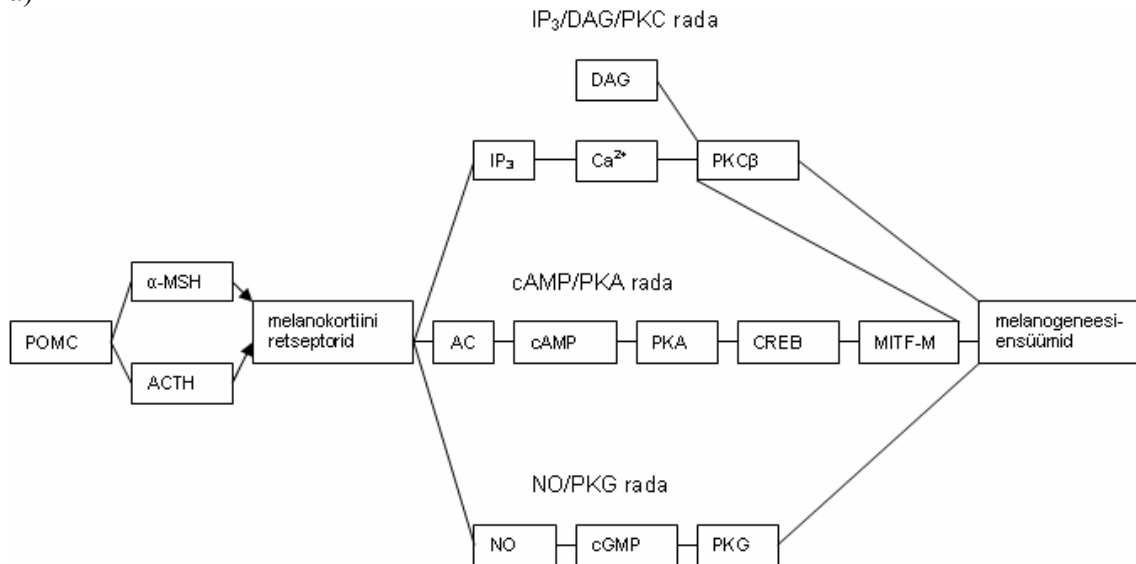
cAMP/PKA: kõige olulisem pigmentatsiooni reguleeriv rada (deOliveira *et al.*, 1996), melanokortiini retseptorid aktiveerivad adenülaadi tsüklaasi, selle tulemusel tõuseb cAMP kontsentratsioon rakus (Gantz ja Fong, 2003). cAMP aktiveerib PKA (Ao *et al.*, 1998). PKA aktiveerib fosforüleerimise teel CREB'i (Sassone-Corsi, 1998). CREB tõstab MITF-M'i ekspressiooni, MITF-M suurendab TYR'i, TYRP1 ja DCT transkriptsiooni (Levy *et al.*, 2006).

IP₃/DAG/PKC: α -MSH põhjustab IP₃ rakusise kontsentratsiooni tõusu (Sukhanov *et al.*, 1991), mille tulemusel tõuseb rakusisene Ca²⁺ kontsentratsioon (Konda *et al.*, 1994; Tsatmali *et al.*, 2000a; Bohm *et al.*, 2005; Tsatmali *et al.*, 1999; Newman *et al.*, 2006). UV-kiirguse toime tõuseb rakusisene DAG'i tase (Punnonen ja Yuspa, 1992), Ca²⁺ koos DAG'ga aktiveerib PKC β , mis aktiveerib fosforüleerimise teel türosinaasi (Park *et al.*, 2004; Gordon ja Gilchrest, 1989).

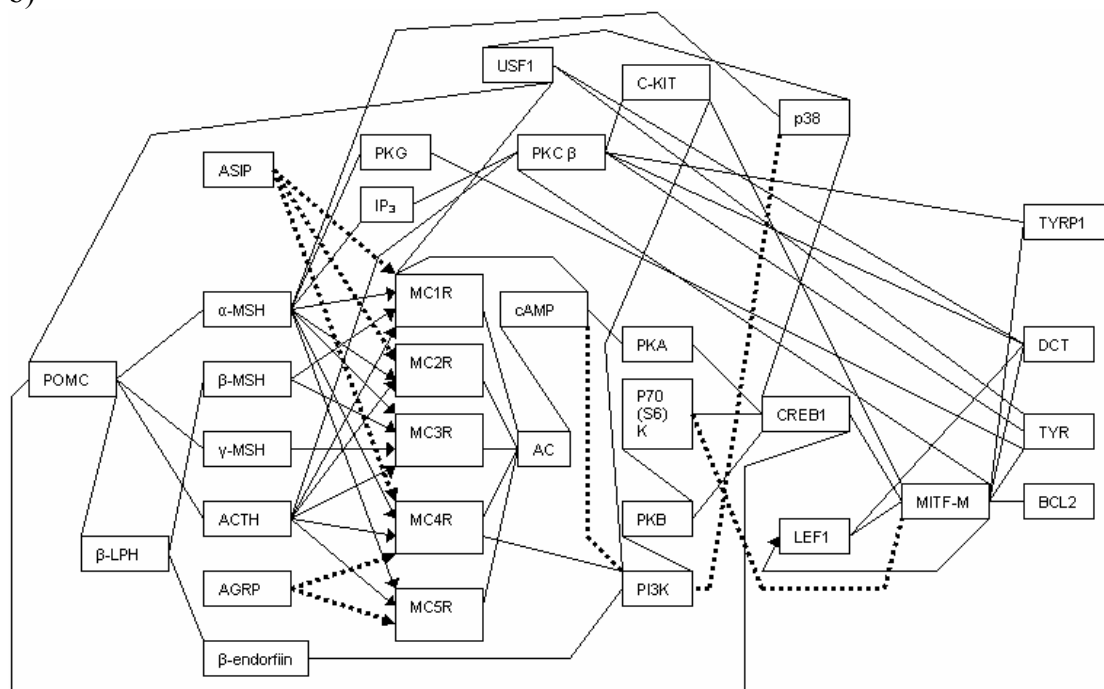
PKC β aktivatsiooniga on seotud ka cAMP rada, kuna MITF-M tõstab oluliselt PKC β ekspressiooni (Park *et al.*, 2006).

NO/PKG: väikestes ja keskmistes kontsentratsioonides α -MSH tõstab melanotsüütides NO taset, kõrged α -MSH kontsentratsioonid seevastu langetavad NO taset (Tsatmali *et al.*, 2000b). NO tõstab tsüklilise guanosiinmonofosfaadi (cGMP) ja PKG vahendusel türosinaasi ekspressioonitaset (Sasaki *et al.*, 2000).

a)



b)



Joonis 2: a) melanokortiini süsteemi ja melanogeneesiensüümide vahelise signaaliülekanne lihtsustatud skeem (välja on jäetud radade kõrvalharud ja tagasisidemehhanismid)

b) melanokortiini süsteemi ja melanogeneesiensüümide vahelises signaaliülekanDES osalevate geenide peamiste teadaolevate omavaheliste regulatsiooniseoste skeem

- retseptori agonist
- retseptori antagonist
- positiivne regulatsioon
- negatiivne regulatsioon

1.3.2 Melanogeneesiensüümid: TYR, TYRP1 ja DCT

Türosinaas (TYR) ehk monofenooli monoooksügenaas (EC 1.14.18.1) on peamine melanogeneesiensüüm, selle mutatsioonid põhjustavad albinismi (Slominski *et al.*, 2004). Türosinaas katalüüsib fenoolide oksüdatsiooni, melanotsüütides katalüüsib ta türosiini oksüdatsiooni dopakinooniks ja 5,6-dihüdrosüindooli oksüdatsiooni eumelaniiniks (Ito, 2003). Vitiliigopatsientide haiguskolde servas on türosinaasi ekspressioonitase langenud ja haiguskolde keskmises ekspressioon puudub (Kitamura *et al.*, 2004). Türosinaasi aktiivsuses vitiliigopatsientide kahjustamata nahast pärit melanotsüütides ja tervete kontrollisikute melanotsüütides olulist erinevust ei ole leitud (Im *et al.*, 1994). Kuigi türosinaas on melaniini sünteesis kiirust limiteeriv ensüüm, ei korreleeru melanotsüütides türosinaasi mRNA tase pigmendi tootmise kiirusega (Naeyaert *et al.*, 1991), seda arvatavasti seetõttu, et melanogeneesiks ei piisa ainult türosinaasi olemasolust, vaid on vaja ka selle aktiveerimist PKC β poolt (Park *et al.*, 1993). Vitiliigopatsientide seerumis esineb türosinaasivastaseid autoantikehi (Voulot ja Ortonne, 1975; Merimsky *et al.*, 1996). Türosinaasi inhibeeriva toimega on ensüüm katehhool-O-metüültransferaas (COMT), mis muudab melaniini eellasmolekulid metüleerimise teel türosinaasile kasutamiskõlbmatuks, vitiliigopatsientide nahas on COMT tase tõusnud (Le Poole *et al.*, 1994).

DCT (TYRP2) ehk dopakroomi tautomeraas (EC 5.3.2.3) on melanogeneesiensüüm, mis katalüüsib dopakroomi tautomerisatsiooni, mille produktiks on peamiselt 5,6-dihüdrosüindool-2-karboksüülhape (DHICA) (Ito, 2003; Slominski *et al.*, 2004). DCT ja TYRP1 on türosinaasi homologid, järjestuste sarnasus türosinaasiga on ligikaudu 40% (del Marmol ja Beermann, 1996). Kuigi DCT on melanotsüüdispetsiifiline ensüüm, on mõnede vitiliigopatsientide haiguskollete keskmises tuvastatud QRT-PCR'i meetodil DCT ekspressioon; sellest on järeldatud, et mingil määral on melanotsüüdid nende patsientide haiguskolletes säilinud (Gottschalk ja Kidson, 2007).

Vitiliigopatsientidel esineb DCT vastaseid autoantikehi (Kemp *et al.*, 2007). Kuna DCT'st pärinevate autoantigeenide vastu suunatud CD8⁺ T-rakud hävitavad spetsiifiliselt melanotsüüte, on oletatud, et vitiliigo patogeneesis olulisel kohal võib olla tsütotoksiliste T-rakkude rünnak põletikukontekstis peamise koesobivuskompleksi I (MHC I) kaudu presenteeritavatel DCT fragmentidel (Steitz *et al.*, 2004).

TYRP1 on melanogeneesiensüüm, mis katalüüsib DHICA oksüdatsiooni eumelaniiniks (Ito, 2003). TYRP1 ekspresseerub ainult eumelaniini tootvates melanotsüütides (del Marmol *et al.*, 1993). Vitiliigopatsientide haiguskolde servast pärit

melanotsüütides on langenud TYRP1 mRNA ekspressioon ja lisaks sellele esinevad häired TYRP1 protsessingus (Jimbow *et al.*, 2001). Sarnaselt TYR'i ja DCT'ga esineb vitiliigohaigetel ka TYRP1 vastu suunatud autoantikehi (Kemp *et al.*, 2007). TYRP1 võib olla vitiliigo tekkega seotud ka seeläbi, et muudab melanotsüüte tundlikuks 4-terbutüülfenooli oksüdatiivset stressi põhjustava toime suhtes (Manga *et al.*, 2006).

Melanotsüütide ja keratinotsüütide segakultuuris toimub kõrge keratinotsüütide tiheduse korral melanotsüütides TYRP1 ekspressiooni alla reguleerimine, millele järgneb melanotsüütide hävimine; selline protsess segab nahasiirdamist vitiliigopatsientidele (Phillips *et al.*, 2001).

1.3.3 Melanogeneesiensüümide transkriptsiooni regulaatorid: MITF-M, LEF1, USF1

MITF-M on üks transkriptsioonifaktori MITF vähemalt seitsmest isovormist; MITF-M'i peamiseks funktsioonideks on melanotsüütide arengu ja pigmentatsiooniaktiivsuse koordineerimine (Saito *et al.*, 2002). Immunohistokeemia teel saadud andmete kohaselt puudub vitiliigohaigete haiguskollete servas MITF-M'i ekspressioon (Kitamura *et al.*, 2004).

MITF-M on nii TYR'i, TYRP1 kui ka DCT ekspressiooni üles reguleeriva toimega (Park ja Gilchrest, 2002). cAMP signaali jõudmine nende ensüümideni käib peamiselt läbi MITF-M'i (Slominski *et al.*, 2004). MITF-M kuulub *basic/helix-loop-helix/leucine zipper* (b-HLH-zip) transkriptsioonifaktorite hulka ja seondub reguleeritavate geenide promootorjärjestustes elementidega, mida nimetatakse M-boksiks ja E-boksiks (Yasumoto *et al.*, 1997). MITF-M on peamine melanotsüütide diferentseerumist kontrolliv geen, selle kunstlikult fibroblastides ekspresseerimine muudab fibroblastid melanotsüütide sarnasteks (Tachibana *et al.*, 1996). MITF-M'i mutatsioonid põhjustavad inimestel tüüp 2 Waardenburgi sündroomi, mille puhul esinevad hüpopigmentatsioon ja kurtus, kuna melanotsüüdid on hävinud nii nahast kui ka sisekõrvast (Saito *et al.*, 2003). Hiirtel põhjustavad MITF-M'i null-alleelid neuraalharjast pärinevate melanotsüütide kadumist, kurtust ja silmade pigment-epiteeli väärarengut (Goding, 2000).

Lisaks muudele funktsioonidele on MITF-M melanotsüütides ka apoptoosiregulaator, mis võib avaldada nii apoptoosi soodustavat kui ka pärssivat toimet. MITF-M'i C-terminuse lõikamisel kaspasid poolt tekib peptiid, mis on proapoptootilise toimega (Larribere *et al.*, 2005), samas reguleerib lõikamata MITF-M üles antiapoptootilise faktori B-raku lümfoom 2 (BCL2) transkriptsiooni (McGill *et al.*, 2002).

MITF-M'i ekspressioon on sõltuv keratinotsüütide poolt sekreteeritava kasvufaktori SCF olemasolust: SCF'i retseptor C-KIT aktiveerib MITF'i, aktivatsiooni vahendab rakuvälise signaali poolt reguleeritav kinaas-2 (ERK2) (Hemesath *et al.*, 1998).

H₂O₂ omab MITF-M'i ekspressiooni alla reguleerivat toimet, see võib olla vajalik selleks, et vältida liigset melanogeneesi reaktsioonidest tulenevat H₂O₂ teket (Jimenez-Cervantes *et al.*, 2001).

LEF1 (lümfoidi soodustava elemendiga seonduv faktor 1) on transkriptsioonifaktor, mis osaleb Wnt signaalrajas (Eastman ja Grosschedl, 1999). Wnt signaalrada kontrollib rakkude diferentseerumist, migratsiooni ja paljunemist; melanotsüütidel selles rajas esinevad häired võivad põhjustada melanoomi (Larue ja Delmas, 2006). Melanotsüütides toimib LEF1 pigmentatsiooniregulaatorina, kontrollides MITF-M'i ekspressiooni kahel viisil: esiteks on LEF1 aktivaatoriks MITF-M'i geeni transkriptsioonile, teiseks suudab MITF-M LEF1'ga komplekseerununa iseenda geeni promootorit aktiveerida (Saito *et al.*, 2002). MITF-M'i ja LEF1 interakteerumine toimub ka DCT ekspressioonitaseme reguleerimisel (Yasumoto *et al.*, 2002).

USF1 (ülesvoolu transkriptsioonifaktor 1) on transkriptsioonifaktor, mis kuulub sarnaselt MITF-M'ga b-HLH-zip perekonda; USF-transkriptsioonifaktorid on eukarüootides väga laialdaselt ekspresseeritud ja osalevad mitmesugustes erinevates geeniregulatsiooni radades nagu näiteks stressi- ja immuunvastus, rakutsükkel ning lipiidi- ja sahhariidimetabolism (Corre ja Galibert, 2005). Melanotsüütides on USF1 pigmentatsiooniregulaatoriks: 38 kDa MAP kinaasi (p38) poolt fosforüleerituna seondub USF1 türosinaasi promootoriga ja aktiveerib selle transkriptsiooni (Galibert *et al.*, 2001). USF1 siduv element on olemas ka DCT promootoris (Schwahn *et al.*, 2005). Lisaks sellele toimub pigmentatsiooni reguleerimine USF1 poolt seeläbi, et UV-kiirguse poolt põhjustatava POMC'i ja MC1R'i transkriptsiooni induktsiooni jaoks on vajalik p38 poolt aktiveeritud USF1 seondumine POMC'i ja MC1R'i geenide promootoritele (Corre *et al.*, 2004). Keratinotsüütides reguleerib USF1 raku liikuvust vastusena kasvufaktoritele (Allen *et al.*, 2005).

1.3.4 cAMP signaali MITF-M'le ülekandjad: p38 ja CREB1

p38 (MAPK14) on erinevates rakutüüpides laialt levinud ja mitmesuguseid erinevaid funktsioone täitev regulatoorne kinaas, mille peamiseks rolliks on osaleda rakkude välispinnal olevate retseptorite signaalide ülekandes rakkude sisemusse, valdavalt on need signaalid seotud stressivastusega (Mittelstadt *et al.*, 2005).

Melanotsüütides on p38 aktiveeritav α -MSH vahendusel (Smalley ja Eisen, 2000). p38 avaldab pigmentatsiooni soodustavat toimet, seda esiteks USF1 fosforüleerimise kaudu, teiseks seeläbi, et fosforüleerib CREB'i, mis edasi aktiveerib MITF-M'i promootori (Saha *et al.*, 2006). p38 tõstab ka SCF'i sekreteerimist melanotsüütide poolt (Hue *et al.*, 2005). Lisaks sellele avaldab p38 melanotsüütides rakutsüklit aeglustavat toimet, mis on vajalik melanogeneesi jaoks (Smalley ja Eisen, 2002).

UVB-kiirguse poolt aktiveeritud p38 on nii melanotsüütides kui ka keratinotsüütides apoptoosisignalisaatoriks, kutsudes esile apoptoosifaktori Bax translokatsiooni mitokondritesse ja tsütokroom C vabanemise, mis põhjustab rakusurma (Van Laethem *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003).

