

# Odmłodzenie wzorca ekspresji genów starzejącej się skóry człowieka za pomocą fototerapii szerokopasmowej: badanie pilotażowe

Anne Lynn S. Chang<sup>1</sup>, Patrick H. Bitter Jr<sup>2</sup>, Kun Qu<sup>1</sup>, Meihong Lin<sup>1</sup>, Nicole A. Rapicavoli<sup>1,3</sup> i Howard Y. Chang<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Dermatology, Stanford University School of Medicine, Redwood City, California, USA;

<sup>2</sup> Advanced Aesthetic Dermatology, Los Gatos, California, USA i <sup>3</sup> Howard Hughes Medical Institute, Stanford, California, USA

Badanie to było zaakceptowane jako prezentacja plakatu w 2012 roku podczas dorocznego spotkania Society of Investigative Dermatology. Adres do korespondencji: Anne Lynn S. Chang, Department of Dermatology, Stanford University School of Medicine, 450 Broadway Street, MC 5334, Redwood City, California 94063, USA.

E-mail: alschang@stanford.edu

Skróty: BBL, broadband light (światło szerokopasmowe); GO, gene ontology (ontologia genowa); lncRNA, long noncoding RNA (długie niekodujące RNA); polyA, poliadenylowane; qRT-PCR, quantitative reverse transcription-PCR (ilościowa PCR z odwróconą transkrypcją); RG, rejuvenated gene (odmłodzony gen); 3-seq, sekwencjonowanie 3'-końcowe w ilościowej ocenie ekspresji

Otrzymano 19 lutego 2012, Sprawdzono 19 czerwca 2012, Zaakceptowano 11 lipca 2012

Wyniki badań przeprowadzonych na modelowych organizmach sugerują, że jest możliwe funkcjonalne odmłodzenie starzejących się komórek, ale kwestia, czy koncepcja ta dotyczy również skóry człowieka, jest niejasna. W niniejszym badaniu zastosowaliśmy sekwencjonowanie 3'-końcowe w celu oceny ilościowej ekspresji („3-seq”), aby poznać program ekspresji genów, związany z procesem fotostarzenia u człowieka oraz proces starzenia endogennego (co wspólnie określa się terminem „starzenie się skóry”) oraz wpływ, jaki wywiera fototerapia szerokopasmowa (ang. BBL – broadband treatment).

Stwierdziliśmy, że starzenie się skóry wiązało się z wyraźnym zmienionym poziomem ekspresji 2 265 kodujących i niekodujących obszarów RNA, spośród których w 1293 potwierdzono efekt „rejuwenacji” po leczeniu metodą BBL, tzn. stały się bardziej podobne do poziomu ekspresji w młodej skórze. Odmłodzone geny (ang. RGs – rejuvenated genes) posiadały kilka znanych, kluczowych regulatorów długowieczności organizmów żywych i proksymalne, długie niekodujące odcinki RNA. Starzenie się skóry nie jest związane z systematycznymi zmianami w przetwarzaniu 3'-końcowego odcinka mRNA.

Z tego względu terapia metodą BBL może odtworzyć wzorzec ekspresji genowej skóry ulegającej fotostarzeniu

i starzeniu endogennemu w sposób zbliżony do młodej skóry.

Poza tym uzyskane przez nas dane wykazały istnienie wcześniej nieopisywanych celów, które mogą zmienić poglądy na proces starzenia się skóry u człowieka.

## Wstęp

Starzenie się jest procesem znajdującym się pod złożoną kontrolą czynników genetycznych i środowiskowych. Starzenie się jest związane z zakrojonymi na dużą skalę zmianami w ekspresji genów, a to, w jaki sposób takie zmiany mogą być modulowane w celu uzyskania korzyści natury zdrowotnej, nie jest sprawą jasną. Zidentyfikowano liczne mutacje pojedynczych genów, które mogą wydłużyć długość życia modelowych organizmów (Partridge, 2010; de Magalhaes i wsp., 2012), a ograniczenia natury dietetycznej mogą spowolnić tempo procesu starzenia, nawet jeżeli zastosuje się je w późniejszym okresie życia (Partridge, 2010). W ostatnim czasie potwierdzono, że pewne interwencje przywracają młodzieńcze cechy starzejącym się komórkom lub tkankom, cechującym się wyraźną plastycznością procesu starzenia. Na przykład heterochroniczna parabioza młodych i starych myszy

umożliwia czynnikom krążeniowym odtworzenie funkcji starzejących się komórek macierzystych mięśni (Liu i Rando, 2011). W podobny sposób, indukowalna blokada transkrypcji NF- $\kappa$ B w starzejącym się naskórku myszy może zahamować proces starzenia się komórek i przywrócić globalny program ekspresji genów starej skóry, tak aby był zbliżony do skóry młodej (Adler i wsp. 2007). Ważną kwestią jest, czy podobne zjawisko plastyczności obecne jest również w komórkach skóry ludzkiej, w której proces starzenia przebiega na przestrzeni dziesięcioleci, a nie miesięcy czy lat, jak w przypadku modelowych organizmów. Najważniejszym wyzwaniem jest zdefiniowanie klinicznie istotnych strategii umożliwiających odblokowanie plastyczności procesu starzenia się u ludzi.