T-lümfotsüütides avaldab cAMP poolt aktiveeritud p38 põletikuvastast toimet, kuna aktiveerib fosforüleerimise teel (A/T)GATA(A/G) motiiviga seonduva transkriptsioonifaktor-3 (GATA3), mis viib edasi T-abistajarakk 2 (Th2) tsütokiinide ekspressioonini (Maneechotesuwan *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2000). GATA3 omab olulist funktsiooni ka naha arengu regulatsioonis: hiirtel, kellel on nahas deleteeritud GATA3, muutub pigmentatsioon ebaregulaarseks ja tekivad häired membraanilipiidide sünteesis (de Guzman Strong *et al.*, 2006; Kurek *et al.*, 2007).

CREB1 (tsüklilise adenosiinmonofosfaadi vastuselemendiga seonduv valk 1) on transkriptsioonifaktor, mis seondub DNA's spetsiifilistele järjestustele, mille nimeks on tsüklilise adenosiinmonofosfaadi vastuselement (*cAMP response element*) (Carlezon *et al.*, 2005). Enimuuritud on CREB1 funktsioon ajus, kus ta osaleb pikaajalise mälu tekkes, lisaks sellele reguleerib CREB1 rakkude proliferatsiooni, eluspüsimist ja sahariidiainevahetust (Conkright ja Montminy, 2005; Carlezon *et al.*, 2005).

Melanotsüütides on CREB1 pigmentatsiooniregulaatoriks, kuna cAMP poolt aktiveeritud PKA fosforüleerib CREB1 (Sassone-Corsi, 1998) ja fosforüleeritud CREB1 tõstab MITF-M'i transkriptsioonitaset (Levy *et al.*, 2006). CREB1 on fosforüleerimise teel aktiveeritav lisaks PKA'le ka proteiinkinaas B (PKB) poolt (Kato *et al.*, 2007). Samuti on CREB1 valk-valk interaktsiooni kaudu aktiveeritav GATA3 poolt (Hong *et al.*, 2006).

CREB1 stimuleerib CRH vahendusel POMC'i ekspressiooni, mistõttu moodustub positiivse tagasiside ring melanokortiini süsteemi ja PKA raja vahel (Zbytek *et al.*, 2006).

1.3.5 p38 ja CREB1 aktiivsuste regulaatorid: PI3K ja p70(S6)K

PI3K on perekond ensüüme, mis fosforüleerivad fosfatidüülinoositolüül inositoltsükli kolmandas positsioonis olevat hüdroksüülrühma (Wymann ja Pirola, 1998). PI3K funktsioonid on mitmekesised, nende hulka kuuluvad rakkude kasvu, rakutsükli, diferentseerumise, liikuvuse ja apoptoosi regulatsioon (Wymann ja Pirola, 1998; Garcia *et al.*, 2006).

cAMP avaldab fosfoinositiid-3-kinaas/70 kDa ribosomaalse valgu S6 kinaas (PI3K/p70(S6)K) rajale inhibeerivat toimet (Busca *et al.*, 1996). c-KIT on seevastu PI3K ekspressiooni tõstva toimega (Blume-Jensen *et al.*, 2000).

PI3K aktiveerib PKB (Franke *et al.*, 1997), PKB omakorda aktiveerib p70(S6)K (Kohn *et al.*, 1998). PI3K kaudu PKB ja p70(S6)K ülesregulatsioon toimub rakustressi, muuhulgas UV-kiirguse toimetel, tegemist on kaitsemehhanismiga, kus rakud aktiveeruvad rakusurma vältimiseks (Martelli *et al.*, 2006).

PI3K võib sõltuvalt kasvufaktorite kontsentratsioonist aktiveerida nii melanogeneesi soodustavaid kui ka pärssivaid radu. Melanotsüütide rakukultuuris on leitud PI3K toimimine melanogeneesiensüümide negatiivse regulaatorina: PI3K inhibiitorid tõstsid melanogeneesi intensiivsust, reguleerides üles MITF-M'i ekspressiooni (Khaled *et al.*, 2003; Oka *et al.*, 2000). PI3K melanogeneesi pidurdav toime tuleb arvatavasti põhiliselt sellest, et PI3K inhibeerib melanotsüütides p38 aktivatsiooni (Saha *et al.*, 2006). Samas võib PI3K kasvufaktorite olemasolu korral suurendada p90RSK (90 kDa ribosomaalse valgu S6 kinaas), p70(S6)K ja PKB vahendusel CREB1 fosforüleerimist, toimides seega melanogeneesi soodustavalt (Bohm *et al.*, 1995). Lisaks sellele, kuna PKB on seotud NO sünteesitaseme tõstmisega (Fulton *et al.*, 1999), võib PI3K kaudselt melanogeneesi aktiivsust üles reguleerida ka NO/PKG raja kaudu.

PI3K avaldab antiapoptootilist toimet PKB vahendusel: esiteks seeläbi, et PI3K poolt aktiveeritud PKB inaktiveerib proapoptootilise faktori nimega Bad (Thompson ja Thompson, 2004). Teiseks inaktiveerib PKB rühma apoptoosi soodustavaid valke, mida nimetatakse kahvlipäa boksi geeni grupp O (FOXO) faktoriteks (Greer ja Brunet, 2005). Kolmandaks pidurdab PKB ka TRAIL (kasvaja nekroosifaktoriga seotud apoptoosi esile kutsuv ligand) nimelise faktori poolt esile kutsutavat apoptoosi ja sealjuures ei ole TRAIL poolt põhjustatav rakusurm ära hoitav BCL2 poolt (Bortol *et al.*, 2003), seega madal PI3K tase võib viia rakkude hävinemiseni hoolimata kõrge BCL2 tasemest.

p70(S6)K (kodeeritav **RPS6KB1** nimelise geeni poolt) on kinaas, mis on aktiveeritav mitmesuguste mitogeenide, kasvufaktorite ja hormoonide poolt; osaleb translatsiooni regulatsioonis, immuunvastuses, vigastatud kudede parandamises ja rakkude liikumises (Berven ja Crouch, 2000). p70(S6)K on ka oluline rakutsükli regulaator: ribosomaalse valgu S6 fosforüleerimisel p70(S6)K poolt lähevad rakud G1-faasist sünteesifaasi (Lane *et al.*, 1993).

Sarnaselt PI3K'ga on ka p70(S6)K toime melanogeneesile ambivalentne: hiiremelanotsüütides on leitud, et p70(S6)K inhibeerimine tõstab melanogeneesiensüümide ekspressioonitasemeid (Busca *et al.*, 1996; Ohguchi *et al.*, 2005). Samas avaldab p70(S6)K kasvufaktorite olemasolu korral teist rada pidi ka pigmentatsiooni soodustavat toimet, fosforüleerides CREB1 (Bohm *et al.*, 1995). Lisaks sellele on keratinotsüütide kasvufaktori poolt aktiveeritud p70(S6)K olemasolu vajalik PKB aktivatsiooniks (Pan *et al.*, 2004).

1.3.6 Antiapoptootiline faktor BCL2

BCL2 on antiapoptootiline ja antiproliferatiivne valk, mis soodustab rakkude püsimist G0 faasis (Zinkel *et al.*, 2006). MITF-M omab BCL2 ekspressiooni ülesreguleerivat toimet, MITF-M'i deleteerimine melanotsüütides põhjustab nende rakkude ulatuslikku apoptoosi (McGill *et al.*, 2002). Vitiliigopatsientide kahjustatud naha värvimisel BCL2 vastaste antikehadega on saadud tulemuseks, et patsientide kahjustatud nahas BCL2 ekspressioon puudub (Plettenberg *et al.*, 1995). Samas ei tuvastatud voolutsütomeetria meetodil tehtud uuringus vitiliigohaigete normaalselt pigmenteerunud nahast pärit melanotsüütide ja tervete kontrollisikute nahast pärit melanotsüütide vahel olulist erinevust BCL2 ekspressioonis (van den Wijngaard *et al.*, 2000b).

2 Töö eesmärgid

Eesmärgiks oli selgitada melanokortiini süsteemi geenide ja signaaliülekanedes melanokortiini süsteemilt pigmentatsiooniensüümidele osalevate geenide funktsionaalset tähtsust vitiliigo patogeneesis. Selleks otsustati QRT-PCR'i meetodit kasutades võrrelda mRNA ekspressioonitasemeid vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata nahas ning tervete kontrollisikute nahas järgmistel geenidel: 8 melanokortiini süsteemi kuuluvat geeni (POMC, ASIP, AGRP, MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R), 8 melanokortiini süsteemilt pigmenti tootvate ensüümideni viivas signaaliülekanedes osalevat geeni (MITF-M, LEF1, USF1, p38, CREB1, PI3K, RPS6KB1, BCL2), 3 pigmentatsiooniensüüme kodeerivat geeni (TYR, TYRP1, DCT).

Ülesandeks seati leida vastused järgmistele küsimustele:

- 1) Kas uuritavate geenide ekspressioonitasemed on vitiliigopatsientide kahjustatud nahas muutunud võrreldes tervete kontrollisikute nahaga?
- 2) Kas uuritavate geenide ekspressioonitasemed on vitiliigopatsientide kahjustamata nahas muutunud võrreldes tervete kontrollisikute nahaga?
- 3) Kas uuritavate geenide ekspressioonitasemetes on erinevused vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata naha vahel?
- 4) Kui on olemas erinevused uuritavate geenide ekspressioonitasemetes vitiliigopatsientide nahas võrreldes tervete kontrollisikute nahaga või erinevused vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata naha vahel, siis missuguseid üldistusi uuritud geenide ekspressioonitasemetes vitiliigo korral toimuvate muutuste kohta on võimalik teha?
- 5) Missugused uuritavate geenide ekspressioonitasemete omavahelised interaktsioonid ilmevad ekspressiooniandmete korrelatsioonianalüüsil?

3 Materjalid ja meetodid

3.1.1 Nahaproovid

Töös kasutati Tartu Ülikooli Kliinikumi dermatoloogiaosakonnast pärinevaid nahabioptaate (\varnothing 4 mm) vitiliigopatsientidelt ja tervetelt kontrollisikutelt. Igalt vitiliigopatsiendilt oli võetud kaks bioptaati: üks haiguskolde keskosast, teine päikesele eksponeerimata tervest nahast (alakõhult). Kontrollisikutelt oli võetud üks bioptaat päikesele eksponeerimata alakõhult. Nahaproovid olid proovi võtmise järel koheselt külmutatud vedela lämmastikuga ja neid hoiti edasise kasutamiseni -80°C juures.

3.1.2 Patsientide ja kontrollisikute karakteristikud

Kõik patsiendid ja kontrollisikud olid valgesse rassi kuuluvad Eestis elavad inimesed. Uuringus kasutati omavahel mitte suguluses olevaid vitiliigopatsiente Tartu Ülikooli Kliinikumi dermatoloogiaosakonnast. Kõik uuritud isikud olid II või III fototüübiga (Fitzpatrick *et al.*, 1967). Ükski uuringus osalenud patsient ei olnud saanud vitiliigovastast ravi eelneva 6 kuu jooksul. Vitiliigopatsientidele pandud diagnoos põhines iseloomuliku paiknemisega pigmenteerumata nahapiirkondade olemasolul ja pigmenteerumata naha valgel värvusel Woods'i lambi all.

Kõik patsiendid andsid kirjaliku informeeritud nõusoleku uuringus osalemiseks. Tööprotokollid ja kirjalikud nõusolekuvormid kiideti heaks Tartu Ülikooli Eetikakomisjoni poolt. Kontrollisikuteks olid tervisehoolekandetöötajad, meditsiiniüliõpilased ja nahahaiguste kliiniku ambulatoorsesse osakonda pöördunud isikudnäo teleangiektiaksi või healoomuliste nahanäsadega.

Melanokortiini süsteemi uuringus (POMC'i, ASIP'i, AGRP, MC1R-MC5R, TYR'i, TYRP1 ja DCT ekspressioonitasemete määramine) kasutati 31 vitiliigopatsiendi nahaproove. Pigmentatsiooniensüümide signaalraja uuringus (MITF-M'i, p38, PI3K, P70(S6)K, CREB1, BCL2, LEF1 ja USF1 ekspressioonitasemete määramine) kasutati lisaks melanokortiini süsteemi uuringus kasutatud patsientide nahaproovidele veel 8 patsiendi nahaproove, nii et kokku oli patsiente 39.

Melanokortiini süsteemi uuringus kasutati 24 kontrollisiku nahaproove. Pigmentatsiooniensüümide signaalraja uuringus kasutati MITF-M'i, p38, PI3K ja P70(S6)K ekspressioonitasemete määramisel nahaproove 31 kontrollisikult, kellest 19 osalesid ka melanokortiini süsteemi uuringus. CREB1, BCL2, LEF1 ja USF1 ekspressioonitasemete määramiseks kasutati nahaproove 18 kontrollisikult, kellel kõigil

olid määratud MITF-M'i, p38, PI3K ja P70(S6)K ekspresioonitasemed ja kellest 6 osalesid ka melanokortiini süsteemi uuringus.

Melanokortiini süsteemi uuringus osalenud patsientide ja kontrollisikute üldandmed on esitatud tabelis 1. Pigmentatsiooniensüümide signaalraja uuringus osalenud patsientide ja kontrollisikute üldandmed on esitatud tabelis 2.

Depigmentatsiooni ulatuse ja paigutuse põhjal määrati patsientidel vitiliigo alatüübid. Koldeliseks loeti vitiliigo, mis oli lokaliseerunud ja mittedermatoomse paiknemisega. Segmentaalseks loeti vitiliigo, mis paiknes dermatoomselt ja asümmeetriliselt. Generaliseerunuks loeti vitiliigo, mille haiguslaigud olid sümmeetriliselt mõlemal kehapoolel torsol, näos, kaelal, kätel või jalgadel. Universaalseks loeti vitiliigo, mille puhul depigmenteerunud oli kogu keha. Uuringus osalenud patsientide jaotumine vitiliigo alatüüpide järgi on esitatud tabelis 3.

Vitiliigo aktiivsus määrati aja järgi, millal viimati oli toimunud uute depigmenteerunud alade teke või olemasolevate alade laienemine. Patsiendid jagati kahte gruppi: aktiivses faasis vitiliigoga patsiendid (kellel uute haiguskollete teket või depigmentatsiooni laienemist oli täheldatud viimase 3 kuu jooksul) ja stabiilses faasis vitiliigoga patsiendid (kellel viimase 3 kuu jooksul ei olnud toimunud uute haiguslaikude teket ega vanade laikude laienemist). Uuringus osalenud patsientide vitiliigoga seotud karakteristikud (haiguse aktiivsus ja kestus, vanus haigestumisel ja haiguse esinemine perekonnas) on esitatud tabelis 4.

Tabel 1. Melanokortiini süsteemi uuringus osalenute üldandmed.

	vitiliigopatsiendid , kellel määrati POMC'i, ASIP'i, AGRP, MC1R-MC5R'i, TYR'i, TYRP1 ja DCT ekspresioonitasemed	kontrollisikud , kellel määrati POMC'i, ASIP'i, AGRP, MC1R-MC5R'i, TYR'i, TYRP1, DCT ekspresioonitasemed
isikute koguarv	31	24
sugu (naised/mehed)	22/9	17/7
keskmine vanus aastates (äärmused)	49,2 (22-75)	33,9 (21-67)

Tabel 2. Pigmentatsiooniensüümide signaalraja uuringus osalenute üldandmed.

	vitiliigopatsiendid , kellel määrati MITF-M'i, p38, PI3K, P70(S6)K, CREB1, BCL2, LEF1 ja USF1 ekspressioonitasemed	kontrollisikud , kellel määrati MITF-M'i, p38, PI3K ja P70(S6)K ekspressioonitasemed	kontrollisikud , kellel määrati CREB1, BCL2, LEF1 ja USF1 ekspressioonitasemed
isikute koguarv	39	31	18
sugu (naised/mehed)	26/13	22/9	10/8
keskmine vanus aastates (äärmused)	49,4 (22-77)	38,1 (22-67)	37,6 (22-66)

Tabel 3. Patsientide arvud vitiliigo alatüüpide järgi.

vitiliigo alatüüp	vitiliigopatsiendid melanokortiini süsteemi uuringus (POMC'i, ASIP'i, AGRP, MC1R-MC5R'i, TYR'i, TYRP1 ja DCT tasemete määramine) (koguarv; naiste arv; meeste arv)	vitiliigopatsiendid pigmentatsiooniensüümide signaalraja uuringus (MITF-M'i, p38, PI3K, P70(S6)K, CREB1, BCL2, LEF1 ja USF1 tasemete määramine) (koguarv; naiste arv; meeste arv)
koldeline	4(N)	7; 5(N); 2(M)
segmentaalne	1(N)	1(N)
generaliseerunud	25; 17(N); 8(M)	30; 20(N); 10(M)
universaalne	1(M)	1(M)

Tabel 4. Patsientide vitiliigoga seotud karakteristikud.

	vitiliigopatsiendid melanokortiini süsteemi uuringus (POMC'i, ASIP'i, AGRP, MC1R-MC5R'i, TYR'i, TYRP1 ja DCT tasemete määramine)	vitiliigopatsiendid pigmentatsiooniensüümide signaalraja uuringus (MITF-M'i, p38, PI3K, P70(S6)K, CREB1, BCL2, LEF1 ja USF1 tasemete määramine)
aktiivne vitiliigo (patsientide koguarv; naiste arv; meeste arv)	22; 16(N); 6(M)	26; 18(N); 8(M)

Tabel 4 jätkub:

stabiilne vitiliigo (patsientide kogu arv; naiste arv; meeste arv)	9; 6(N); 3(M)	13; 8(N); 5(M)
keskmine vanus vitiliigosse haigestumisel (aastad)	30,0	30,4
keskmine vitiliigo kestus (aastad)	19,2	19,0
patsientide arv, kellel on perekonnaliikmetel esinenud vitiliigo	5	8

3.1.3 RNA eraldamine nahaproovidest

Totaalne RNA eraldati nahaproovidest, kasutades RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit'i (QIAGEN Sciences, Maryland, USA), järgides tootja poolt kaasa antud protokollit. Koe homogeniseerimiseks kasutati homogenisaatorit Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Saksamaa). RNA kontsentratsiooni määramiseks kasutati NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). RNA lahustati RNAasivabas vees ja hoiti edasise kasutamiseni -80°C juures.

3.1.4 cDNA süntees

Iga RT-PCR'i reaktsiooni jaoks sünteesiti komplementaarne DNA (cDNA) 500 ng totaalsest RNA'st. Pöördtranskriptaasireaktsioonis kasutati SuperScript III pöördtranskriptaasi (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornia, USA) ja polü(tümiin18) oligonukleotiide vastavalt tootja instruktsioonile. Reaktsioonisegused inkubeeriti 65°C juures 5 minutit, 0°C juures 1 minut, 50°C juures 90 minutit, 70°C juures 5 minutit. Edasise kasutamiseni säilitati cDNA'd -80°C juures.

3.1.5 QRT-PCR

Geeniekspressioonitasemed detekteeriti ABI Prism 7900HT Sequence Detection System'i abil (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reaktsioonid toimusid 10 µl mahus neljas korduses.

Kõikide uuritud geenide (välja arvatud POMC) ekspressioonitasemete mõõtmiseks kasutati TaqMan-QRT-PCR meetodit. Sellel meetodil tehtud reaktsioonides kasutati TaqMan Universal PCR Master Mix'i (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Kõikidel geenide, välja arvatud POMC, MC1R ja MC2R, ekspressioonitasemete

määramisel kasutati TaqMan Assay-On-Demand FAM-märgisega MGB (*DNA minor groove binder*) sondiga geeniekspressiooni reaktsioonisegusid (20X, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Kasutatud reaktsioonisegud olid järgmised: Hs00361403_g1 (AGRP), Hs00181770_m1 (ASIP), Hs00252036_s1 (MC3R), Hs00271877_s1 (MC4R), Hs00271882_s1 (MC5R), Hs00167051_m1 (TRP1), Hs00157244_m1 (DCT), Hs00165156_m1 (MITF), Hs00178872_m1 (PIK3CB; fosfoinositiid-3-kinaasi katalüütiline subühik p110β), Hs00177357_m1 (RPS6KB1), Hs00176247_m1 (MAPK14), Hs00231713_m1 (CREB1), Hs00273038_m1 (USF1), Hs00608023_m1 (BCL2), Hs00212390_m1 (LEF1).

MC1R ja MC2R ekspresioonitasemete määramiseks kasutati geenispetsiifilisi praimereid (MC1R: edasisuunas 5'-TGCGGCTGCATCTTCAAG-3', tagasisuunas 5'-TGATGGCATTGCAGATGATGA-3'; MC2R: edasisuunas 5'-CTCGATCCCACACCAGGAA-3', tagasisuunas 5' TGTGATGGCCCCTTTCATGT-3') ja MGB märgisega sondi (MC1R: FAM-TTCAACCTCTTTCTCGCC-NFQ; MC2R: FAM-TCTCCACCCTCCCCAGA-NFQ). HPRT1 (hüpoksantiin-guaaniin fosforibosüül-transferaas-1) ekspresioonitaseme määramiseks kasutati geenispetsiifilisi praimereid (HPRT-1 ekson 6, 5' GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG-3'; HPRT1 ekson 7, 5' -AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG-3'; lõppkontsentratsioonid 300 nM) ja VIC-TAMRA (VIC-6-karboksü-tetrametüül-rodamiin) märgisega sondi (VIC-5'-TTTCACCAGCAAGCTTGCGACCTTGA-3'-TAMRA; lõppkontsentratsioon 200 nM).

POMC'i ekspresioonitaseme mõõtmine toimus qPCR Core Kit for SYBR Green I (Eurogentec, Seraing, Belgia) abil. Kasutati geenispetsiifilisi praimereid (edasisuunas 5'-CTACGGCGGTTTCATGACCT-3', tagasisuunas 5'-CCCTCACTCGCCCTTCTTG-3', lõppkontsentratsioonid 100 nM).

3.1.6 Andmete statistiline analüüs

mRNA kvantifitseerimiseks kasutati võrdleva tsükliläve (Ct) ehk $2^{-\Delta\Delta Ct}$ meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001), sihtmärk-geeni ekspresioonitase normaliseeriti endogeense võrdlusgeeni HPRT1 suhtes. Geenide mRNA ekspresioonitasemeid iseloomustava parameetrina kasutati $2^{-\Delta Ct}$ väärtusi. Geenide ekspresioonitasemete gruppidevahelised erinevused kordades leiti kui võrreldava grupi $2^{-\Delta Ct}$ ja referentsiks valitud grupi $2^{-\Delta Ct}$ suhe, mis on võrdne võrreldava grupi ja referentsgrupi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ väärtusega, kuna $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{[-\Delta Ct(\text{võrreldav grupp}) - \Delta Ct(\text{referentsgrupp})]} = 2^{[-\Delta Ct(\text{võrreldav grupp})] + (\Delta Ct(\text{referentsgrupp}))} = [2^{(-\Delta Ct(\text{võrreldav grupp})}] * [2^{(\Delta Ct(\text{referentsgrupp}))}] = 2^{-\Delta Ct(\text{võrreldav grupp})} * [2^{(\Delta Ct(\text{referentsgrupp}))}]$

$2^{\Delta CT(\text{referentsgrupp})} = [2^{-\Delta CT(\text{võrreldav grupp})}] / [2^{-\Delta CT(\text{referentsgrupp})}]$. Andmete normaaljaotusele vastavust testiti Kolmogorov-Smirnov'i testi abil. Geeniekspressiooni tasemete mõõtmistulemuste jaotus selle meetodi põhjal ei vastanud Gaussi jaotusele. Gruppidevaheliste erinevuste testimiseks kasutati Mann-Whitney U-testi ja Kruskal-Wallis'e testi. Normaaljaotuse testimisel ja gruppidevaheliste erinevuste testimisel kasutati GraphPad Prism 4 tarkvara (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Ühe grupi kahe parameetri vaheliste suhete uurimiseks kasutati korrelatsioonianalüüsi, korrelatsiooni tugevuse hindamiseks kasutati Spearman'i korrelatsiooni meetodit. Spearman'i korrelatsioonide leidmiseks kasutati Statistica 7.0 tarkvara (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Kõigi testide puhul loeti statistiliselt oluliseks p väärtust <0,05.

4 Tulemused

4.1.1 mRNA ekspressiooni detekteerimiseks vajalikud QRT-PCR'i amplifikatsioonitsüklite arvud

Uuritud geenide mRNA ekspressioon ilmnes nii vitiliigopatsientide kui ka tervete kontrollisikute nahas võrdlemisi kõrge arvu (27-36) QRT-PCR'i amplifikatsioonitsüklite juures. Kõrgeima mRNA tasemega oli MC1R, mis amplifitseerus 27 tsükli järel, seevastu MC2R'i, MC3R'i, MC4R'i ja MC5R'i ekspressioonitasemed olid madalad (amplifikatsioon 32-36 tsükli järel; joonis 3). Tabelis 5 on esitatud QRT-PCR'i amplifikatsioonitsüklite arvud, mis olid vajalikud uuritud geenide mRNA detekteerimiseks.

Tabel 5. Uuritud geenide mRNA detekteerimiseks vajalikud QRT-PCR'i amplifikatsioonitsüklite arvud.

Geeni nimi	QRT-PCR'i amplifikatsioonitsüklite arv	Geeni nimi	QRT-PCR'i amplifikatsioonitsüklite arv
AGRP	34-36	p38	27-31
ASIP	34-36	PIK3CB	27-31
CREB1	28-33	POMC	28-32
DCT	28-30	RPS6KB1	31-35
LEF1	30-34	TYR	28-35
MC1R	27	TYRP1	28-30
MC2R-MC5R	32-36	USF1	30-33
MITF-M	31-33		

4.1.2 Geenide ekspressioonierinevused vitiliigopatsientide terve ja haige naha ja tervete kontrollisikute naha vahel

POMC, ASIP, AGRP: ilmnes, et vitiliigopatsientide depigmenteerunud nahas on POMC'i mRNA ekspressioon 1,9 korda madalam kui vitiliigopatsientide kahjustamata nahas ($p < 0,05$; joonis 4a). ASIP'i ja AGRP ekspressioonitasemetes ei olnud uuritavate gruppide vahel statistiliselt olulisi erinevusi.

MC1R-MC5R: statistiliselt olulised erinevused olid MC1R'i ja MC4R'i mRNA ekspressioonis nii vitiliigopatsientide kahjustamata kui ka kahjustatud nahas võrreldes kontrollisikute nahaga. MC1R'i ekspressioonitase oli vitiliigopatsientide kahjustamata nahas 1,6 korda kõrgem ekspressioonist kontrollisikute nahas ($p < 0,01$; joonis 4b).

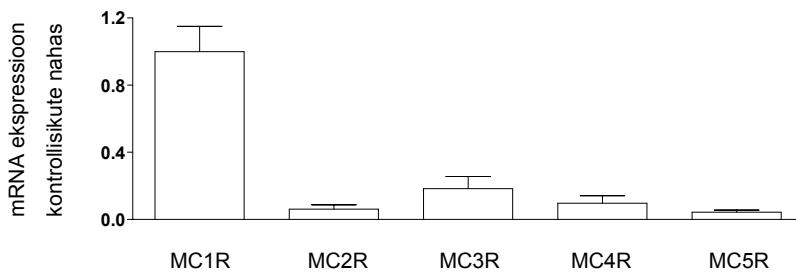
MC4R'i ekspressioon oli vitiliigopatsientide kahjustamata nahas 1,9 korda kõrgenenud võrreldes kontrollisikute nahaga ($p < 0,01$; joonis 4c). Depigmenteerunud nahas oli MC1R'i ekspressioonitase 2,1 korda madalam võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga ($p < 0,0001$; joonis 4b). Sellele sarnaselt oli MC4R'i ekspressioon depigmenteerunud nahas langenud 2,5 korda võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga ($p < 0,01$; joonis 4c). Ülejäänud kolm melanokortiini retseptorit (MC2R, MC3R ja MC5R) olid samuti kõrgenenud mRNA ekspressiooniga vitiliigopatsientide kahjustamata nahas ja langenud ekspressiooniga kahjustatud nahas, aga need erinevused ei olnud statistiliselt olulised.

TYR, TYRP1 ja DCT puhul ilmnes samuti ekspressiooni langus vitiliigopatsientide kahjustatud nahas ja ekspressiooni tõus vitiliigopatsientide kahjustamata nahas võrreldes tervete kontrollisikute nahaga. TYR'i ekspressioonitase vitiliigopatsientide kahjustatud nahas oli 14,0 korda madalam võrreldes kahjustamata nahaga ($p < 0,0001$; joonis 4d) ja 8,5 korda madalam võrreldes tervete kontrollisikute nahaga ($p < 0,0001$; joonis 4d). TYR'i ekspressioonitase oli tõusnud vitiliigopatsientide kahjustamata nahas võrreldes kontrollisikute nahaga, aga erinevus polnud statistiliselt oluline. TYRP1 mRNA ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas oli 6,8 korda madalam ekspressioonist tervete kontrollisikute nahas ($p < 0,0001$; joonis 4e) ja 19,7 korda madalam ekspressioonist vitiliigopatsientide kahjustamata nahas ($p < 0,0001$; joonis 4e). TYRP1 mRNA tase vitiliigopatsientide kahjustamata nahas oli 2,9 korda kõrgem võrreldes tervete kontrollisikute nahaga ($p < 0,05$; joonis 4e). DCT mRNA ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas oli 7,6 korda madalam ekspressioonist tervete kontrollisikute nahas ($p < 0,0001$; joonis 4f) ja 12,9 korda madalam ekspressioonist vitiliigopatsientide terves nahas ($p < 0,0001$; joonis 4f). DCT ekspressioonitasemel vitiliigopatsientide kahjustamata nahas ilmnes kõrgenemistendents võrreldes tervete kontrollisikute nahaga, aga see ei olnud statistiliselt oluline ($p = 0,14$).

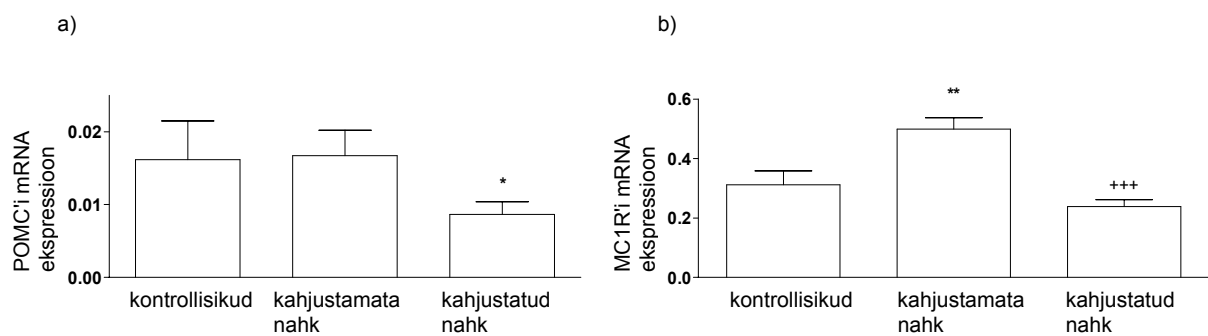
MITF-M, LEF1, USF1: MITF-M'i mRNA ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas oli 3,3 korda madalam kui vitiliigopatsientide kahjustamata nahas ($p < 0,0001$; joonis 4g) ja 2,4 korda madalam kui tervete kontrollisikute nahas ($p = 0,0001$; joonis 4g). LEF1 ekspressioon oli vitiliigopatsientide kahjustamata nahas 1,7 korda kõrgem kui kahjustatud nahas ($p < 0,0005$; joonis 4h). USF1 mRNA ekspressioonitase vitiliigopatsientide terves nahas oli 1,6 korda kõrgem kui tervete kontrollisikute nahas ($p < 0,01$; joonis 4i).

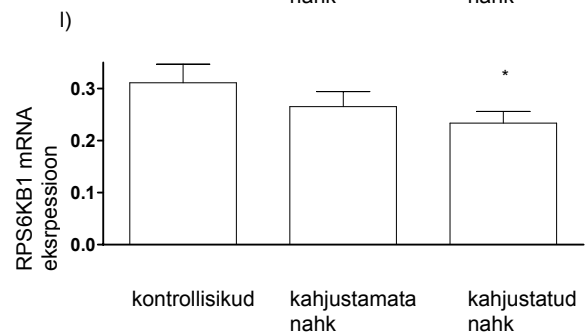
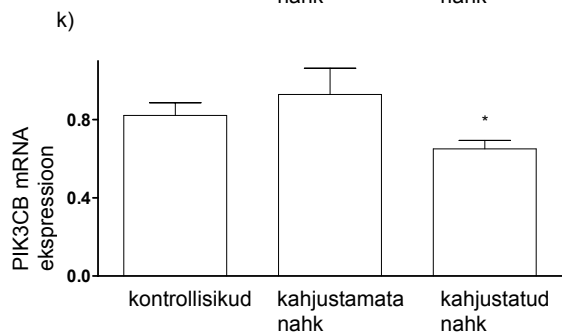
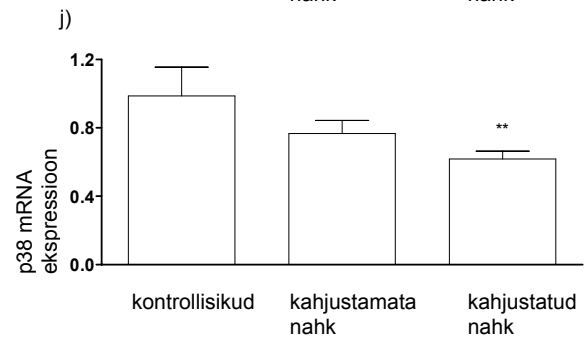
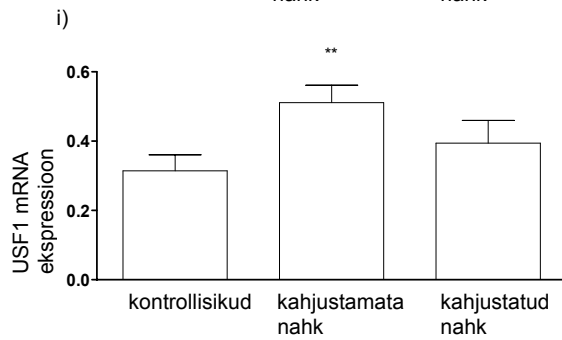
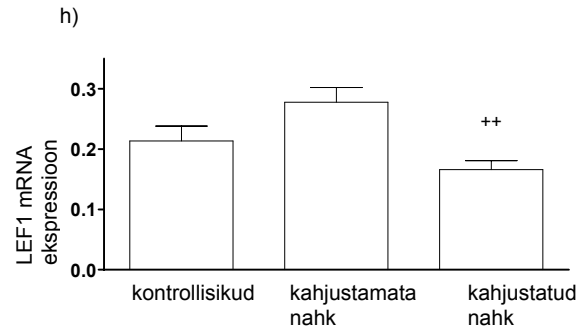
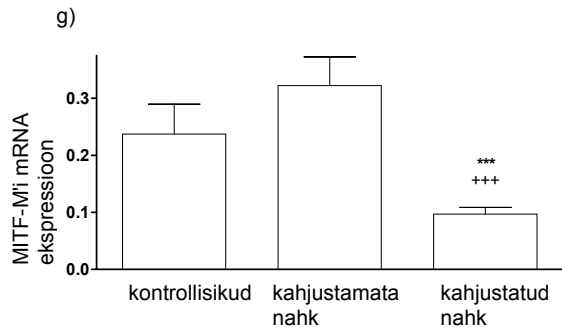
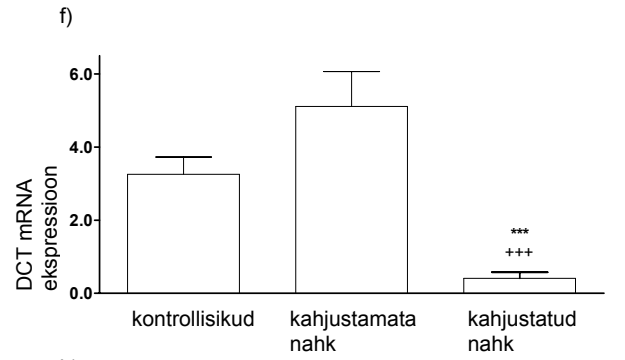
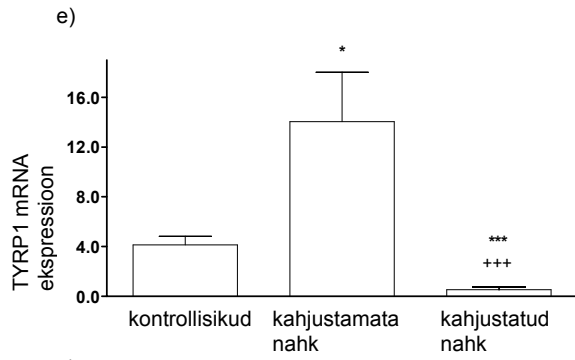
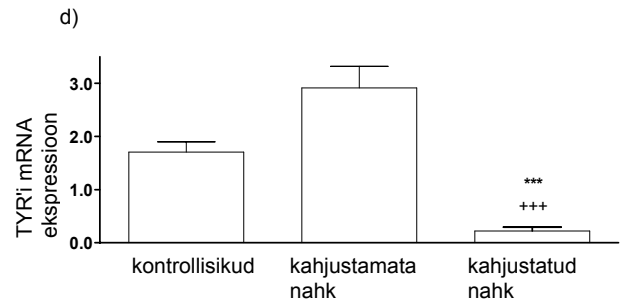
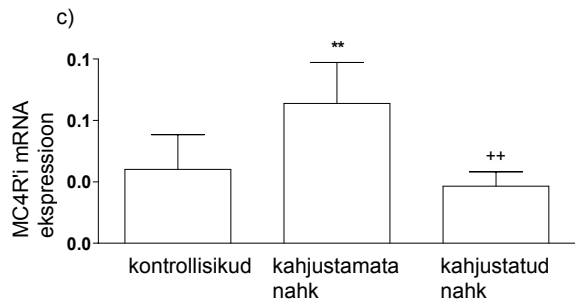
CREB, p38: CREB1 ekspressioonitasemetes ei olnud statistiliselt olulisi erinevusi vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata naha vahel, samuti mitte võrdluses tervete kontrollisikute nahaga. Tendents oli CREB1 kõrgeenenud ekspressiooni suunas vitiliigopatsientide kahjustamata nahas võrreldes kahjustatud naha ja kontrollisikute nahaga. p38 mRNA ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas oli 1,6 korda langenud võrreldes tervete kontrollisikute nahaga ($p < 0,005$; joonis 4j).