Idealną technologią, umożliwiającą sprawdzenie tej koncepcji, jest fototerapia szerokopasmowa (BBL), znana również jako intensywne światło pulsacyjne, będąca powszechnie dostępną i popularną metodą terapeutyczną w rejuwenacji skóry. Zgodnie z danymi Amerykańskiego Towarzystwa Estetycznej Chirurgii Plastycznej (ang. *American Society for Aesthetic Plastic Surgery*), na te procedury w 2009 roku w USA przeznaczono ponad 215 milionów USD. Inaczej niż w przypadku zabiegów wykorzystujących źródła światła, które poprawiają ogólny wygląd starzejącej się skóry w wyniku termicznej destrukcji i regeneracji naskórka i powierzchniowej warstwy skóry właściwej, w metodzie BBL wykorzystuje się szerokopasmowe, niekoherentne promieniowanie świetlne, w spektrum od 560 do 1200 nm, które jest absorbowane przez wiele elementów skóry. Aktualnie procedury BBL stosowane są do poprawy wyglądu drobnych zmarszczek, dyspigmentacji, rumienia i elastozy (Bitter Jr, 2000; Negishi i wsp., 2001). Tym niemniej zmiany molekularne, do których dochodzi pod wpływem tej formy terapii, nie są do końca jasne.

„Odmłodzenie” (rejuwenacja) jest pojęciem stosowanym przez wielu naukowców oraz laików, z różnym znaczeniem i z tego względu powinno być ono dokładnie zdefiniowane. W niniejszej pracy odmłodzenie (lub rejuwenację) definiujemy jako odtworzenie charakterystycznych cech stanu młodości w przypadku starzejących się komórek i tkanek. Czy po leczeniu metodą BBL skóra zostaje rzeczywiście odmłodzona na poziomie molekularnym, tzn. czy przypomina bardziej młodą skórę, czy też jest metodą leczniczą, która jedynie indukuje odpowiedź w postaci bliznowacenia lub gojenia, która zasadniczo różni się od nieszkodzonej młodej skóry?

Na poziomie histologicznym BBL zmniejsza odkładanie melaniny w skórze właściwej i redukuje teleangiektazje (Bitter Jr, 2000; Prieto i wsp., 2002), a w niektórych doniesieniach opisywano również, że dochodzi do nasilenia produkcji kolagenu w górnej części warstwy brodawkowatej skóry właściwej po upływie 3 tygodni od leczenia (Negishi i wsp., 2001). Jednakże proces produkcji nowego kolagenu może być różnie nasilonym lub krótkotrwałym efektem, jako że w ultrastrukturalnej analizie skóry po

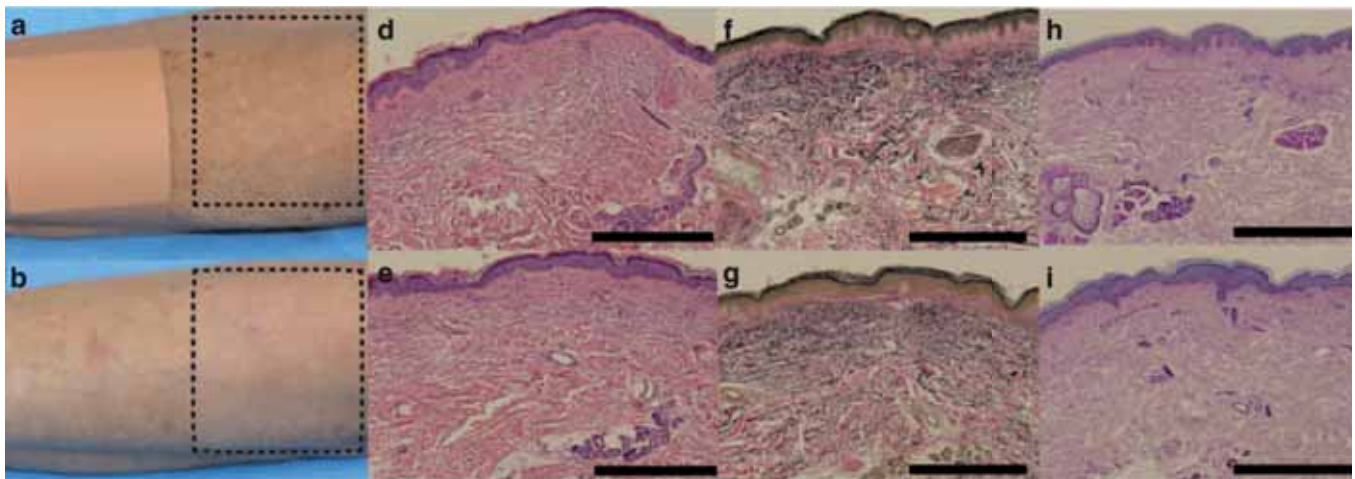
upływie 3 miesięcy od zabiegu nie potwierdzono żadnego efektu w postaci produkcji kolagenu lub elastyny (Prieto i wsp. 2002). W niniejszym badaniu ocenialiśmy podstawy molekularne reakcji na terapię BBL, definiując globalne programy ekspresji genowej skóry ludzkiej z objawami fotostarzenia i starzenia endogennego oraz odpowiedź na terapię BBL. Naszym zamiarem było uchwycenie jak najszerszego spektrum zmian w RNA wywołanych pod wpływem starzenia i BBL, w tym zmian w ekspresji genów (kodujących i niekodujących) i regulacji genowej.