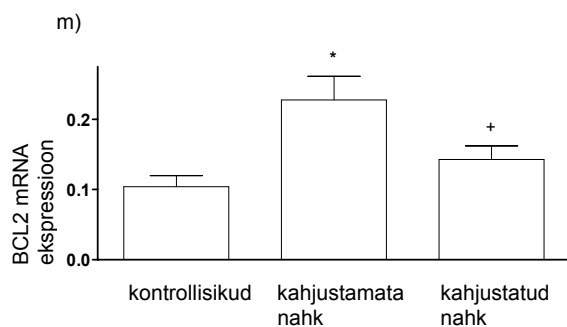
PIK3CB, RPS6KB1, BCL2: PIK3CB mRNA ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas oli 1,3 korda langenud võrreldes tervete kontrollisikute nahaga ($p = 0,01$; joonis 4k). RPS6KB1 mRNA ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas oli 1,3 korda langenud võrreldes tervete kontrollisikute nahaga ($p < 0,05$; joonis 4l). BCL2 mRNA ekspressioonitase vitiliigopatsientide kahjustamata nahas oli 1,6 kõrgem kui kahjustatud nahas ($p < 0,05$; joonis 4m). BCL2 ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustamata nahas oli ka 2,3 kõrgem ekspressioonitasemest tervetel kontrollisikutel ($p < 0,05$; joonis 4m).



Joonis 3: MC1R'i, MC2R'i, MC3R'i, MC4R'i ja MC5R'i mRNA tasemed ($2^{-\Delta Ct}$) MC1R'i mRNA taseme ($2^{-\Delta Ct}$) suhtes tervete kontrollisikute nahas. Tulbad tähistavad keskmist väärtust \pm standardviga (SEM).







Joonis 4: POMC'i, MC1R'i, MC4R'i, TYR'i, TYRP1, DCT, MITF-M'i, LEF1, USF1, p38, PIK3CB, RPS6KB1 ja BCL2 mRNA tasemed ($2^{-\Delta Ct}$) koduhoidja-geeni HPRT mRNA taseme suhtes tervete kontrollisikute nahas, vitiliigopatsientide kahjustamata nahas ja vitiliigopatsientide kahjustatud nahas. Tulbad tähistavad keskmist väärtust \pm standardviga (SEM).

* $p < 0,05$ võrreldes tervete kontrollisikute nahaga; ** $p < 0,01$ võrreldes tervete kontrollisikute nahaga; *** $p < 0,0001$ võrreldes tervete kontrollisikute nahaga; + $p < 0,05$ võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga; ++ $p < 0,01$ võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga; +++ $p < 0,0001$ võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga.

4.1.3 Korrelatsioonianalüüs geenide ekspressioonitasemete omavaheliste võimalike interaktsioonide leidmiseks

Võimalikke interaktsioone uuritud geenide ekspressioonitasemete vahel otsiti Spearmani korrelatsiooni abil. TYR'i, TYRP1 ja DCT mRNA tasemete vahel leiti tugev positiivne korrelatsioon nii vitiliigopatsientide kahjustamata ja kahjustatud nahas kui ka tervete kontrollisikute nahas ($r > 0,70$; $p < 0,0001$). Tervete kontrollisikute nahas oli positiivne korrelatsioon ka MC1R'i ja TYRP1 tasemete vahel ($r = 0,47$; $p < 0,05$). Lisaks sellele olid statistilise olulisusega $p < 0,001$ nii vitiliigopatsientide nahas kui ka kontrollisikute nahas korrelatsioonid MC3R'i ja MC4R'i ($r > 0,79$), p38 ja PI3K ($r > 0,63$), PI3K ja p70(S6)K ($r > 0,55$) ning p38 ja p70(S6)K ($r > 0,69$) ekspressioonitasemete vahel. Nii vitiliigopatsientide nahas kui ka kontrollisikute nahas olid statistiliselt olulised ($p < 0,05$) korrelatsioonid ka MITF'i ja p38 ($r > 0,43$), MITF'i ja PIK3CB ($r > 0,35$) ning MITF'i ja p70(S6)K ($r > 0,51$) mRNA tasemete vahel.

Lisaks nimetatutele leidis veel mitmeid interaktsioone uuritud geenide ekspressioonitasemete vahel. Kõigi uuritud geenide ekspressioonitasemete Spearmani korrelatsioonikoefitsendid on esitatud käesoleva töö lisade osas tabelites 6, 7 ja 8.

5 Arutelu

5.1.1 Melanokortiini süsteemi geenid

QRT-PCR'i meetodil võrreldi vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata nahas ning tervete kontrollisikute nahas ekspresioonitasemeid kaheksal melanokortiini süsteemi geenil: POMC, MC1R-MC5R, ASIP ja AGRP. Statistiliselt olulised erinevused vitiliigopatsientide naha ja tervete kontrollisikute naha vahel olid olemas POMC'i, MC1R'i ja MC4R'i puhul.

POMC'i ekspresioon oli vitiliigopatsientide kahjustatud nahas madalam kui tervete kontrollisikute nahas ($p < 0,05$). Kuna kirjanduse põhjal on varasemast teada, et vitiliigopatsientide nahas on langenud POMC'i protsessimisega seotud ensüümide ekspresioonitasemed (Graham *et al.*, 1999), tähendab see kokkuvõttes, et vitiliigopatsientide kahjustatud nahas on lokaalselt produtseeritava POMC'i toime oluliselt pärsitud.

Kõigi melanokortiini retseptorite ekspresiooniprofilides ilmnisid sarnased tendentsid: võrreldes kontrollisikute nahaga oli ekspresioon langenud vitiliigopatsientide kahjustatud nahas, statistiliselt olulised olid erinevused MC1R'i ($p < 0,0001$) ja MC4R'i ($p < 0,01$) puhul. Kontrollisikute nahaga võrreldes oli kõrgenenud melanokortiini retseptorite ekspresioon patsientide kahjustamata nahas, erinevused olid statistiliselt olulised MC1R'i ($p < 0,01$) ja MC4R'i ($p < 0,01$) puhul.

MC3R'i ekspresiooni nahas pole teadaolevalt varem näidatud. Et välja selgitada, millistes rakutüüpides nahas MC3R ekspresseerub, oleks vaja veel edasisi katseid. MC1R oli nahaproovides tunduvalt kõrgema ekspresiooniga kui ülejäänud neli melanokortiinireseptorit. See viitab arvatavasti sellele, et MC1R'i osatähtsus nahas toimuvate protsesside regulatsioonis on suurem kui teistel melanokortiini retseptoritel.

Korrelatsioonianalüüsist selgusid keskmised kuni tugevad positiivse seosed erinevate melanokortiini retseptorite ekspresioonitasemete vahel; neist tugevaim korrelatsioon oli MC3R'i ja MC4R'i mRNA tasemete vahel ($r > 0,79$; $p < 0,001$). Melanokortiini retseptorite ekspresioonitasemete omavahelist seotust võib ühe võimalusena seletada sellega, et need retseptorid on kõrge homoloogiaga (Getting, 2006). Teiseks võimalikuks põhjuseks on nende retseptorite geenide üksteisega kaasnev ekspresioon, mida on inimese epidermises täheldatud MC1R'i ja MC2R'i (Curry *et al.*,

2001; Moustafa *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 1996) ning MC1R'i ja MC4R'i puhul (Bohm *et al.*, 2006a).

Melanokortiini retseptorite ekspressiooniprofiilid viitavad melanokortiini süsteemi dekompensatsioonile vitiliigopatsientide nahas. Melanokortiini süsteem kaitseb naharakke vitiliigo korral toimuvate kahjustavate protsesside eest vähemasti neljal viisil. Esiteks vähendavad POMC peptiidid pigmentatsiooniensüümide transkriptsioonitasemete ülesreguleerimise teel UV-kiirguse poolt põhjustatavaid naharakkude DNA kahjustusi (Slominski *et al.*, 2004). Teiseks avaldab melanokortiini retseptorite stimuleerimine põletikuvastast toimet (Luger *et al.*, 2003; Wintzen *et al.*, 1996). Vitiliigo puhul on see oluline seetõttu, et vitiliigopatsientide kahjustatud nahas on kõrgenenud proinflammatoorsete tsütokiinide ekspressioonitase võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga (Caixia *et al.*, 1999; Moretti *et al.*, 2002). Kolmandaks teeb melanokortiini süsteem kahjutuks vabu radikaale, seda ennekõike 6-BH4-ga komplekseerunud α -MSH antioksidantse toime tõttu (Spencer *et al.*, 2007), vitiliigo puhul on see oluline, kuna vitiliigopatsientide nahas on kõrgenenud oksüdatiivse stressi tase (Schallreuter *et al.*, 1999b). Neljandaks soodustab melanokortiini süsteem melanotsüütide adhesiooni rakuvälistele maatriksvalkudele (Scott *et al.*, 1997); vitiliigo puhul on melanotsüütide maatriksile seondumine nõrgenenud (Gauthier *et al.*, 2003a), sealjuures melanotsütorragia teooria kohaselt saabki vitiliigo patogenees alguse melanotsüütide adhesiooni kadumisest (Gauthier *et al.*, 2003b). Langenud POMC'i, MC1R'i ja MC4R'i geenide ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas mõjub arvatavasti nõrgestavalt kõigile nendele mehhanismidele, mille kaudu melanokortiini süsteem nahka kaitseb.

Vitiliigopatsientide kahjustamata nahas toimuvale melanokortiini süsteemi ekspressioonitaseme tõusule võib oletatavate põhjustena välja pakkuda kompensatsioonireaktsioone kõigi eespool kirjeldatud melanokortiini süsteemi nahaga seotud funktsioonidega seoses: esiteks negatiivse tagasiside kaudu toimiv vastureaktsioon melanogeneesiensüümide inhibitsioonile; teiseks vastureaktsioon proinflammatoorsete tsütokiinide kõrgele kontsentratsioonile; kolmandaks vastureaktsioon POMC peptiidide hävitamisele H_2O_2 poolt; neljandaks kaitse reaktsioon melanotsüütide adhesiooni kadumise vastu.

5.1.2 Melanogeneesiensüümid

TYR'i, TYRP1 ja DCT ekspressiooniprofiilides olid melanokortiini retseptoritega sarnased suundumused. Nende ensüümide mRNA tase oli langenud vitiliigopatsientide kahjustatud nahas võrreldes nii vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga kui ka tervete kontrollisikute nahaga (statistiliselt olulised erinevused kõigi kolme ensüümi puhul; $p < 0,0001$). Vitiliigopatsientide kahjustamata nahas oli melanogeneesi ensüümide mRNA tase tõusnud võrreldes tervete kontrollisikute nahaga (statistiliselt oluline oli erinevus TYRP1 puhul; $p < 0,05$).

TYR'i ja DCT ekspressiooni langus kahjustatud nahas võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga on kooskõlas nende kahe ensüümi kohta kirjanduse põhjal teada olevate andmetega (Kitamura *et al.*, 2004; Gottschalk ja Kidson, 2007). DCT mRNA ekspressiooni vitiliigopatsientide nahas ja tervete kontrollisikute nahas pole seni teadaolevalt võrreldud. TYRP1 mRNA tasemeid ei ole teadaolevalt võrreldud vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata nahas, aga teada on TYRP1 langenud ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas võrreldes tervete kontrollisikute nahaga (Jimbow *et al.*, 2001).

TYR'i, TYRP1 ja DCT ekspressioonitasemete vahel ilmnisid tugevad positiivsed korrelatsioonid ($p < 0,001$) nii vitiliigopatsientide kui ka kontrollisikute nahas. Nende korrelatsioonide võimalikuks seletuseks on see, et kõigi nende kolme ensüümi ekspressiooni kontrollivad suures osas samad transkriptsioonifaktorid, millest olulisim on MITF-M (Slominski *et al.*, 2004).

5.1.3 Geenid, mis osalevad signaaliülekanDES melanokortiini süsteemilt melanogeneesiensüümidele

Käesolevas töös uuritud melanokortiini süsteemilt pigmentatsiooniensüümideni viivas signaaliülekanDES osalevatest geenidest kõigil peale CREB1 olid olemas statistiliselt olulised erinevused ekspressioonitasemetes vitiliigopatsientide ja kontrollisikute nahaproovide vahel.

Võrreldes kahjustamata nahaga oli patsientide kahjustatud nahas langenud nii MITF-M'i ($p < 0,0001$) kui ka LEF1 ($p < 0,0005$) ekspressioonitasemed. Lisaks sellele oli MITF-M'i ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas madalam võrreldes tervete kontrollisikute nahaga ($p = 0,0001$). Erinevus MITF-M'i ekspressioonis vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata naha vahel on kirjanduse põhjal ka varasemast teada (Kitamura *et al.*, 2004), samas MITF-M'i mRNA tasemeid vitiliigopatsientide ja tervete kontrollisikute vahel varem teadaolevalt võrreldud ei ole.

Nii MITF-M'i kui ka LEF1 puhul esinesid tendentsid kõrgema ekspressiooni suunas vitiliigopatsientide kahjustamata nahas võrreldes kontrollisikute nahaga, aga need ei olnud statistiliselt olulised. Tendentsid MITF-M'i ja LEF1 ekspressiooniprofiilides on sarnased nendega, mis esinevad melanokortiini retseptoritel ja melanogeneesiensüümidel. Üldistavalt võib öelda, et vitiliigopatsientide kahjustatud nahas toimub ka MITF-M'i ja LEF1 ekspressioonitasemete dekompensatsioon.

Kuna statistiliselt olulised positiivsed korrelatsioonid olid olemas MITF-M'i ja TYR'i ($r=0,50$; $p<0,05$), TYRP1 ($r=0,69$; $p<0,01$) ja DCT ($r=0,58$; $p<0,05$) ekspressioonitasemete vahel tervete kontrollisikute nahas, aga mitte vitiliigopatsientide kahjustatud ega ka kahjustamata nahas, võib oletada, et vitiliigo korral on häiritud MITF-M'i melanogeneesiensüümide transkriptsiooni tõstev toime.

p38 (MAPK14) ekspressioonitase oli patsientide kahjustatud nahas langenud võrreldes kontrollisikute nahaga ($p<0,005$). p38 on CREB1 ja USF1 valkude aktiveerija (Saha *et al.*, 2006), mistõttu langenud p38 tase vitiliigohaigete nahas võib vähendada CREB1 ja USF1 pigmentatsiooni üles reguleerivat toimet. Samuti on p38'st sõltuv GATA3 aktiveerimine (Maneechotesuwan *et al.*, 2007). Seetõttu võib oletada, et langenud p38 ekspressioon soodustab defektide teket, mis on seotud GATA3 funktsiooni langusega nahas nagu depigmentatsioon, häired membraanilipiidide biosünteesis ja põletikuprotsesside ülesregulatsioon (Kurek *et al.*, 2007; de Guzman Strong *et al.*, 2006). Statistiliselt oluliste ($p<0,001$) positiivsete korrelatsioonide ilmumine p38 ja PI3KCB ning p38 ja RPS6KB1 ekspressioonitasemete vahel nii tervete kontrollisikute nahas kui ka vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata nahas viitab arvatavasti nende geenide mRNA tasemete regulatsiooni omavahelisele seotusele.

Statistiliselt oluliste positiivsete korrelatsioonide olemasolu p38 ja TYR'i ($r=0,57$; $p<0,05$), TYRP1 ($r=0,76$; $p<0,001$) ning DCT ($r=0,68$; $p<0,01$) mRNA tasemete vahel tervete kontrollisikute nahas ja puudumine vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata nahas võib viidata p38 poolse melanogeneesi positiivse regulatsiooni häirimisele vitiliigo korral.

USF1 ekspressioon oli vitiliigopatsientide kahjustamata nahas kõrgenenud võrreldes kontrollisikute nahaga ($p<0,01$). Selle põhjal, et USF1 on nii MC1R'i kui ka TYR'i ja DCT transkriptsiooni regulaator (Galibert *et al.*, 2001; Schwahn *et al.*, 2005; Corre *et al.*, 2004), võiks kõrgenenud MC1R'i ekspressiooni ja TYR'i ja DCT tendentse ekspressiooni tõusule vitiliigopatsientide kahjustamata nahas pidada seotuks USF1

mRNA taseme tõusuga. Samas aga ei olnud statistiliselt olulisi Spearman'i korrelatsioone USF1 ja MC1R'i, TYR'i ning DCT ekspresioonitasemete vahel.

PIK3CB ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas osutus madalamaks võrreldes kontrollisikute nahaga ($p=0,01$). Langenud PI3K tase patsientide kahjustatud nahas võib põhjustada sealsete rakkude suurenenud vastuvõtlikkust apoptoosile, kuna PI3K on antiapoptootilise toimega (Martelli *et al.*, 2006). Lisaks sellele suurendab langenud PI3K tase arvatavasti vitiliigopatsientide kahjustatud nahas oksüdatiivset stressi, kuna PI3K inhibeerimine põhjustab rakusiseses glutatioonikontsentratsiooni vähenemise (Ramos *et al.*, 2005). Need tulemused sobivad kokku andmetega, mille kohaselt on vitiliigopatsientide nahas võrreldes tervete inimeste nahaga kõrgenenud nii rakkude apoptoosisagedus (Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2002) kui ka oksüdatiivse stressi tase (Koca *et al.*, 2004; Schallreuter *et al.*, 1999b).

Samaselt MITF-M'i ja p38'ga olid PIK3CB ja melanogeneesisüntüümide ekspresioonitasemete vahel positiivsed korrelatsioonid tervete kontrollisikute nahas (TYR: $r=0,52$; $p<0,05$; TYRP1: $r=0,75$; $p<0,001$; DCT: $r=0,58$; $p<0,05$), aga mitte vitiliigopatsientide kahjustatud ega kahjustamata nahas. Selle põhjal võib oletada, et vitiliigohaigete nahas on häiritud rajad, mille kaudu PI3K melanogeneesile soodustavat toimet avaldab.

RPS6KB1 (p70(S6)K) ekspressioon oli vitiliigopatsientide kahjustatud nahas langenud võrreldes ekspresiooniga tervete kontrollisikute nahas ($p<0,05$). Kuna p70(S6)K üheks põhiliseks funktsiooniks on ribosoomides translatsiooni inhibeeriva faktori PDCD4 (*programmed cell death-4*) inaktiveerimine (Dorrello *et al.*, 2006), põhjustab p70(S6)K ekspressiooni langus vitiliigopatsientide nahas arvatavasti valgusünteesi inhibitsiooni, rakkude kasvu vähenemist ja rakutsükli aeglustumist. See sobib kokku andmetega, mille kohaselt vitiliigopatsientide nahast pärit melanotsüütidel on rakukultuuris kasvudefekt (Puri *et al.*, 1989; Puri *et al.*, 1987).

Vitiliigopatsientide kahjustatud nahas esines negatiivne korrelatsioon RPS6KB1 ja TYR'i mRNA tasemete vahel ($r=-0,47$; $p<0,05$). See korrelatsioon on vastavuses kirjanduse põhjal teada olevate andmetega, mille kohaselt p70(S6)K inhibeerimine rapamütsiiniga tõstab türosinaasi ekspressiooni (Busca *et al.*, 1996).

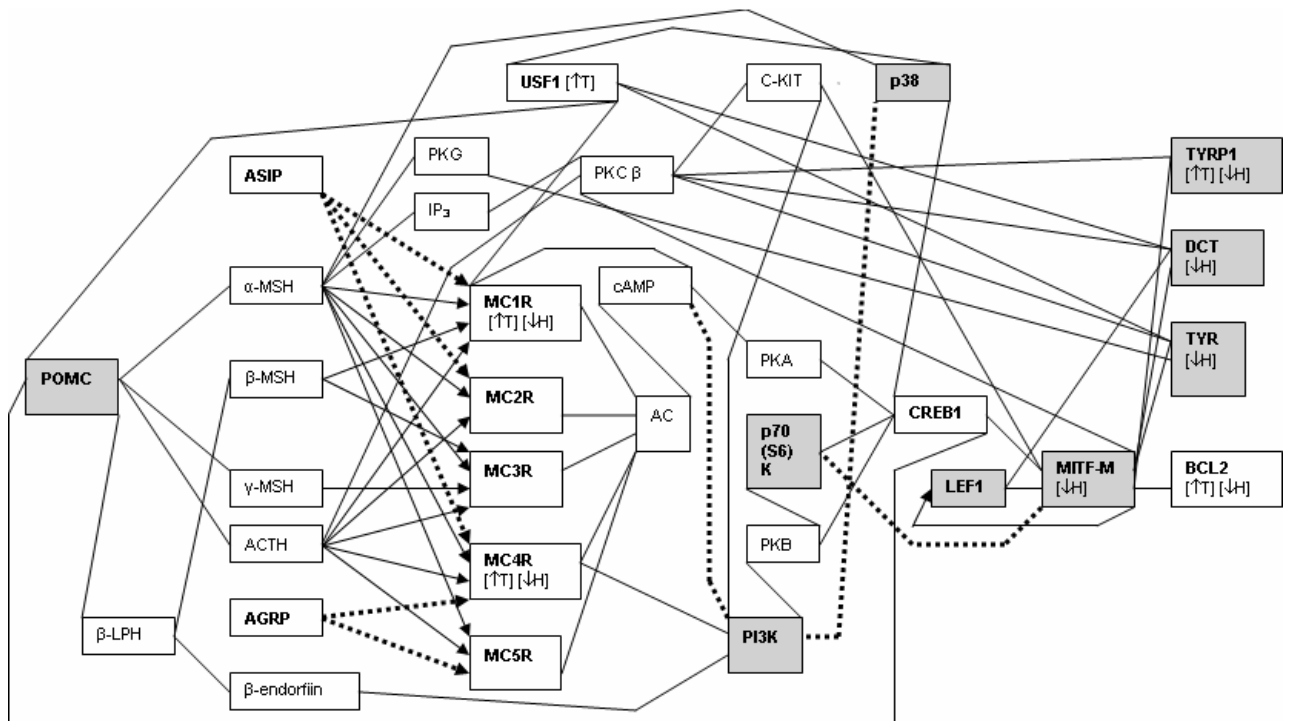
BCL2 ekspressioon oli vitiliigopatsientide kahjustamata nahas kõrgenenud võrreldes tervete kontrollisikute nahaga ($p<0,05$) ja vitiliigopatsientide kahjustatud nahas langenud võrreldes patsientide kahjustamata nahaga ($p<0,05$). Samas ei leitud volutsütomeetria teel tehtud uuringus (van den Wijngaard *et al.*, 2000b)

vitiliigopatsientide kahjustamata nahast ja kontrollisikute nahast pärit melanotsüütides olulist erinevust BCL2 ekspressioonis. Tulemuste lahknevuse seletusena võib välja pakkuda võimaluse, et BCL2 ekspressioonierinevused vitiliigopatsientide kahjustamata naha ja tervete kontrollisikute naha vahel on olemas keratinotsüütides, aga mitte melanotsüütides. BCL2 mRNA olemasolu ilmumine vitiliigopatsientide kahjustatud nahas erineb kirjanduse põhjal teada olevast immunohistokeemia teel saadud tulemusest, mille kohaselt vitiliigopatsientide kahjustatud nahas BCL2 ekspressioon puudub (Plettenberg *et al.*, 1995).

BCL2 kõrgeunud mRNA tase patsientide kahjustamata nahas võrreldes tervete kontrollisikute nahaga ning langenud tase patsientide kahjustatud nahas võrreldes kahjustamata nahaga näitab BCL2 ekspressioonitaseme dekompensatsiooni toimumist patsientide kahjustatud nahas.

5.1.4 Kokkuvõttev joonis uuritud geenide ekspressioonitasemete muutustest vitiliigopatsientide nahas

Joonisel 5 on esitatud uuritud geenide peamised kirjanduse põhjal teadaolevad omavahelised regulatsiooniseosed melanotsüütides ning juurde on märgitud käesolevas töös leitud muutused uuritud geenide ekspressioonitasemetes vitiliigopatsientide nahas.



Joonis 5: uuritud geenide peamiste kirjanduse põhjal teadaolevate melanotsüütides esinevate omavaheliste regulatsiooniseoste skeem; esitatud on käesolevas töös leitud muutused uuritud geenide ekspressioonitasemetes vitiliigopatsientide nahas. Joonise tingmärkide seletused on leheküljel 43.

→	retseptori agonist
•••→	retseptori antagonist
—	positiivne regulatsioon
••••	negatiivne regulatsioon
□	langenud ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas võrreldes tervete kontrollisikute nahaga
[↑]	kõrgenenud ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustamata nahas võrreldes tervete kontrollisikute nahaga
[↓]	langenud ekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga

6 Järeldused

- 1) Võrreldes tervete kontrollisikute nahaga on vitiliigopatsientide kahjustatud nahas langenud POMC'i, LEF1, p38, PIK3CB ja RPS6KB1 ekspressioonitasemed.
- 2) Võrreldes tervete kontrollisikute nahaga on vitiliigopatsientide kahjustamata nahas tõusnud MC1R'i, MC4R'i, TYRP1, USF1 ja BCL2 ekspressioonitasemed
- 3) Võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga, on vitiliigopatsientide kahjustatud nahas langenud MC1R'i, MC4R'i, TYR'i, TYRP1, DCT, MITF-M'i ja BCL2 ekspressioonitasemed.
- 4) Ekspressiooniandmeid üldistades võib öelda, et vitiliigopatsientide kahjustatud nahas toimub melanokortiini süsteemi dekompensatsioon, vitiliigopatsientide kahjustamata nahas leiab aset süsteemne melanokortiini süsteemi ülesregulatsioon. Dekompensatsioonile viitavad ekspressiooniprofiilid on ka melanokortiini süsteemilt pigmentatsiooniensüümideni signaaliülekanes osalevatel geenidel MITF-M ja LEF1 ning MITF-M'i poolt reguleeritaval antiapoptoosilisel faktoril BCL2.
- 5) Tugevad positiivsed korrelatsioonid olid MC3R'i ja MC4R'i, p38 ja PI3K, p38 ja p70(S6)K ning PI3K ja p70(S6)K ekspressioonitasemete vahel, mis näitab nende geenipaaride omavahelist reguleeritavat seotust. Tugev positiivne korrelatsioon melanogeneesiensüümide TYR'i, TYRP1 ja DCT ekspressioonitasemete vahel viitab nende ensüümide sarnasele regulatsioonile transkriptsioonifaktorite poolt. MITF-M'i, p38 ja PI3KCB ekspressioonitasemed korreleerusid positiivselt TYR'i, TYRP1 ja DCT mRNA tasemetega tervete kontrollisikute nahas, aga mitte vitiliigopatsientide nahas, mis viitab arvatavasti MITF-M'i, p38 ja PI3KCB poolse melanogeneesi positiivse regulatsiooni nõrgenemisele vitiliigopatsientide nahas.

Lühikokkuvõte

6.1.1 Kokkuvõte

Vitiliigo on omandatud depigmenteeriv nahahaigus, mille puhul toimub funktsioneerivate melanotsüütide kadumine. Vitiliigo tekkepõhjused ei ole lõpuni teada.

Melanokortiini süsteemiks nimetatakse kokkuvõtvalt prohormooni POMC koos tema post-translatsioonilise protsessingu produktidega, melanokortiini retseptoreid ja nende retseptorite antagoniste. Melanokortiini süsteem täidab nahas stressivastusega seotud funktsioone. Signaaliülekanne melanokortiini süsteemilt melanogeneensüümidele toimub peamiselt cAMP raja vahendusel.

Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada melanokortiini süsteemi geenide ja signaaliülekanndes melanokortiini süsteemilt pigmentatsiooniensüümidele osalevate geenide tähtsust vitiliigo patogeneesis. Selleks mõõdeti QRT-PCR'i meetodil vitiliigopatsientide kahjustatud ja kahjustamata nahas ning tervete kontrollisikute nahas mRNA ekspressioonitasemed 8 melanokortiini süsteemi geenil ja 11 signaaliülekanndes melanokortiini süsteemilt melanogeneensüümidele osaleval geenil. Uuritud geenid olid järgmised: POMC, MC1R-MC5R, ASIP, AGRP, MITF-M, p38, PIK3CB, RPS6KB1, CREB1, LEF1, BCL2, USF1, TYR, TYRP1 ja DCT.

Töö tulemusena selgus, et võrreldes tervete kontrollisikute nahaga olid vitiliigopatsientide kahjustatud nahas langenud POMC'i, LEF1, p38, PIK3CB ja RPS6KB1 mRNA tasemed. Võrreldes tervete kontrollisikute nahaga olid vitiliigopatsientide kahjustamata nahas tõusnud MC1R'i, MC4R'i, TYRP1, USF1 ja BCL2 ekspressioonitasemed. Võrreldes vitiliigopatsientide kahjustamata nahaga olid vitiliigopatsientide kahjustatud nahas langenud MC1R'i, MC4R'i, TYR'i, TYRP1, DCT, MITF-M'i ja BCL2 mRNA tasemed.

Spearman'i meetodit kasutades leiti statistiliselt olulised ($p < 0,01$) positiivsed korrelatsioonid MC3R'i ja MC4R'i, p38 ja PIK3CB ning p38 ja RPS6KB1 ekspressioonitasemete vahel nii kontrollisikute kui ka vitiliigopatsientide nahas. Lisaks sellele korreleerusid omavahel positiivselt TYR'i, TYRP1 ja DCT mRNA tasemed nii kontrollisikute kui ka vitiliigopatsientide nahas ($p < 0,01$). MITF-M'i, PIK3CB ja p38 ekspressioonitasemed korreleerusid positiivselt TYR'i, TYRP1 ja DCT mRNA tasemetega tervete kontrollisikute nahas ($p < 0,05$), aga mitte vitiliigopatsientide nahas.

Ekspressiooniandmeid üldistades võib öelda, et ilmnes vitiliigopatsientide kahjustatud nahas toimuv melanokortiini süsteemi dekompensatsioon ja mitmete melanokortiini süsteemilt melanogeneesisüümideni viivas signaaliülekandes osalevate geenide alaekspressioon vitiliigopatsientide kahjustatud nahas.

6.1.2 Abstract

Vitiligo is an acquired hypopigmentary cutaneous disorder that is characterized by the loss of functional melanocytes. The causes of vitiligo are not known to the full extent.

Melanocortin system is a generalised name for prohormone POMC and the products of its post-translational processing, melanocortin receptors and the antagonists of these receptors. The functions of melanocortin system in the skin are related to stress response. The main pathway of signal transduction from the melanocortin system to melanogenesis enzymes is mediated by cAMP.

The aim of this study was to assess the functional importance of genes of the melanocortin system and genes of the signal transduction pathway between the melanocortin system and the melanogenesis enzymes in the pathogenesis of vitiligo. Using QRT-PCR method, mRNA expression levels of 8 genes of the melanocortin system and 11 genes related to signal transduction from the melanocortin system to melanogenesis enzymes were measured in lesional and non-lesional skin of vitiligo patients and in skin of healthy control subjects. The genes involved in the study were: POMC, MC1R-MC5R, ASIP, AGRP, MITF-M, p38, PIK3CB, RPS6KB1, CREB1, LEF1, BCL2, USF1, TYR, TYRP1 and DCT.

The mRNA levels of POMC, LEF1, p38, PIK3CB and RPS6KB1 were found to be decreased in lesional skin of vitiligo patients when compared to skin of healthy control subjects. Increases in the expression levels of MC1R, MC4R, TYR, TYRP1, DCT, MITF-M and BCL2 in non-lesional skin of vitiligo patients when compared to skin of healthy control subjects were observed. The mRNA levels of MC1R, MC4R, TYR, TYRP1, DCT, MITF-M and BCL2 were found to be decreased in lesional skin of vitiligo patients when compared to non-lesional skin of vitiligo patients.

Using Spearman method, statistically significant ($p < 0,01$) positive correlations were found between the expression levels of MC3R and MC4R, p38 and PI3KCB, and p38 and RPS6KB1 both in skin of vitiligo patients and in skin of healthy control subjects. In addition to that, positive correlations between the mRNA levels of TYR,

TYRP1 and DCT were detected both in skin of vitiligo patients and in skin of healthy control subjects ($p < 0,01$). The expression levels of MITF-M, PI3KCB and p38 were positively correlated with the mRNA levels of melanogenesis enzymes in skin of healthy control subjects ($p < 0,05$) but not in skin of vitiligo patients.

As a generalisation of the gene expression data, it can be said that systemic decompensation of the melanocortin system became evident in the lesional skin of vitiligo patients. In addition to this, several genes that are involved in signal transduction from the melanocortin system to melanogenesis enzymes were found to have decreased expression levels in lesional skin of vitiligo patients.

7 Tänuavaldused

Asendamatu abi eest töö planeerimisel ja tulemuste analüüsimisel tänan oma juhendajaid Külli Kingot, Sulev Kõksi ja Ursel Soometsa ning samuti Tartu Ülikooli Füsioloogia instituudi juhatajat Eero Vasarat. Abi eest töö praktilise osa meetodite õppimisel tänan ennekõike Külli Kingot ja Sulev Kõksi. Nõuannete eest magistritöö kirjutamisel väärrib tänu Tanel Traks. Igakülgsete nõuannete eest töö tegemisel tänan ka kõiki teisi Tartu Ülikooli Füsioloogia instituudi inimesi.