## WYNIKI

### Kliniczne i histologiczne zmiany po terapii BBL

Aby dokładnie ocenić program ekspresji genów związany ze starzeniem się skóry i terapią BBL, wykorzystaliśmy bioptaty skóry pochodzące od młodych ochotniczek (wiek < 30 r.ż., n = 5) oraz odpowiadające miejscom skóry poddanej leczeniu i nieleczonych pochodzących od ochotniczek w starszym wieku (wiek > 50 r.ż., n = 5), które wykonywano po trzech cyklach BBL powtarzanej co miesiąc (n = 5; rycina 1a). Osoby poddane leczeniu były to zdrowe kobiety w starszym wieku z umiarkowanymi do ciężkich objawami fotostarzenia skóry przedramion, zamieszkałe w Santa Clara lub San Jose, w obszarze miejskim w Kalifornii, w którym średnio jest 257 słonecznych dni z 365 dni w roku, a średni indeks UV wynosi 5,1 (średnia wartość indeksu UV w USA wynosi 4,3; źródło: [www.bestplaces.net](http://www.bestplaces.net), dane z 25 kwietnia 2012). Na okres 1 miesiąca przed włączeniem do badania oraz w trakcie badania zakazano korzystania z solariów, miejscowych retinoidów i jakichkolwiek innych form terapii w obrębie skóry ramion. W trakcie badania, osoby uczestniczące zostały pouczone, aby stosowały ochronę skóry ramion przed promieniowaniem słonecznym za pomocą filtrów przeciwsłonecznych o szerokim spektrum oraz nosząc odzież z długimi rękawami, jak również unikając zbyt długiej ekspozycji na promieniowanie słoneczne. W przypadku młodych osób, u których nie stosowano leczenia, wykorzystywano te same kryteria włączenia do badania, ale nie potwierdzono obecności objawów starzenia na skórze ramion.

Po zabiegach BBL, skóra ramion cechowała się poprawą w ocenie klinicznej dotyczącej parametrów starzenia endogennego i zewnętrznego skóry: drobne zmarszczki (P = 0,03), nieprawidłowa pigmentacja (P = 0,02) oraz globalna ocena starzenia się skóry (P = 0,01; rycina 1 a-c). W ocenie histologicznej stwierdzono, że włókna elastyczne w próbkach pochodzących od osób leczonych w podeszłym wieku były rzadsze i mniej wyraźne w porównaniu z włóknami elastycznymi w próbkach od osób nieleczonych w podeszłym wieku (rycina 1 d-g). Barwienie metodą PAS wykazało, że nie dochodzi do wyraźnych zmian w ilości kolagenu w skórze właściwej w próbkach pochodzących od osób leczonych i nieleczonych w star-



Parametr kliniczny	Bez leczenia (n=5) Średni wynik (SD)	Z leczeniem (n=5) Średni wynik (SD)	P
Drobne zmarszczki	3,2 (1,3)	1,0 (1,0)	0,02
Grube zmarszczki	0 (0)	1,8 (2,5)	0,18
Nieprawidłowa pigmentacja	7,2 (1,3)	3,4 (2,3)	0,02
Ocena globalna	6,6 (1,1)	3,4 (1,5)	0,01

Rycina 1. Kliniczne i histologiczne działanie fototerapii światłem szerokopasmowym (BBL).

- (a) Ramię 73-letniej kobiety przed terapią BBL (ramka oznacza obszar przeznaczony do terapii, a opatrunek oznacza nieleczoną skórę).
- (b) To samo przedramię po trzech zabiegach BBL ze zredukowanymi drobnymi zmarszczkami, hiperpigmentacją i rumieniem w obszarze poddanym zabiegowi (ramka z przerywaną linią) w porównaniu z obszarem nieleczonym.
- (c) Parametry starzenia się skóry cechują się istotną redukcją drobnych zmarszczek, nieprawidłowej pigmentacji oraz poprawą globalnej oceny starzenia się skóry po terapii BBL. Wartość P na podstawie testu dwustronnego. Badanie histopatologiczne skóry przed zabiegiem BBL wykazało obecność elastozy (oryginalne powiększenie x200, barwienie H+E).
- (e) redukcja elastozy (oryginalne powiększenie x200, barwienie H+E) po terapii BBL.
- (f) Przed leczeniem elastozą jest wyraźna (oryginalne powiększenie x 200, barwienie von Giesen).
- (g) Po leczeniu elastozą jest mniej wyraźna (oryginalne powiększenie x 200, barwienie von Giesen).
- (h) Przed leczeniem, włókna kolagenowe sprawiają wrażenie osłabionych i nieuporządkowanych (powiększenie oryginalne x 200, barwienie PAS).
- (i) Po leczeniu włókna kolagenowe są bardziej jednorodne (powiększenie oryginalne x 200, barwienie PAS). Podziałka = 1 mm.

szym wieku, ale miały mniej chaotyczny układ po leczeniu BBL (rycina 1h i i). Próbkę pochodzące od starszych osób poddanych leczeniu również cechowały się subiektywnym zwiększeniem grubości naskórka (rycina 1e, g i i) w porównaniu z próbkami nieleczonych osób w starszym wieku (rycina 1d, f i h).

### Program ekspresji kodującego i niekodującego RNA w starzejącej się skórze

Mimo, że programy ekspresji genów procesu starzenia badano wcześniej w wielu tkankach stosując metodę hybrydyzacji (*microarray hybridization*), my zastosowaliśmy 3'-końcowe sekwencjonowanie, służące do ilościowej oceny ekspresji (3-seq), która jest wydajną strategią głębokiego sekwencjonowania końców 3' RNA (Tariq i wsp. 2011).

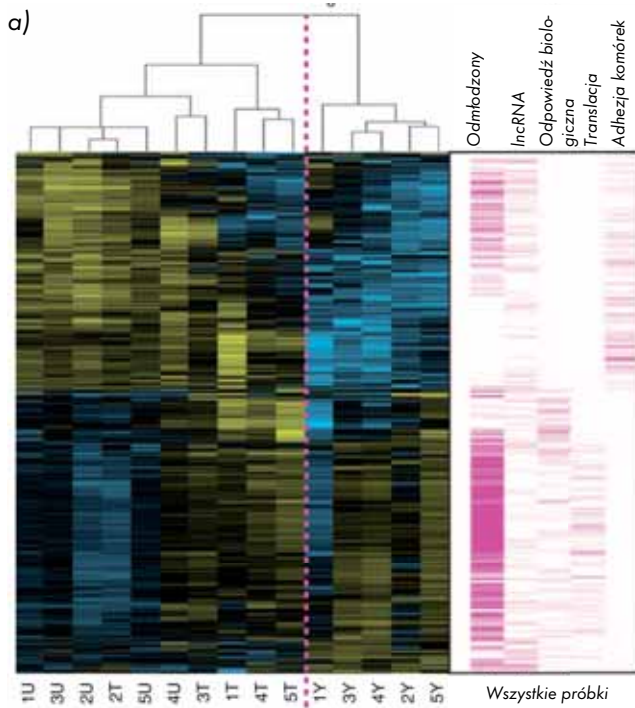
Do potencjalnych zalet metody 3-seq należy dokładna ocena ilościowa poziomu transkryptów nieukrytych przez hybrydyzację krzyżową, zdolność do określania zmian w terminacji i obróbce RNA oraz zdolność do odkrywania wcześniej niezaznaczonych genów, takich jak długie niekodujące RNAs (lncRNAs). Wygenerowaliśmy 6,5-12,4 milionów unikalnych mapowalnych odczytów dla każdej próbki oraz zidentyfikowano zróżnicowane transkrypty stosując algorytm DESeq (patrz: Materiały i Metody).

Aby w sposób szczegółowy zdefiniować proces starzenia w znaczeniu molekularnym, w pierwszej kolejności określiliśmy zmiany transkrypcji związane ze starzeniem, porównując próbki od młodych nieleczonych osób z próbkami od osób leczonych w podeszłym wieku, a następnie sprawdzono, w jaki sposób terapia BBL wpływa na te parametry.

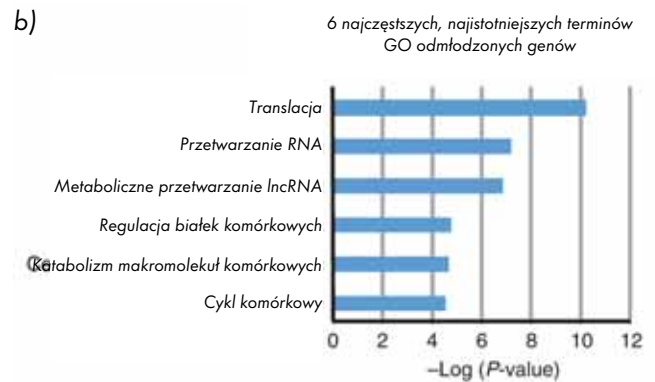
Porównanie poziomu transkrypcji w próbkach młodych osób niepoddanych leczeniu z osobami nieleczonymi w starszym wieku, jak również porównanie próbek od starszych nieleczonych osób z próbkami od osób leczonych w starszym wieku, wykazało wyraźną zmianę w poziomie ekspresji 3 530 genów (rycina 2a). Kierunkowość zmiany w ekspresji genu po terapii BBL przedstawiono na rycinie 2a, przy czym kolor niebieski wskazuje 2-krotny spadek, a

kolor żółty świadczy o 2-krotnym wzroście. Geny, których poziom transkrypcji zmienił się istotnie w porównaniu między nieleczonymi młodymi osobami a nieleczonymi starszymi pacjentami (n = 2 265) przedstawiono w Tabeli Uzupełniającej S1 w wersji online.

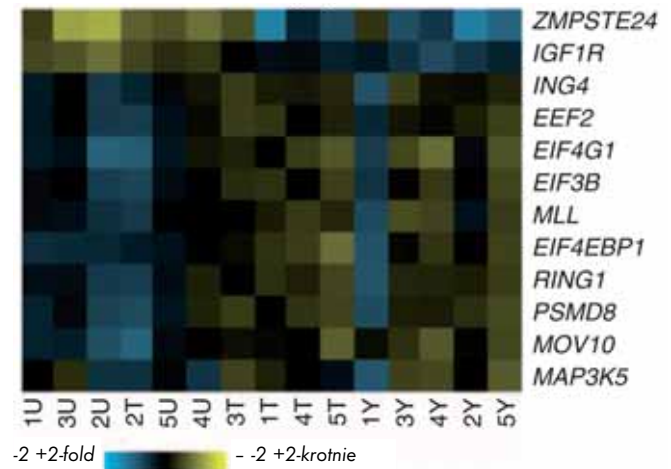
Aby wizualnie przedstawić lokalizację ważnych genów na dużej mapie „cieplnej” (ang. *heat map*), ułożyliśmy kolumny (w kolorze fukcji) po prawej stronie dużej



Ważne geny (n = 3530) spośród tych, które zmieniają się wraz z wiekiem oraz pod wpływem leczenia. Każdy gen (wiersz) na dużej mapie cieplnej odpowiada temu samemu genowi (wiersz) w przylegającej tabelce po stronie prawej, a kolor fukcji oznacza rozkład genów o znaczeniu biologicznym.



Przykłady odmłodzonych genów o znanej funkcji mającej związek ze starzeniem



Rycina 2. Wpływ fototerapii światłem szerokopasmowym (BBL) na kodujące i niekodujące RNA w starzejącej się skórze.