8 Lisad

Tabel 6. Uuritud geenide tervete kontrollisikute nahas mõõdetud ekspressioonitasemete Spearman'i korrelatsioonikoefitsendid (Spearman'i r).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

	POMC	TYR	TYRP1	DCT	MC1R	MC2R	MC3R	MC4R	MC5R	ASIP	AGRP	MITF	LEF1	USF1	p38	CREB1	PIK3CB	RPS6KB1	BCL2
POMC	1,00	-0,32	-0,34	-0,49*	0,11	0,07	0,54*	0,57**	0,41	0,32	0,05	-0,47*	-0,14	0,40	-0,35	-0,46	-0,31	-0,31	-0,50
TYR	-0,32	1,00	0,80***	0,73***	0,39	-0,15	-0,05	-0,12	-0,15	0,28	-0,02	0,50*	-0,14	0,60	0,57*	-0,71	0,52*	0,45	-0,50
TYRP1	-0,34	0,80***	1,00	0,82***	0,47*	-0,22	-0,23	-0,23	-0,12	0,26	-0,24	0,69**	0,54	0,60	0,76***	-0,14	0,75***	0,68**	-0,50
DCT	-0,49*	0,73***	0,82***	1,00	0,40	0,04	-0,08	-0,06	-0,09	0,22	-0,25	0,58*	0,31	-0,40	0,68**	-0,29	0,58*	0,51	-0,50
MC1R	0,11	0,39	0,47*	0,40	1,00	0,43	0,02	0,01	0,13	0,73***	-0,06	0,11	0,31	0,40	0,29	0,29	0,13	-0,03	-1,00
MC2R	0,07	-0,15	-0,22	0,04	0,43	1,00	0,60*	0,60*	0,41	0,28	-0,27	-0,14	-0,70	0,20	-0,26	0,37	-0,40	-0,51	-0,50
MC3R	0,54*	-0,05	-0,23	-0,08	0,02	0,60*	1,00	0,79***	0,37	0,11	-0,29	-0,21	-0,40	0,50	-0,22	-0,10	-0,17	-0,50	
MC4R	0,57**	-0,12	-0,23	-0,06	0,01	0,60*	0,79***	1,00	0,36	0,29	-0,21	-0,47	-0,43	0,80	-0,38	-0,54	-0,35	-0,53*	-1,00
MC5R	0,41	-0,15	-0,12	-0,09	0,13	0,41	0,37	0,36	1,00	0,21	-0,35	-0,08	0,70	0,00	-0,25	-0,37	-0,19	-0,07	-0,50
ASIP	0,32	0,28	0,26	0,22	0,73***	0,28	0,11	0,29	0,21	1,00	-0,01	-0,01	-0,20	-0,40	0,04	-0,61	-0,04	-0,22	-0,50
AGRP	0,05	-0,02	-0,24	-0,25	-0,06	-0,27	-0,29	-0,21	-0,35	-0,01	1,00	-0,42	-0,20	0,50	-0,44	0,03	-0,63**	-0,67**	
MITF	-0,47*	0,50*	0,69**	0,58*	0,11	-0,14	-0,21	-0,47	-0,08	-0,01	-0,42	1,00	0,14	0,09	0,71***	0,07	0,66***	0,71***	0,03
LEF1	-0,14	-0,14	0,54	0,31	0,31	-0,70	-0,40	-0,43	0,70	-0,20	-0,20	0,14	1,00	0,35	0,41	0,55*	0,24	0,58*	0,38
USF1	0,40	0,60	0,60	-0,40	0,40	0,20	0,50	0,80	0,00	-0,40	0,50	0,09	0,35	1,00	0,34	0,51	0,22	0,12	0,36
p38	-0,35	0,57*	0,76***	0,68**	0,29	-0,26	-0,22	-0,38	-0,25	0,04	-0,44	0,71***	0,41	0,34	1,00	0,33	0,92***	0,82***	0,45
CREB1	-0,46	-0,71	-0,14	-0,29	0,29	0,37	-0,10	-0,54	-0,37	-0,61	0,03	0,07	0,55*	0,51	0,33	1,00	0,19	0,31	0,35
PIK3CB	-0,31	0,52*	0,75***	0,58*	0,13	-0,40	-0,17	-0,35*	-0,19	-0,04	-0,63**	0,66***	0,24	0,22	0,92***	0,19	1,00	0,85***	0,32
RPS6KB1	-0,31	0,45	0,68**	0,51	-0,03	-0,51	-0,50	-0,53*	-0,07	-0,22	-0,67**	0,71***	0,58*	0,12	0,82***	0,31	0,85***	1,00	0,23
BCL2	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-1,00	-0,50		-1,00	-0,50	-0,50		0,03	0,38	0,36	0,45	0,35	0,32	0,23	1,00

Tabel 7. Uuritud geenide vitiliigopatsientide kahjustamata nahas mõõdetud ekspressioonitasemetega Spearman'i korrelatsioonikoeffitsendid (Spearman'i r).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

	POMC	TYR	TYRP1	DCT	MC1R	MC2R	MC3R	MC4R	MC5R	ASIP	AGRP	MITF	LEF1	USF1	p38	CREB1	PIK3CB	RPS6KB1	BCL2
POMC	1,00	-0,31	-0,16	-0,28	0,07	0,31	0,28	0,22	-0,12	0,42*	0,14	0,03	-0,19	-0,03	-0,16	0,06	0,03	0,21	-0,46
TYR	-0,31	1,00	0,89***	0,71***	0,15	-0,08	-0,31	-0,31	-0,16	-0,15	-0,30	0,21	0,38	-0,00	0,07	0,09	0,08	0,06	0,32
TYRP1	-0,16	0,89***	1,00	0,54**	-0,01	-0,04	-0,41*	-0,32	-0,13	-0,27	-0,45*	0,15	0,42	0,15	-0,02	0,05	0,09	0,15	0,32
DCT	-0,28	0,71***	0,54**	1,00	0,33	-0,05	-0,16	-0,18	-0,03	0,09	-0,21	0,25	0,20	-0,05	0,29	0,00	0,37	0,20	0,40
MC1R	0,07	0,15	-0,01	0,33	1,00	0,29	0,09	0,15	-0,21	0,27	-0,09	-0,00	0,02	0,04	-0,02	-0,13	0,19	0,02	0,05
MC2R	0,31	-0,08	-0,04	-0,05	0,29	1,00	0,63***	0,54**	0,20	-0,05	0,02	-0,14	-0,13	0,23	0,05	0,07	0,02	-0,03	0,26
MC3R	0,28	-0,31	-0,41*	-0,16	0,09	0,63***	1,00	0,79***	0,26	0,15	0,27	-0,32	-0,23	0,15	0,05	-0,16	-0,13	-0,06	-0,23
MC4R	0,22	-0,31	-0,32	-0,18	0,15	0,54**	0,79***	1,00	0,51**	0,05	0,11	-0,28	-0,22	0,06	-0,02	-0,04	0,05	0,14	-0,21
MC5R	-0,12	-0,16	-0,13	-0,03	-0,21	0,20	0,26	0,51**	1,00	-0,35	0,28	-0,11	0,01	-0,16	0,36	0,12	0,15	0,16	0,22
ASIP	0,42*	-0,15	-0,27	0,09	0,27	-0,05	0,15	0,05	-0,35	1,00	-0,04	-0,16	-0,42*	0,06	-0,29	-0,04	-0,09	-0,16	-0,16
AGRP	0,14	-0,30	-0,45*	-0,21	-0,09	0,02	0,27	0,11	0,28	-0,04	1,00	-0,01	-0,15	-0,31	0,06	0,07	-0,23	-0,26	-0,07
MITF	0,03	0,21	0,15	0,25	-0,00	-0,14	-0,32	-0,28	-0,11	-0,16	-0,01	1,00	0,67***	0,14	0,43*	0,53*	0,51**	0,51*	0,26
LEF1	-0,19	0,38	0,42	0,20	0,02	-0,13	-0,23	-0,22	0,01	-0,42*	-0,15	0,67***	1,00	0,26	0,20	0,50*	0,18	0,28	0,40
USF1	-0,03	-0,00	0,15	-0,05	0,04	0,23	0,15	0,06	-0,16	0,06	-0,31	0,14	0,26	1,00	-0,28	0,04	-0,35	-0,14	-0,26
p38	-0,16	0,07	-0,02	0,29	-0,02	0,05	0,05	-0,02	0,36	-0,29	0,06	0,43*	0,20	-0,28	1,00	0,40	0,75***	0,75***	0,08
CREB1	0,06	0,09	0,05	0,00	-0,13	0,07	-0,16	-0,04	0,12	-0,04	0,07	0,53*	0,50*	0,04	0,40	1,00	0,33	0,40*	0,28
PIK3CB	0,03	0,08	0,09	0,37	0,19	0,02	-0,13	0,05	0,15	-0,09	-0,23	0,51**	0,18	-0,35	0,75***	0,33	1,00	0,83***	0,17
RPS6KB1	0,21	0,06	0,15	0,20	0,02	-0,03	-0,06	0,14	0,16	-0,16	-0,26	0,51**	0,28	-0,14	0,75***	0,40*	0,83***	1,00	-0,15
BCL2	-0,46	0,32	0,32	0,40	0,05	0,26	-0,23	-0,21	0,22	-0,16	-0,07	0,26	0,40	-0,26	0,08	0,28	0,17	-0,15	1,00

Tabel 8. Uuritud geenide vitiliigopatsientide kahjustatud nahas mõõdetud ekspresioonitasemete Spearman'i korrelatsioonikoefitsendid (Spearman'i r).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

	POMC	TYR	TYRP1	DCT	MC1R	MC2R	MC3R	MC4R	MC5R	ASIP	AGRP	MITF	LEF1	USF1	p38	CREB1	PIK3CB	RPS6KB1	BCL2
POMC	1,00	-0,11	-0,14	-0,17	-0,15	0,29	0,24	0,27	0,26	0,16	-0,02	-0,09	-0,14	-0,36	-0,20	0,22	-0,00	-0,08	-0,06
TYR	-0,11	1,00	0,74***	0,69***	0,21	0,08	-0,04	-0,05	-0,10	0,12	0,16	-0,37	0,03	-0,30	-0,30	-0,33	-0,02	-0,47*	0,23
TYRP1	-0,14	0,74***	1,00	0,81***	0,06	-0,24	-0,28	-0,42*	-0,13	0,01	-0,13	-0,14	0,27	-0,11	-0,16	-0,30	0,11	-0,32	0,15
DCT	-0,17	0,69***	0,81***	1,00	0,06	-0,19	-0,07	-0,26	0,06	-0,00	-0,02	-0,12	0,13	-0,16	0,01	-0,32	0,34	-0,08	0,24
MC1R	-0,15	0,21	0,06	0,06	1,00	0,30	0,17	0,45*	0,24	0,17	0,36	-0,34	-0,55*	-0,33	-0,26	-0,40	-0,21	-0,27	-0,36
MC2R	0,29	0,08	-0,24	-0,19	0,30	1,00	0,44*	0,60**	0,28	0,23	0,24	-0,30	-0,19	-0,02	-0,14	0,04	-0,16	-0,24	-0,22
MC3R	0,24	-0,04	-0,28	-0,07	0,17	0,44*	1,00	0,83***	0,76***	0,36	0,16	-0,16	-0,32	-0,33	-0,15	-0,25	-0,11	-0,15	-0,37
MC4R	0,27	-0,05	-0,42*	-0,26	0,45*	0,60**	0,83***	1,00	0,62***	0,17	0,29	-0,24	-0,13	-0,19	-0,28	0,09	-0,25	-0,20	-0,08
MC5R	0,26	-0,10	-0,13	0,06	0,24	0,28	0,76***	0,62***	1,00	0,29	-0,01	-0,17	-0,34	-0,40	-0,23	-0,16	-0,07	-0,02	-0,42
ASIP	0,16	0,12	0,01	-0,00	0,17	0,23	0,36	0,17	0,29	1,00	0,12	-0,01	-0,30	-0,38	-0,26	-0,39	-0,18	-0,39*	0,14
AGRP	-0,02	0,16	-0,13	-0,02	0,36	0,24	0,16	0,29	-0,01	0,12	1,00	-0,07	-0,03	-0,06	0,30	-0,18	0,37	0,22	0,12
MITF	-0,09	-0,37	-0,14	-0,12	-0,34	-0,30	-0,16	-0,24	-0,17	-0,01	-0,07	1,00	0,35	0,30	0,46**	0,43*	0,35*	0,35*	0,46
LEF1	-0,14	0,03	0,27	0,13	-0,55*	-0,19	-0,32	-0,13	-0,34	-0,30	-0,03	0,35	1,00	0,57**	0,12	0,53**	0,04	0,03	0,62**
USF1	-0,36	-0,30	-0,11	-0,16	-0,33	-0,02	-0,33	-0,19	-0,40	-0,38	-0,06	0,30	0,57**	1,00	0,12	0,26	-0,04	-0,06	0,32
p38	-0,20	-0,30	-0,16	0,01	-0,26	-0,14	-0,15	-0,28	-0,23	-0,26	0,30	0,46**	0,12	0,12	1,00	0,22	0,63***	0,69***	0,19
CREB1	0,22	-0,33	-0,30	-0,32	-0,40	0,04	-0,25	0,09	-0,16	-0,39	-0,18	0,43*	0,53**	0,26	0,22	1,00	0,13	0,36	0,58**
PIK3CB	-0,00	-0,02	0,11	0,34	-0,21	-0,16	-0,11	-0,25	-0,07	-0,18	0,37	0,35*	0,04	-0,04	0,63***	0,13	1,00	0,55***	0,12
RPS6KB1	-0,08	-0,47*	-0,32	-0,08	-0,27	-0,24	-0,15	-0,20	-0,02	-0,39*	0,22	0,35*	0,03	-0,06	0,69***	0,36	0,55***	1,00	0,01
BCL2	-0,06	0,23	0,15	0,24	-0,36	-0,22	-0,37	-0,08	-0,42	0,14	0,12	0,46	0,62**	0,32	0,19	0,58**	0,12	0,01	1,00

9 Viited

- Adan, R.A., Tiesjema, B., Hillebrand, J.J., la Fleur, S.E., Kas, M.J. & de Krom, M. (2006) The MC4 receptor and control of appetite. *Br J Pharmacol*, 149, 815-827.
- Agrawal, D., Shajil, E.M., Marfatia, Y.S. & Begum, R. (2004) Study on the antioxidant status of vitiligo patients of different age groups in Baroda. *Pigment Cell Res*, 17, 289-294.
- Allen, R.R., Qi, L. & Higgins, P.J. (2005) Upstream stimulatory factor regulates E box-dependent PAI-1 transcription in human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol*, 203, 156-165.
- Ao, Y., Park, H.Y., Olaizola-Horn, S. & Gilchrest, B.A. (1998) Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for optimal alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced pigmentation. *Exp Cell Res*, 244, 117-124.
- Bahadoran, P., Ballotti, R. & Ortonne, J.P. (2003) Hypomelanosis, immunity, central nervous system: no more "and", not the end. *Am J Med Genet A*, 116, 334-337.
- Baharav, E., Merimski, O., Shoenfeld, Y., Zigelman, R., Gilbrud, B., Yechezkel, G., Youinou, P. & Fishman, P. (1996) Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clin Exp Immunol*, 105, 84-88.
- Becher, E., Mahnke, K., Brzoska, T., Kalden, D.H., Grabbe, S. & Luger, T.A. (1999) Human peripheral blood-derived dendritic cells express functional melanocortin receptor MC-1R. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 188-195.
- Berven, L.A. & Crouch, M.F. (2000) Cellular function of p70S6K: a role in regulating cell motility. *Immunol Cell Biol*, 78, 447-451.
- Bhardwaj, R., Becher, E., Mahnke, K., Hartmeyer, M., Schwarz, T., Scholzen, T. & Luger, T.A. (1997) Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. *J Immunol*, 158, 3378-3384.
- Bhardwaj, R.S., Schwarz, A., Becher, E., Mahnke, K., Aragane, Y., Schwarz, T. & Luger, T.A. (1996) Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. *J Immunol*, 156, 2517-2521.
- Bhawan, J. & Bhutani, L.K. (1983) Keratinocyte damage in vitiligo. *J Cutan Pathol*, 10, 207-212.
- Blume-Jensen, P., Jiang, G., Hyman, R., Lee, K.F., O'Gorman, S. & Hunter, T. (2000) Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat Genet*, 24, 157-162.
- Bohm, M., Eickelmann, M., Li, Z., Schneider, S.W., Oji, V., Diederichs, S., Barsh, G.S., Vogt, A., Stieler, K., Blume-Peytavi, U. & Luger, T.A. (2005) Detection of functionally active melanocortin receptors and evidence for an immunoregulatory activity of alpha-melanocyte-stimulating hormone in human dermal papilla cells. *Endocrinology*, 146, 4635-4646.
- Bohm, M., Luger, T.A., Tobin, D.J. & Garcia-Borrón, J.C. (2006a) Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J Invest Dermatol*, 126, 1966-1975.
- Bohm, M., Moellmann, G., Cheng, E., Alvarez-Franco, M., Wagner, S., Sassone-Corsi, P. & Halaban, R. (1995) Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ*, 6, 291-302.
- Bohm, M., Schiller, M. & Luger, T.A. (2006b) Non-pigmentary actions of alpha-melanocyte-stimulating hormone--lessons from the cutaneous melanocortin system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 52, 61-68.
- Boissy, R.E. & Manga, P. (2004) On the etiology of contact/occupational vitiligo. *Pigment Cell Res*, 17, 208-214.
- Bortul, R., Tazzari, P.L., Cappellini, A., Tabellini, G., Billi, A.M., Bareggi, R., Manzoli, L., Cocco, L. & Martelli, A.M. (2003) Constitutively active Akt1 protects HL60 leukemia cells from TRAIL-induced apoptosis through a mechanism involving NF-kappaB activation and cFLIP(L) up-regulation. *Leukemia*, 17, 379-389.
- Breit, A., Wolff, K., Kalwa, H., Jarry, H., Buch, T. & Gudermann, T. (2006) The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors. *J Biol Chem*, 281, 37447-37456.
- Buggy, J.J. (1998) Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 331 (Pt 1), 211-216.
- Busca, R., Bertolotto, C., Ortonne, J.P. & Ballotti, R. (1996) Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J Biol Chem*, 271, 31824-31830.
- Butler, A.A. (2006) The melanocortin system and energy balance. *Peptides*, 27, 281-290.