(a) Klastrowanie ekspresji genów w próbkach starzejącej się skóry jest umiarkowane między nieleczonymi młodymi i nieleczonymi starszymi próbkami. Przedstawiono poziom transkrypcji, który uległ istotnej zmianie w młodych nieleczonych próbkach w porównaniu z nieleczonymi starszymi próbkami, jak również w starych nieleczonych w porównaniu do starych leczonych próbek (n = 3530 wszystkich transkryptów). Kolumny oznaczają próbkę od pojedynczego pacjenta, a wiersze wskazują geny. T, starsze próbki, leczone. U, starsze próbki, nielezione. Y, młode próbki nielezione. Kolumny w kolorze fukcji w sposób obrazowy przedstawiają rozkład genów na dużej mapie cieplnej (po stronie lewej), pogrupowanie jest zgodne z funkcją biologiczną. Na przykład, geny związane z „odpowiedzią immunologiczną” i „translacją” znajdują się w dolnej połowie mapy cieplnej, a kolor żółty oznacza podwyższony poziom w grupach starszych leczonych i młodych nieleczonych. Odpowiadająca lokalizacja na dużej mapie cieplnej dotycząca odpowiedzi immunologicznej i translacji jest zaznaczona kolorem niebieskim (obniżenie) w grupie starszej niepoddanej leczeniu. Dystrybucja odmłodzonych genów na dużej mapie cieplnej (RGs; n = 1293 „długie niekodujące RNA” (lncRNAs) przedstawiono odpowiednio w pierwszej i drugiej kolumnie w kolorze fukcji.

(b) Najczęstszych sześć terminów ontologii genowej (GO) wśród RGs.

(c) Przykłady RGs o znanej funkcji mającej związek ze starzeniem się.



mapy cieplnej, reprezentujące funkcje biologiczne, zgodnie z zasadami ontologii genowej (ang. GO - Gene Ontology). Na przykład odmłodzone geny (RGs) i lncRNAs znajdują się zarówno w górnych, jak i dolnych częściach dużej mapy cieplnej. W odróżnieniu od tego, geny „odpowiedzi immunologicznej” i geny „translacji” znajdują się w dolnej połowie mapy cieplnej. Geny adhezji komórkowej znajdują się w górnej połowie dużej mapy cieplnej i jest ich mniej w grupie młodszych osób niepoddanych leczeniu, a więcej u osób starszych niepoddanych leczeniu, a na umiarkowanym poziomie w grupie osób leczonych w starszym wieku. Kolumny w kolorze fukcji ogółem świadczą o zmianie funkcji biologicznych oraz przedstawiają kierunek zmian (zwiększenie - kolor żółty lub zmniejszenie - kolor niebieski), co umożliwia porównanie między nieleczonymi osobami w starszym wieku, leczonymi osobami w starszym wieku i nieleczonymi osobami młodymi na dużej mapie cieplnej.

Na przykład zarówno próbki od leczonych osób starszych, jak i nieleczonych osób młodych cechują się podwyższeniem poziomu transkrypcji „odpowiedzi immunologicznej” i „translacji”, jako że obie te grupy zaznaczono na żółto. W odróżnieniu od tego, grupa osób starszych nieleczonych cechowała się obniżeniem poziomu transkrypcji genów lub „obniżeniem” (kolor niebieski) genów „odpowiedzi immunologicznej” i „translacji” w porównaniu do dwóch pozostałych grup.

Programy genowe mające związek z procesem starzenia mają niejednorodny charakter i są „wzbogacone” wieloma parametrami biologicznymi. Do najważniejszych pięciu terminów z zakresu GO, które cechują się podwyższeniem w grupie osób starszych nieleczonych w porównaniu z grupą osób młodych nieleczonych, należą: translacja ( $P = 4,7 \times 10^{-12}$ ), elongacja translacji ( $P = 5,1 \times 10^{-7}$ ), kompleksowe asemlowanie makromolekularne ( $P = 7,5 \times 10^{-6}$ ), metaboliczne procesowanie ncRNA ( $P = 6,2 \times 10^{-6}$ ) i przetwarzanie RNA ( $P = 2,5 \times 10^{-6}$ ). Najważniejszymi terminami GO, które uległy obniżeniu w grupie osób starszych niepoddanych leczeniu w porównaniu z grupą nieleczonych młodych osób, były funkcje kodowania genów mające związek z adhezją komórek ( $P = 1,5 \times 10^{-17}$ ), adhezją biologiczną ( $P = 1,7 \times 10^{-17}$ ), homofilną adhezją komórek ( $P = 7,8 \times 10^{-8}$ ), rozwojem układu szkieletowego ( $P = 3,2 \times 10^{-7}$ ) oraz ze szlakiem sygnalizacji białkowej przez receptory związane z enzymami ( $P = 5,2 \times 10^{-6}$ ). Te układy genów przypominają zmiany w ekspresji genów mające związek ze starzeniem w innych tkankach i u innych organizmów. Na przykład geny związane z procesem translacji lub z regulacją translacji u *Caenorhabditis elegans* (Long i wsp., 2002) oraz u *Drosophila melanogaster* (Kirby i wsp., 2002). Poza tym uważa się, że translacja odgrywa ważną rolę w szlaku TOR (cel rapamycyny) w starzeniu się komórek macierzystych (Chen i wsp., 2009; Nelson i wsp., 2009; Liu i Rando, 2011; Serrano, 2011).