- Caixia, T., Hongwen, F. & Xiran, L. (1999)** Levels of soluble interleukin-2 receptor in the sera and skin tissue fluids of patients with vitiligo. *J Dermatol Sci*, 21, 59-62.
- Cals-Grierson, M.M. & Ormerod, A.D. (2004)** Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide*, 10, 179-193.
- Carlezon, W.A., Jr., Duman, R.S. & Nestler, E.J. (2005)** The many faces of CREB. *Trends Neurosci*, 28, 436-445.
- Chaki, S. & Okuyama, S. (2005)** Involvement of melanocortin-4 receptor in anxiety and depression. *Peptides*, 26, 1952-1964.
- Chen, C.H., Zhang, D.H., LaPorte, J.M. & Ray, A. (2000)** Cyclic AMP activates p38 mitogen-activated protein kinase in Th2 cells: phosphorylation of GATA-3 and stimulation of Th2 cytokine gene expression. *J Immunol*, 165, 5597-5605.
- Chen, M., Celik, A., Georgeson, K.E., Harmon, C.M. & Yang, Y. (2006)** Molecular basis of melanocortin-4 receptor for AGRP inverse agonism. *Regul Pept*, 136, 40-49.
- Chen, W., Kelly, M.A., Opitz-Araya, X., Thomas, R.E., Low, M.J. & Cone, R.D. (1997)** Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell*, 91, 789-798.
- Chu, C.Y., Liu, Y.L., Chiu, H.C. & Jee, S.H. (2006)** Dopamine-induced apoptosis in human melanocytes involves generation of reactive oxygen species. *Br J Dermatol*, 154, 1071-1079.
- Conkright, M.D. & Montminy, M. (2005)** CREB: the unindicted cancer co-conspirator. *Trends Cell Biol*, 15, 457-459.
- Corre, S. & Galibert, M.D. (2005)** Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res*, 18, 337-348.
- Corre, S., Primot, A., Sviderskaya, E., Bennett, D.C., Vaulont, S., Goding, C.R. & Galibert, M.D. (2004)** UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem*, 279, 51226-51233.
- Cucchi, M.L., Frattini, P., Santagostino, G. & Orecchia, G. (2000)** Higher plasma catecholamine and metabolite levels in the early phase of nonsegmental vitiligo. *Pigment Cell Res*, 13, 28-32.
- Cucchi, M.L., Frattini, P., Santagostino, G., Preda, S. & Orecchia, G. (2003)** Catecholamines increase in the urine of non-segmental vitiligo especially during its active phase. *Pigment Cell Res*, 16, 111-116.
- Curry, J.L., Pinto, W., Nickoloff, B.J. & Slominski, A.T. (2001)** Human keratinocytes express functional alpha-MSH (MC1-R) receptors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 37, 234-236.
- Daniels, D., Patten, C.S., Roth, J.D., Yee, D.K. & Fluharty, S.J. (2003)** Melanocortin receptor signaling through mitogen-activated protein kinase in vitro and in rat hypothalamus. *Brain Res*, 986, 1-11.
- de Guzman Strong, C., Wertz, P.W., Wang, C., Yang, F., Meltzer, P.S., Andl, T., Millar, S.E., Ho, I.C., Pai, S.Y. & Segre, J.A. (2006)** Lipid defect underlies selective skin barrier impairment of an epidermal-specific deletion of Gata-3. *J Cell Biol*, 175, 661-670.
- del Marmol, V. & Beermann, F. (1996)** Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett*, 381, 165-168.
- del Marmol, V., Ito, S., Jackson, I., Vachtenheim, J., Berr, P., Ghanem, G., Morandini, R., Wakamatsu, K. & Huez, G. (1993)** TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Lett*, 327, 307-310.
- Dell'anna, M.L. & Picardo, M. (2006)** A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo. *Pigment Cell Res*, 19, 406-411.
- deOliveira, A.R., Castrucci, A.M. & Visconti, M.A. (1996)** Cellular signalling in vertebrate pigment cells. *Braz J Med Biol Res*, 29, 1743-1749.
- Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E. & Pagano, M. (2006)** S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 314, 467-471.
- Eastman, Q. & Grosschedl, R. (1999)** Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 233-240.
- Englaro, W., Rezzonico, R., Durand-Clement, M., Lallemand, D., Ortonne, J.P. & Ballotti, R. (1995)** Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem*, 270, 24315-24320.
- Eshel, Y. & Salomon, Y. (1994)** Calmodulin-binding peptides interfere with melanocyte-stimulating hormone receptor activity and stimulate adenosine 3',5'-monophosphate production in M2R mouse melanoma cells. *Endocrinology*, 134, 177-185.

- Fitzpatrick, T.B., Miyamoto, M. & Ishikawa, K. (1967)** The evolution of concepts of melanin biology. *Arch Dermatol*, 96, 305-323.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R. & Cantley, L.C. (1997)** PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88, 435-437.
- Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A. & Sessa, W.C. (1999)** Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399, 597-601.
- Galibert, M.D., Carreira, S. & Goding, C.R. (2001)** The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *Embo J*, 20, 5022-5031.
- Gantz, I. & Fong, T.M. (2003)** The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284, E468-474.
- Garcia, Z., Kumar, A., Marques, M., Cortes, I. & Carrera, A.C. (2006)** Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *Embo J*, 25, 655-661.
- Gauthier, Y., Cario-Andre, M., Lepreux, S., Pain, C. & Taieb, A. (2003a)** Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. *Br J Dermatol*, 148, 95-101.
- Gauthier, Y., Cario Andre, M. & Taieb, A. (2003b)** A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? *Pigment Cell Res*, 16, 322-332.
- Getting, S.J. (2006)** Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacol Ther*, 111, 1-15.
- Gilhar, A., Zelikson, B., Ulman, Y. & Etzioni, A. (1995)** In vivo destruction of melanocytes by the IgG fraction of serum from patients with vitiligo. *J Invest Dermatol*, 105, 683-686.
- Goding, C.R. (2000)** Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*, 14, 1712-1728.
- Gordon, P.R. & Gilchrist, B.A. (1989)** Human melanogenesis is stimulated by diacylglycerol. *J Invest Dermatol*, 93, 700-702.
- Gottschalk, G.M. & Kidson, S.H. (2007)** Molecular analysis of vitiligo lesions reveals sporadic melanocyte survival. *Int J Dermatol*, 46, 268-272.
- Graham, A., Westerhof, W. & Thody, A.J. (1999)** The expression of alpha-MSH by melanocytes is reduced in vitiligo. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 470-473.
- Greer, E.L. & Brunet, A. (2005)** FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24, 7410-7425.
- Harning, R., Cui, J. & Bystryn, J.C. (1991)** Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo. *J Invest Dermatol*, 97, 1078-1080.
- Hemesath, T.J., Price, E.R., Takemoto, C., Badalian, T. & Fisher, D.E. (1998)** MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*, 391, 298-301.
- Hernandez-Perez, E. (1979)** Vitiligo treated with ACTH. *Int J Dermatol*, 18, 578-579.
- Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I. & Ogawa, N. (2000)** Inhibition of tyrosinase reduces cell viability in catecholaminergic neuronal cells. *J Neurochem*, 75, 1771-1774.
- Hinney, A., Becker, I., Heibult, O., Nottebom, K., Schmidt, A., Ziegler, A., Mayer, H., Siegfried, W., Blum, W.F., Remschmidt, H. & Hebebrand, J. (1998)** Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 3737-3741.
- Hong, S.J., Huh, Y., Chae, H., Hong, S., Lardaro, T. & Kim, K.S. (2006)** GATA-3 regulates the transcriptional activity of tyrosine hydroxylase by interacting with CREB. *J Neurochem*, 98, 773-781.
- Howitz, J., Brodthagen, H., Schwartz, M. & Thomsen, K. (1977)** Prevalence of vitiligo. Epidemiological survey on the Isle of Bornholm, Denmark. *Arch Dermatol*, 113, 47-52.
- Huang, C.L., Nordlund, J.J. & Boissy, R. (2002)** Vitiligo: a manifestation of apoptosis? *Am J Clin Dermatol*, 3, 301-308.
- Hue, J., Kim, A., Song, H., Choi, I., Park, H., Kim, T., Lee, W.J., Kang, H. & Cho, D. (2005)** IL-18 enhances SCF production of melanoma cells by regulating ROI and p38 MAPK activity. *Immunol Lett*, 96, 211-217.
- Huggins, R.H., Schwartz, R.A. & Janniger, C.K. (2005)** Vitiligo. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, 14, 137-142, 144-135.
- Hunt, G., Donatien, P.D., Lunec, J., Todd, C., Kyne, S. & Thody, A.J. (1994a)** Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. *Pigment Cell Res*, 7, 217-221.

- Hunt, G., Todd, C., Kyne, S. & Thody, A.J. (1994b)** ACTH stimulates melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Endocrinol*, 140, R1-3.
- Im, S., Hann, S.K., Kim, H.I., Kim, N.S. & Park, Y.K. (1994)** Biologic characteristics of cultured human vitiligo melanocytes. *Int J Dermatol*, 33, 556-562.
- Ito, S. (2003)** The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res*, 16, 230-236.
- Iyengar, B., Misra, R.S. & Subalakshmi. (1995)** ACTH acts directly on melanocytes to stimulate melanogenesis--an in vitro study. *Indian J Pathol Microbiol*, 38, 399-402.
- Jimbow, K., Chen, H., Park, J.S. & Thomas, P.D. (2001)** Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *Br J Dermatol*, 144, 55-65.
- Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Esparza, M., Perez, C., Daum, N., Solano, F. & Garcia-Borron, J.C. (2001)** Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *J Cell Sci*, 114, 2335-2344.
- Kapas, S., Purbrick, A. & Hinson, J.P. (1995)** Role of tyrosine kinase and protein kinase C in the steroidogenic actions of angiotensin II, alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin in the rat adrenal cortex. *Biochem J*, 305 (Pt 2), 433-438.
- Kato, S., Ding, J. & Du, K. (2007)** Differential activation of CREB by Akt1 and Akt2. *Biochem Biophys Res Commun*, 354, 1061-1066.
- Kemp, E.H., Gavalas, N.G., Gawkrödger, D.J. & Weetman, A.P. (2007)** Autoantibody responses to melanocytes in the depigmenting skin disease vitiligo. *Autoimmun Rev*, 6, 138-142.
- Kemp, E.H., Gawkrödger, D.J., MacNeil, S., Watson, P.F. & Weetman, A.P. (1997a)** Detection of tyrosinase autoantibodies in patients with vitiligo using 35S-labeled recombinant human tyrosinase in a radioimmunoassay. *J Invest Dermatol*, 109, 69-73.
- Kemp, E.H., Gawkrödger, D.J., Watson, P.F. & Weetman, A.P. (1997b)** Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). *Clin Exp Immunol*, 109, 495-500.
- Kemp, E.H., Gawkrödger, D.J., Watson, P.F. & Weetman, A.P. (1998a)** Autoantibodies to human melanocyte-specific protein pmel17 in the sera of vitiligo patients: a sensitive and quantitative radioimmunoassay (RIA). *Clin Exp Immunol*, 114, 333-338.
- Kemp, E.H., Waterman, E.A., Gawkrödger, D.J., Watson, P.F. & Weetman, A.P. (1998b)** Autoantibodies to tyrosinase-related protein-1 detected in the sera of vitiligo patients using a quantitative radiobinding assay. *Br J Dermatol*, 139, 798-805.
- Khaled, M., Larribere, L., Bille, K., Ortonne, J.P., Ballotti, R. & Bertolotto, C. (2003)** Microphthalmia associated transcription factor is a target of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *J Invest Dermatol*, 121, 831-836.
- Kim, D.S., Kim, S.Y., Lee, J.E., Kwon, S.B., Joo, Y.H., Youn, S.W. & Park, K.C. (2003)** Sphingosine-1-phosphate-induced ERK activation protects human melanocytes from UVB-induced apoptosis. *Arch Pharm Res*, 26, 739-746.
- Kim, J.H., Kiefer, L.L., Woychik, R.P., Wilkison, W.O., Truesdale, A., Ittoop, O., Willard, D., Nichols, J. & Zemel, M.B. (1997)** Agouti regulation of intracellular calcium: role of melanocortin receptors. *Am J Physiol*, 272, E379-384.
- Kitamura, R., Tsukamoto, K., Harada, K., Shimizu, A., Shimada, S., Kobayashi, T. & Imokawa, G. (2004)** Mechanisms underlying the dysfunction of melanocytes in vitiligo epidermis: role of SCF/KIT protein interactions and the downstream effector, MITF-M. *J Pathol*, 202, 463-475.
- Koca, R., Armutcu, F., Altinyazar, H.C. & Gurel, A. (2004)** Oxidant-antioxidant enzymes and lipid peroxidation in generalized vitiligo. *Clin Exp Dermatol*, 29, 406-409.
- Kohn, A.D., Barthel, A., Kovacina, K.S., Boge, A., Wallach, B., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., Scott, P.H., Lawrence, J.C., Jr. & Roth, R.A. (1998)** Construction and characterization of a conditionally active version of the serine/threonine kinase Akt. *J Biol Chem*, 273, 11937-11943.
- Kojima, I., Kojima, K. & Rasmussen, H. (1985)** Role of calcium and cAMP in the action of adrenocorticotropin on aldosterone secretion. *J Biol Chem*, 260, 4248-4256.
- Konda, Y., Gantz, I., DelValle, J., Shimoto, Y., Miwa, H. & Yamada, T. (1994)** Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J Biol Chem*, 269, 13162-13166.

- Kono, M., Nagata, H., Umemura, S., Kawana, S. & Osamura, R.Y. (2001)** In situ expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and proopiomelanocortin (POMC) genes in human skin. *Faseb J*, 15, 2297-2299.
- Kovacs, S.O. (1998)** Vitiligo. *J Am Acad Dermatol*, 38, 647-666; quiz 667-648.
- Krude, H., Biebermann, H., Krohn, H.P., Dralle, H. & Gruters, A. (1997)** Congenital hyperthyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 105 Suppl 4, 6-11.
- Kruger-Krasagakes, S., Krasagakis, K., Garbe, C. & Diamantstein, T. (1995)** Production of cytokines by human melanoma cells and melanocytes. *Recent Results Cancer Res*, 139, 155-168.
- Kurek, D., Garinis, G.A., van Doorninck, J.H., van der Wees, J. & Grosveld, F.G. (2007)** Transcriptome and phenotypic analysis reveals Gata3-dependent signalling pathways in murine hair follicles. *Development*, 134, 261-272.
- Laberge, G., Mailloux, C.M., Gowan, K., Holland, P., Bennett, D.C., Fain, P.R. & Spritz, R.A. (2005)** Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. *Pigment Cell Res*, 18, 300-305.
- Lane, H.A., Fernandez, A., Lamb, N.J. & Thomas, G. (1993)** p70s6k function is essential for G1 progression. *Nature*, 363, 170-172.
- Larribere, L., Hilmi, C., Khaled, M., Gaggioli, C., Bille, K., Auberger, P., Ortonne, J.P., Ballotti, R. & Bertolotto, C. (2005)** The cleavage of microphthalmia-associated transcription factor, MITF, by caspases plays an essential role in melanocyte and melanoma cell apoptosis. *Genes Dev*, 19, 1980-1985.
- Larue, L. & Delmas, V. (2006)** The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front Biosci*, 11, 733-742.
- Le Poole, I.C., Das, P.K., van den Wijngaard, R.M., Bos, J.D. & Westerhof, W. (1993a)** Review of the etiopathomechanism of vitiligo: a convergence theory. *Exp Dermatol*, 2, 145-153.
- Le Poole, I.C., Mutis, T., van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W., Ottenhoff, T., de Vries, R.R. & Das, P.K. (1993b)** A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *J Immunol*, 151, 7284-7292.
- Le Poole, I.C., van den Wijngaard, R.M., Smit, N.P., Oosting, J., Westerhof, W. & Pavel, S. (1994)** Catechol-O-methyltransferase in vitiligo. *Arch Dermatol Res*, 286, 81-86.
- Le Poole, I.C., van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W., Verkruisen, R.P., Dutrieux, R.P., Dingemans, K.P. & Das, P.K. (1993c)** Phagocytosis by normal human melanocytes in vitro. *Exp Cell Res*, 205, 388-395.
- Le Poole, I.C., Wankowicz-Kalinska, A., van den Wijngaard, R.M., Nickoloff, B.J. & Das, P.K. (2004)** Autoimmune aspects of depigmentation in vitiligo. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 9, 68-72.
- Lee, A.Y., Kim, N.H., Choi, W.I. & Youm, Y.H. (2005)** Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-blistered epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *J Invest Dermatol*, 124, 976-983.
- Lee, A.Y., Youm, Y.H., Kim, N.H., Yang, H. & Choi, W.I. (2004)** Keratinocytes in the depigmented epidermis of vitiligo are more vulnerable to trauma (suction) than keratinocytes in the normally pigmented epidermis, resulting in their apoptosis. *Br J Dermatol*, 151, 995-1003.
- Lepe, V., Moncada, B., Castanedo-Cazares, J.P., Torres-Alvarez, M.B., Ortiz, C.A. & Torres-Rubalcava, A.B. (2003)** A double-blind randomized trial of 0.1% tacrolimus vs 0.05% clobetasol for the treatment of childhood vitiligo. *Arch Dermatol*, 139, 581-585.
- Levy, C., Khaled, M. & Fisher, D.E. (2006)** MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med*, 12, 406-414.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. Dec;25(4):402-8.
- Luger, T.A., Scholzen, T.E., Brzoska, T. & Bohm, M. (2003)** New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann N Y Acad Sci*, 994, 133-140.
- Maneechotesuwan, K., Xin, Y., Ito, K., Jazrawi, E., Lee, K.Y., Usmani, O.S., Barnes, P.J. & Adcock, I.M. (2007)** Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J Immunol*, 178, 2491-2498.
- Manga, P., Sheyn, D., Yang, F., Sarangarajan, R. & Boissy, R.E. (2006)** A role for tyrosinase-related protein 1 in 4-tert-butylphenol-induced toxicity in melanocytes: Implications for vitiligo. *Am J Pathol*, 169, 1652-1662.
- Maresca, V., Roccella, M., Roccella, F., Camera, E., Del Porto, G., Passi, S., Grammatico, P. & Picardo, M. (1997)** Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. *J Invest Dermatol*, 109, 310-313.

- Martelli, A.M., Nyakern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P.L., Evangelisti, C. & Cocco, L. (2006)** Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 20, 911-928.
- Mathias, C.G., Maibach, H.I. & Conant, M.A. (1980)** Perioral leukoderma simulating vitiligo from use of a toothpaste containing cinnamic aldehyde. *Arch Dermatol*, 116, 1172-1173.
- McGill, G.G., Horstmann, M., Widlund, H.R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E.K., Lin, Y.L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.F., Jordan, S.A., Jackson, I.J., Korsmeyer, S.J., Golub, T.R. & Fisher, D.E. (2002)** Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*, 109, 707-718.
- Merimsky, O., Shoenfeld, Y., Baharav, E., Zigelman, R. & Fishman, P. (1996)** Reactivity to tyrosinase: expression in cancer (melanoma) and autoimmunity (vitiligo). *Hum Antibodies Hybridomas*, 7, 151-156.
- Mittelstadt, P.R., Salvador, J.M., Fornace, A.J., Jr. & Ashwell, J.D. (2005)** Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle*, 4, 1189-1192.
- Moellmann, G., Klein-Angerer, S., Scollay, D.A., Nordlund, J.J. & Lerner, A.B. (1982)** Extracellular granular material and degeneration of keratinocytes in the normally pigmented epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol*, 79, 321-330.
- Moretti, S., Spallanzani, A., Amato, L., Hautmann, G., Gallerani, I., Fabiani, M. & Fabbri, P. (2002)** New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. *Pigment Cell Res*, 15, 87-92.
- Morrone, A., Picardo, M., de Luca, C., Terminali, O., Passi, S. & Ippolito, F. (1992)** Catecholamines and vitiligo. *Pigment Cell Res*, 5, 65-69.
- Motokawa, T., Kato, T., Hashimoto, Y. & Katagiri, T. (2007)** Effect of Val92Met and Arg163Gln variants of the MC1R gene on freckles and solar lentigines in Japanese. *Pigment Cell Res*, 20, 140-143.
- Mountjoy, K.G., Kong, P.L., Taylor, J.A., Willard, D.H. & Wilkison, W.O. (2001)** Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells. *Physiol Genomics*, 5, 11-19.
- Moustafa, M., Szabo, M., Ghanem, G.E., Morandini, R., Kemp, E.H., MacNeil, S. & Haycock, J.W. (2002)** Inhibition of tumor necrosis factor-alpha stimulated NFkappaB/p65 in human keratinocytes by alpha-melanocyte stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone peptides. *J Invest Dermatol*, 119, 1244-1253.
- Na, G.Y., Lee, K.H., Kim, M.K., Lee, S.J., Kim, D.W. & Kim, J.C. (2003)** Polymorphisms in the melanocortin-1 receptor (MC1R) and agouti signaling protein (ASIP) genes in Korean vitiligo patients. *Pigment Cell Res*, 16, 383-387.
- Naeyaert, J.M., Eller, M., Gordon, P.R., Park, H.Y. & Gilchrest, B.A. (1991)** Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br J Dermatol*, 125, 297-303.
- Newman, E.A., Chai, B.X., Zhang, W., Li, J.Y., Ammori, J.B. & Mulholland, M.W. (2006)** Activation of the melanocortin-4 receptor mobilizes intracellular free calcium in immortalized hypothalamic neurons. *J Surg Res*, 132, 201-207.
- Njoo, M.D., Spuls, P.I., Bos, J.D., Westerhof, W. & Bossuyt, P.M. (1998)** Nonsurgical repigmentation therapies in vitiligo. Meta-analysis of the literature. *Arch Dermatol*, 134, 1532-1540.
- Norris, D.A., Kissinger, R.M., Naughton, G.M. & Bystry, J.C. (1988)** Evidence for immunologic mechanisms in human vitiligo: patients' sera induce damage to human melanocytes in vitro by complement-mediated damage and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Invest Dermatol*, 90, 783-789.
- Ohguchi, K., Banno, Y., Nakagawa, Y., Akao, Y. & Nozawa, Y. (2005)** Negative regulation of melanogenesis by phospholipase D1 through mTOR/p70 S6 kinase 1 signaling in mouse B16 melanoma cells. *J Cell Physiol*, 205, 444-451.
- Oka, M., Nagai, H., Ando, H., Fukunaga, M., Matsumura, M., Araki, K., Ogawa, W., Miki, T., Sakaue, M., Tsukamoto, K., Konishi, H., Kikkawa, U. & Ichihashi, M. (2000)** Regulation of melanogenesis through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human G361 melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 115, 699-703.
- Okamoto, T., Irie, R.F., Fujii, S., Huang, S.K., Nizze, A.J., Morton, D.L. & Hoon, D.S. (1998)** Anti-tyrosinase-related protein-2 immune response in vitiligo patients and melanoma patients receiving active-specific immunotherapy. *J Invest Dermatol*, 111, 1034-1039.
- Ongena, K., Van Geel, N. & Naeyaert, J.M. (2003)** Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res*, 16, 90-100.

- Overwijk, W.W. & Restifo, N.P. (2000)** Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the "self" to destroy the "other". *Crit Rev Immunol*, 20, 433-450.
- Oyarbide-Valencia, K., van den Boorn, J.G., Denman, C.J., Li, M., Carlson, J.M., Hernandez, C., Nishimura, M.I., Das, P.K., Luiten, R.M. & Le Poole, I.C. (2006)** Therapeutic implications of autoimmune vitiligo T cells. *Autoimmun Rev*, 5, 486-492.
- Pan, Z.Z., Devaux, Y. & Ray, P. (2004)** Ribosomal S6 kinase as a mediator of keratinocyte growth factor-induced activation of Akt in epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 15, 3106-3113.
- Park, H.Y. & Gilchrist, B.A. (2002)** More on MITF. *J Invest Dermatol*, 119, 1218-1219.
- Park, H.Y., Lee, J., Gonzalez, S., Middelkamp-Hup, M.A., Kapasi, S., Peterson, S. & Gilchrist, B.A. (2004)** Topical application of a protein kinase C inhibitor reduces skin and hair pigmentation. *J Invest Dermatol*, 122, 159-166.
- Park, H.Y., Russakovsky, V., Ohno, S. & Gilchrist, B.A. (1993)** The beta isoform of protein kinase C stimulates human melanogenesis by activating tyrosinase in pigment cells. *J Biol Chem*, 268, 11742-11749.
- Park, H.Y., Wu, C., Yonemoto, L., Murphy-Smith, M., Wu, H., Stachur, C.M. & Gilchrist, B.A. (2006)** MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes. *Biochem J*, 395, 571-578.
- Parsad, D., Saini, R. & Verma, N. (1998)** Combination of PUVA-sol and topical calcipotriol in vitiligo. *Dermatology*, 197, 167-170.
- Phillips, J., Gawkrödger, D.J., Caddy, C.M., Hedley, S., Dawson, R.A., Smith-Thomas, L., Freedlander, E. & Mac Neil, S. (2001)** Keratinocytes suppress TRP-1 expression and reduce cell number of co-cultured melanocytes - implications for grafting of patients with vitiligo. *Pigment Cell Res*, 14, 116-125.
- Picardi, A., Pasquini, P., Cattaruzza, M.S., Gaetano, P., Melchi, C.F., Baliva, G., Camaioni, D., Tiago, A., Abeni, D. & Biondi, M. (2003)** Stressful life events, social support, attachment security and alexithymia in vitiligo. A case-control study. *Psychother Psychosom*, 72, 150-158.
- Pichler, R., Sfetsos, K., Badics, B., Gutenbrunner, S. & Aubock, J. (2006)** Vitiligo patients present lower plasma levels of alpha-melanotropin immunoreactivities. *Neuropeptides*, 40, 177-183.
- Plettenberg, A., Ballaun, C., Pammer, J., Mildner, M., Strunk, D., Weninger, W. & Tschachler, E. (1995)** Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *Am J Pathol*, 146, 651-659.
- Punnonen, K. & Yuspa, S.H. (1992)** Ultraviolet light irradiation increases cellular diacylglycerol and induces translocation of diacylglycerol kinase in murine keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 99, 221-226.
- Puri, N., Mojamdar, M. & Ramaiah, A. (1987)** In vitro growth characteristics of melanocytes obtained from adult normal and vitiligo subjects. *J Invest Dermatol*, 88, 434-438.
- Puri, N., Mojamdar, M. & Ramaiah, A. (1989)** Growth defects of melanocytes in culture from vitiligo subjects are spontaneously corrected in vivo in repigmenting subjects and can be partially corrected by the addition of fibroblast-derived growth factors in vitro. *Arch Dermatol Res*, 281, 178-184.
- Raffin-Sanson, M.L., de Keyser, Y. & Bertagna, X. (2003)** Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Eur J Endocrinol*, 149, 79-90.
- Ramos, A.M., Fernandez, C., Amran, D., Sancho, P., de Blas, E. & Aller, P. (2005)** Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells. *Blood*, 105, 4013-4020.
- Roberts, D.W., Newton, R.A., Beaumont, K.A., Helen Leonard, J. & Sturm, R.A. (2006)** Quantitative analysis of MC1R gene expression in human skin cell cultures. *Pigment Cell Res*, 19, 76-89.
- Rousseau, K., Kauser, S., Pritchard, L.E., Warhurst, A., Oliver, R.L., Slominski, A., Wei, E.T., Thody, A.J., Tobin, D.J. & White, A. (2007)** Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *Faseb J*.
- Rouzaud, F. & Hearing, V.J. (2005)** Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. *Peptides*, 26, 1858-1870.
- Saha, B., Singh, S.K., Sarkar, C., Bera, R., Ratha, J., Tobin, D.J. & Bhadra, R. (2006)** Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. *Pigment Cell Res*, 19, 595-605.

- Saito, H., Yasumoto, K., Takeda, K., Takahashi, K., Fukuzaki, A., Orikasa, S. & Shibahara, S. (2002)** Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1. *J Biol Chem*, 277, 28787-28794.
- Saito, H., Yasumoto, K., Takeda, K., Takahashi, K., Yamamoto, H. & Shibahara, S. (2003)** Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway. *Pigment Cell Res*, 16, 261-265.
- Sakai, C., Kawakami, Y., Law, L.W., Furumura, M. & Hearing, V.J., Jr. (1997)** Melanosomal proteins as melanoma-specific immune targets. *Melanoma Res*, 7, 83-95.
- Sasaki, M., Horikoshi, T., Uchiwa, H. & Miyachi, Y. (2000)** Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Res*, 13, 248-252.
- Sassone-Corsi, P. (1998)** Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol*, 30, 27-38.
- Schallreuter, K.U., Moore, J., Tobin, D.J., Gibbons, N.J., Marshall, H.S., Jenner, T., Beazley, W.D. & Wood, J.M. (1999a)** alpha-MSH can control the essential cofactor 6-tetrahydrobiopterin in melanogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 329-341.
- Schallreuter, K.U., Moore, J., Wood, J.M., Beazley, W.D., Gaze, D.C., Tobin, D.J., Marshall, H.S., Panske, A., Panzig, E. & Hibberts, N.A. (1999b)** In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 4, 91-96.
- Schallreuter, K.U., Moore, J., Wood, J.M., Beazley, W.D., Peters, E.M., Marles, L.K., Behrens-Williams, S.C., Dummer, R., Blau, N. & Thony, B. (2001)** Epidermal H(2)O(2) accumulation alters tetrahydrobiopterin (6BH4) recycling in vitiligo: identification of a general mechanism in regulation of all 6BH4-dependent processes? *J Invest Dermatol*, 116, 167-174.
- Schwahn, D.J., Timchenko, N.A., Shibahara, S. & Medrano, E.E. (2005)** Dynamic regulation of the human dopachrome tautomerase promoter by MITF, ER-alpha and chromatin remodelers during proliferation and senescence of human melanocytes. *Pigment Cell Res*, 18, 203-213.
- Scott, G., Cassidy, L. & Abdel-Malek, Z. (1997)** Alpha-melanocyte-stimulating hormone and endothelin-1 have opposing effects on melanocyte adhesion, migration, and pp125FAK phosphorylation. *Exp Cell Res*, 237, 19-28.
- Scott, M.C., Suzuki, I. & Abdel-Malek, Z.A. (2002)** Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res*, 15, 433-439.
- Seiffert, K. & Granstein, R.D. (2006)** Neuroendocrine regulation of skin dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1088, 195-206.
- Sharquie, K.E., Mehenna, S.H., Naji, A.A. & Al-Azzawi, H. (2004)** Inflammatory changes in vitiligo: stage I and II depigmentation. *Am J Dermatopathol*, 26, 108-112.
- Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S. & Wortsman, J. (2004)** Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*, 84, 1155-1228.
- Slominski, A., Wortsman, J., Luger, T., Paus, R. & Solomon, S. (2000)** Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev*, 80, 979-1020.
- Smalley, K. & Eisen, T. (2000)** The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett*, 476, 198-202.
- Smalley, K.S. & Eisen, T.G. (2002)** Differentiation of human melanoma cells through p38 MAP kinase is associated with decreased retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle arrest. *Melanoma Res*, 12, 187-192.
- Song, Y.H., Connor, E., Li, Y., Zorovich, B., Balducci, P. & Maclaren, N. (1994)** The role of tyrosinase in autoimmune vitiligo. *Lancet*, 344, 1049-1052.
- Spencer, J.D., Gibbons, N.C., Rokos, H., Peters, E.M., Wood, J.M. & Schallreuter, K.U. (2007)** Oxidative stress via hydrogen peroxide affects proopiomelanocortin peptides directly in the epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol*, 127, 411-420.
- Steitz, J., Wenzel, J., Gaffal, E. & Tuting, T. (2004)** Initiation and regulation of CD8+T cells recognizing melanocytic antigens in the epidermis: implications for the pathophysiology of vitiligo. *Eur J Cell Biol*, 83, 797-803.
- Stokes, A.H., Hastings, T.G. & Vrana, K.E. (1999)** Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res*, 55, 659-665.

- Sukhanov, V.A., Voronkova, I.M., Shvets, S.V., Dyakov, V.L. & Morozova, L.F. (1991)** Melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) inhibits the growth of human malignant melanoma cells with the induction of phosphatidyl inositol and myo-inositol phosphate levels. *Biochem Int*, 24, 625-632.
- Suzuki, I., Cone, R.D., Im, S., Nordlund, J. & Abdel-Malek, Z.A. (1996)** Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology*, 137, 1627-1633.
- Zbytek, B., Wortsman, J. & Slominski, A. (2006)** Characterization of a ultraviolet B-induced corticotropin-releasing hormone-proopiomelanocortin system in human melanocytes. *Mol Endocrinol*, 20, 2539-2547.
- Zemel, M.B., Kim, J.H., Woychik, R.P., Michaud, E.J., Kadwell, S.H., Patel, I.R. & Wilkison, W.O. (1995)** Agouti regulation of intracellular calcium: role in the insulin resistance of viable yellow mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4733-4737.
- Zinkel, S., Gross, A. & Yang, E. (2006)** BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*, 13, 1351-1359.
- Tachibana, M., Takeda, K., Nobukuni, Y., Urabe, K., Long, J.E., Meyers, K.A., Aaronson, S.A. & Miki, T. (1996)** Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat Genet*, 14, 50-54.
- Taylor, A.W., Kitaichi, N. & Biros, D. (2006)** Melanocortin 5 receptor and ocular immunity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 52, 53-59.
- Thody, A.J. (1999)** alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 217-229.
- Thody, A.J. & Graham, A. (1998)** Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res*, 11, 265-274.
- Thompson, J.E. & Thompson, C.B. (2004)** Putting the rap on Akt. *J Clin Oncol*, 22, 4217-4226.
- Tsatmali, M., Ancans, J., Yukitake, J. & Thody, A.J. (2000a)** Skin POMC peptides: their actions at the human MC-1 receptor and roles in the tanning response. *Pigment Cell Res*, 13 Suppl 8, 125-129.
- Tsatmali, M., Graham, A., Szatkowski, D., Ancans, J., Manning, P., McNeil, C.J., Graham, A.M. & Thody, A.J. (2000b)** alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates nitric oxide production in melanocytes. *J Invest Dermatol*, 114, 520-526.
- Tsatmali, M., Yukitake, J. & Thody, A.J. (1999)** ACTH1-17 is a more potent agonist at the human MC1 receptor than alpha-MSH. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 45, 1029-1034.
- van den Wijngaard, R., Wankowicz-Kalinska, A., Le Poole, C., Tigges, B., Westerhof, W. & Das, P. (2000a)** Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. *Lab Invest*, 80, 1299-1309.
- van den Wijngaard, R.M., Aten, J., Scheepmaker, A., Le Poole, I.C., Tigges, A.J., Westerhof, W. & Das, P.K. (2000b)** Expression and modulation of apoptosis regulatory molecules in human melanocytes: significance in vitiligo. *Br J Dermatol*, 143, 573-581.
- Van Laethem, A., Van Kelst, S., Lippens, S., Declercq, W., Vandenabeele, P., Janssens, S., Vandenheede, J.R., Garmyn, M. & Agostinis, P. (2004)** Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *Faseb J*, 18, 1946-1948.
- Wankowicz-Kalinska, A., van den Wijngaard, R.M., Tigges, B.J., Westerhof, W., Ogg, G.S., Cerundolo, V., Storkus, W.J. & Das, P.K. (2003)** Immunopolarization of CD4+ and CD8+ T cells to Type-1-like is associated with melanocyte loss in human vitiligo. *Lab Invest*, 83, 683-695.
- Wintzen, M., Yaar, M., Burbach, J.P. & Gilchrist, B.A. (1996)** Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 106, 673-678.
- Voisey, J. & van Daal, A. (2002)** Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Res*, 15, 10-18.
- Vongs, A., Lynn, N.M. & Rosenblum, C.I. (2004)** Activation of MAP kinase by MC4-R through PI3 kinase. *Regul Pept*, 120, 113-118.
- Wood, J.M., Gibbons, N.C. & Schallreuter, K.U. (2006)** Melanocortins in human melanocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 52, 75-78.
- Voulot, C. & Ortonne, J.P. (1975)** The tyrosinases of normal and diseased human skin (naevi, malignant melanoma, vitiligo). *Arch Dermatol Res*, 254, 205-214.
- Wu, C.S., Yu, H.S., Chang, H.R., Yu, C.L., Yu, C.L. & Wu, B.N. (2000)** Cutaneous blood flow and adrenoceptor response increase in segmental-type vitiligo lesions. *J Dermatol Sci*, 23, 53-62.

- Wymann, M.P. & Pirola, L. (1998)** Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1436, 127-150.
- Xue, B.Z., Wilkison, W.O., Mynatt, R.L., Moustaid, N., Goldman, M. & Zemel, M.B. (1999)** The agouti gene product stimulates pancreatic [beta]-cell Ca²⁺ signaling and insulin release. *Physiol Genomics*, 1, 11-19.
- Yang, Y.K., Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Dickinson, C., Yamada, T., Barsh, G.S. & Gantz, I. (1997)** Effects of recombinant agouti-signaling protein on melanocortin action. *Mol Endocrinol*, 11, 274-280.
- Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., Watanabe, K., Takahashi, K. & Shibahara, S. (2002)** Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *Embo J*, 21, 2703-2714.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Takahashi, K., Tomita, Y. & Shibahara, S. (1997)** Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J Biol Chem*, 272, 503-509.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B. & Hochgeschwender, U. (1999)** Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med*, 5, 1066-1070.