## Terapia BBL pobudza wzorzec ekspresji genów charakterystyczny dla młodej skóry

Geny, których średni poziom ekspresji w skórze leczonych osób w starszym wieku był bardziej zbliżony do skóry osób młodych nieleczonych niż do skóry osób starszych nieleczonych, zostały zdefiniowane jako RGs. W szczególności średni poziom ekspresji genów w grupie osób starszych leczonych odjęto od średniego poziomu ekspresji genów w grupie osób młodych nieleczonych oraz od wartości grupy osób starszych nieleczonych. Jeżeli różnica w poziomie ekspresji genów była mniejsza w przypadku młodszej, nielezionej grupy w porównaniu z różnicą dla grupy nielezionej osób w starszym wieku, wówczas gen definiowano roboczo jako „odmłodzony”. W sumie 1293 transkryptów zakwalifikowano jako RGs (Uzupełniająca Tabela S2 online). Klastrowanie hierarchiczne wykazało, że wzorzec ekspresji genów skóry osób starszych leczonych bardziej przypominał wzorzec obecny w skórze osób młodych niepoddanych leczeniu niż osób starszych, nieleczonych niż tych samych osób (rycina 2a). RGs prezentują koherentne parametry biologiczne i obejmują geny, które należą do następujących, najczęstszych sześciu najważniejszych terminów GO: translacja ( $P = 5,8 \times 10^{-11}$ ), przetwarzanie RNA ( $P = 6,3 \times 10^{-8}$ ), metaboliczne przetwarzanie ncRNA ( $P = 1,4 \times 10^{-7}$ ), regulacja komórkowych, białkowych procesów metabolicznych ( $P = 1,6 \times 10^{-5}$ ), kataboliczne komórkowe procesy makromolekularne ( $P = 2,1 \times 10^{-5}$ ) oraz cykl komórkowy ( $P = 2,4 \times 10^{-5}$ ; rycina 2b, górna prawa część).

Dokładniejsze zbadanie genów o wzorcu ekspresji świadczącym o „odmłodzeniu” pod wpływem BBL wykazało kilka kluczowych czynników regulatorowych, o których wiadomo, że kontrolują proces starzenia u wielu organizmów (rycina 2c). Należą do nich ZMPSTE24, metaloproteinaza metabolizująca laminę A, gen uszkodzony w cechującym się dramatycznym przebiegiem zespołu przedwczesnego starzenia, w progerii Hutchinsona-Guilforda. Poza tym gen receptora *IGF1R* był jednym ze stwierdzonych RGs, a produkt tego genu jest bezpośrednio związany z procesem starzenia i długowiecznością u ludzi, myszy oraz innych modelowych organizmów (Liang i wsp. 2011; Tazearslan i wsp., 2011). Do innych RGs należały *EIF4G1* oraz *EIF4EBP1*, mające związek z większą żywotnością u *C. elegans* (Curran i Ruvkun, 2007). *MLL* jest regulatorem transkrypcji mającym związek z telomerami (Casini i wsp. 2009) i metyluje *H3K4*, który jest niezbędny do prawidłowej żywotności *C. elegans* (Greer i wsp., 2010). *MAP3K5* (*ASK10*) reguluje aktywność kinaz w odpowiedzi na stres oksydacyjny w modelu starzenia myszy Klotho (Hsieh i wsp. 2010). *PSMD8* jest składnikiem proteasomu i opisywano, że nieprawidłowości funkcjonowania proteasomów przyczyniają się do starzenia skóry u ludzi (Hwang i wsp., 2007). *RING1* i *MOV10* znajdują się w kompleksie Polycomb, odpowiedzialnym za kontrolę długości życia ludzkich fibroblastów (Iltahana i

wsp., 2003). *EEF2* (ang. *eukaryotic translation elongation factor 2* - eukariotyczny czynnik 2 elongacji translacji) również zalicza się do RG i opisywano, że ma związek z powiązaniem z wiekiem spadkiem syntezy białek u szczurów (Parado i wsp., 1999). I wreszcie wiele genów supresorowych nowotworów, będących punktami kontrolnymi cyklu komórkowego i zapewniających integralność genomu, takich jak supresor nowotworów *ING4*, *DAXX* i *MSH2*, również należy do RGs. Tym samym wydaje się, że terapia BBL może odtwarzać wiele cech molekularnych młodej skóry w skórze starzejącej się, przynajmniej w krótkim okresie. Co istotne, nie zauważyliśmy zmian w ekspresji genów mających związek z gojeniem się ran lub bliznowaceniem.

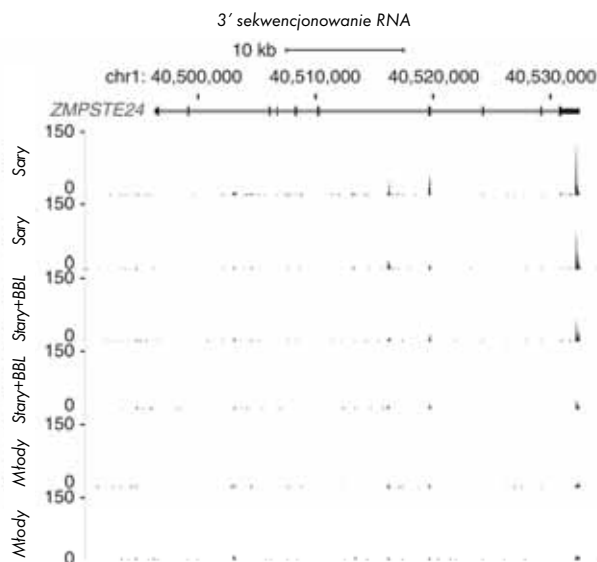
W celu potwierdzenia tych danych w 3-seq, wykonaliśmy ilościową PCR z odwróconą transkrypcją (ang. qRT-PCR - *quantitative reverse transcription-PCR*), aby potwierdzić poziom *ZMPSTE24* w niezależnej grupie kobiet niepoddanych leczeniu w różnym wieku. Wyniki 3-seq wykazały, że w starzejącej się skórze niepoddanej leczeniu były najwyższe poziomy ekspresji transkrypcji *ZMPSTE24*, w leczonej starzejącej się skórze były umiarkowane poziomy transkrypcji *ZMPSTE24*, a w nieleczzonej młodej skórze poziomy były najniższe (rycina 3a). W qRT-PCR nieleczona starzejąca się skóra ramienia (75 rok życia) cechowała się najwyższym poziomem transkrypcji *ZMPSTE24*, nieleczona skóra ramienia osób w średnim wieku (35 rok życia) cechował się umiarkowanym po-

ziomem, a nieleczona skóra ramienia osób młodych (24 rok życia) cechowała się najniższym poziomem (rycina 3b). Takiego gradientu nie opisywano wcześniej u ludzi, ale jest to niezależny wskaźnik, sugerujący, że uzyskane przez nas wyniki mają biologiczne znaczenie dla fizjologicznego procesu starzenia.

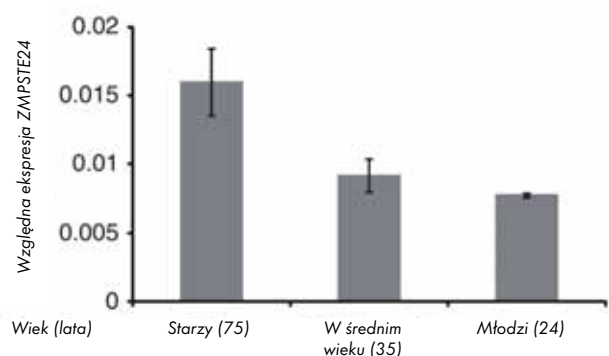
Wzbogacenie genów kodujących mRNA biorących udział w przetwarzaniu RNA zasugerowało nam, aby ocenić poziom ekspresji dodatkowych klas RNA. lncRNAs są nową klasą elementów genetycznych, które są przedmiotem wszechobecnej transkrypcji w genomie człowieka (Wang i wsp. 2009; Wapinski i Chang, 2011). Rola lncRNA w procesie starzenia oraz dla skóry nie była przedmiotem badań, ponieważ nie były one reprezentowane w platformach wykorzystujących technologię microarray w przeszłości. Natomiast technologia 3-seq umożliwia łatwą detekcję i ocenę ilościową ekspresji lncRNA. Spośród 3 530 transkryptów o zmienionym poziomie ekspresji między nieleczonymi osobami młodymi i nieleczonymi osobami w starszym wieku, 151 to lncRNAs. Lokalizacja w chromosomie i najbliższe geny z tych lncRNAs przedstawiono w Tabeli Uzupelniającej S3 online. Spośród 1293 RGs, 42 to lncRNAs. Lokalizacja w chromosomie i najbliższe geny z tych lncRNAs wymieniono w Uzupelniającej Tabeli S4 online, z mapą cieplną na Rycinie Uzupelniającej S1 online. Dane te sugerują, że lncRNAs mogą potencjalnie brać udział w procesie starzenia i rejuwenacji, co jest podobne do roli, jaką odgrywają w rozwoju i reprogramowaniu komórek (Gupta i wsp., 2010; Loewer i wsp., 2010). Uzyskane przez nas dane to wstępny zestaw lncRNAs mających związek z procesem starzenia u człowieka, który zapoczątkowuje badania funkcjonalne w przyszłości.

Analiza GO 151 lncRNAs o istotnych różnicach w ekspresji między młodą nieleczoną a starą nieleczoną skórą

a)



b)



Rycina 3. Zwiększenie poziomu transkrypcji *ZMPSTE24* po terapii BBL.

(a) Schemat locus *ZMPSTE24* na chromosomie 1, hg18. Odczyty 3'-seq (głębokie sekwencjonowanie 3' końca RNA) wykreślone dla dwóch starszych osób z i bez terapii BBL oraz dla dwóch młodych próbek bez leczenia.

(b) Ekspresja transkryptu *ZMPSTE24* jest niższa niż w nieleczonej starszej skórze w porównaniu z nieleczoną młodą skórą na podstawie oceny metodą RT-qPCR. Ekspresja transkryptu *ZMPSTE24* w nieleczonej próbce skóry w średnim wieku jest na umiarkowanym poziomie ( $n = 1$ ).

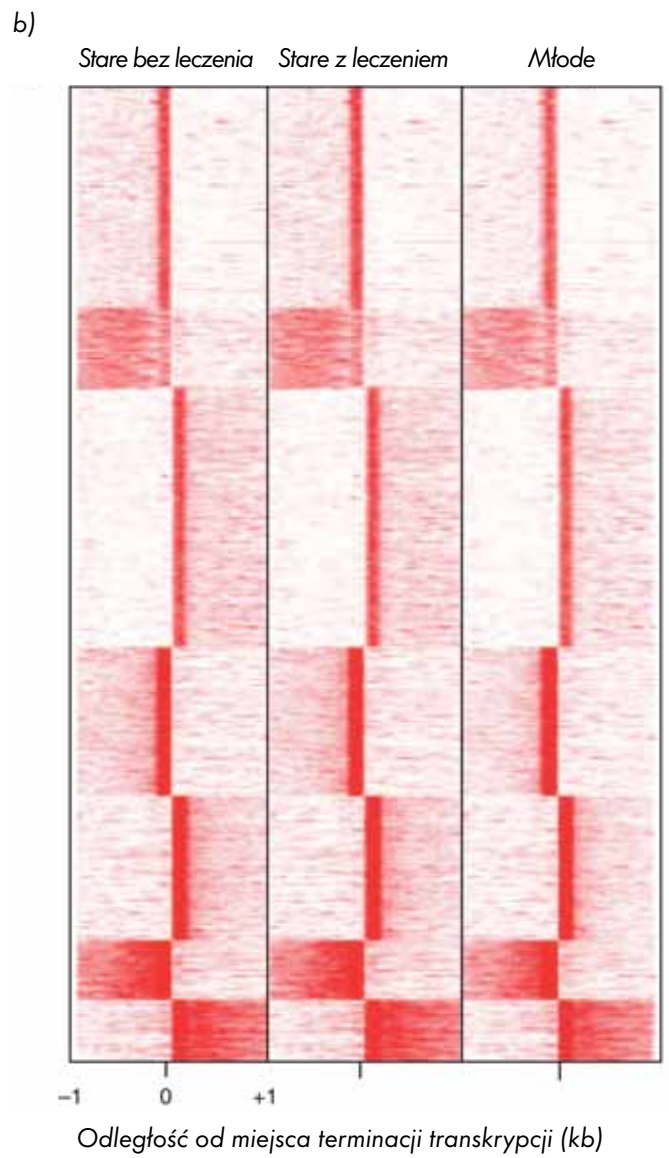
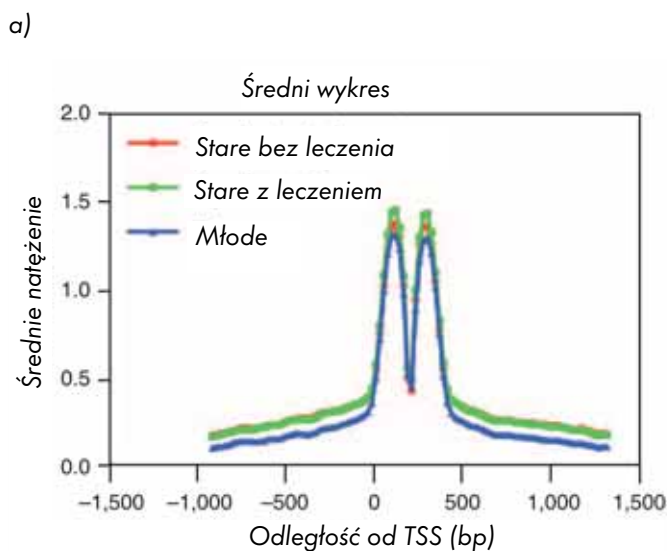
wykazała, że nie dochodzi do istotnego wzbogacenia terminów GO. Tak samo, analiza GO 42 „odmłodzonych” lncRNAs nie wykazała istotnego wzbogacenia terminów (ang. *enrichment for terms*). Tym niemniej znaczenie lncRNAs w „rejuwenacji” nie jest wcale mniejsze. Na przykład, zidentyfikowane przez nas 42 lncRNAs to niewielka liczba i przyszłe badania z większym rozmiarem próbki mogą umożliwić zidentyfikowanie większej liczby lncRNAs, umożliwiając identyfikację istotnych terminów GO. Poza tym, lncRNAs to nowa klasa RNA, a nasza analiza GO opierała się na bliskości sekwencji lncRNAs do znanych genów. Możliwe, że lncRNAs mają istotne znaczenie dla genów regulatorowych, które niekoniecznie są położone proksymalnie w stosunku do lncRNA (Gupta i wsp., 2010).

Wpływ terapii BBL na odpowiedź immunologiczną polega na zmianie profilu immunologicznego w sposób przypominający młodą skórę niepoddaną leczeniu. Na rycinie 2a przedstawiono, że mimo, iż geny mające związek z odpowiedzią immunologiczną zwiększają swoją liczbę po leczeniu, to ten „podwyższony” profil bardziej przypomina próbki od osób młodych, niepoddanych le-

czeniu. Sugeruje to, że przynajmniej część odpowiedzi immunologicznej cechującej się intensyfikacją po leczeniu jest częścią profilu „rejuwenacyjnego”, który nie jest specyficzny dla terapii BBL.

Wykazano, że szlak NF- $\kappa$ B ma istotne znaczenie w procesie starzenia i rejuwenacji (Adler i wsp., 2007) oraz, że RGs są rzeczywiście mocno wzbogacone w geny związane z NF- $\kappa$ B, co potwierdzono w doświadczeniach z sekwencjonowaniem immunoprecypitacji chromatyny. Ogółem, 827 spośród 1 293 RGs wiąże się z NF- $\kappa$ B ( $P = 1,2 \times 10^{-75}$ , test hypergeometryczny). Co interesujące, NF- $\kappa$ B jako taki nie należał do RGs.

Wydaje się, że 3' terminacja RNA nie zmienia się pod wpływem starzenia, ani BBL 3-seq wychwytuje 3' poliadenylowe (poliA) fragmenty RNA w głębokim sekwencjonowaniu i dzięki temu może potencjalnie wykryć zmiany w lokalizacji 3' terminacji transkrypcji. W metodzie 3-seq dochodzi do natychmiastowego próbkowania sekwencji RNA w górę ogonów poliA. Jeżeli byłyby zmiany w użyciu miejsca poliA w obrębie ostatniego egzonu, tak, że ostatni egzon został wydłużony lub ścięty, powinno to być



Rycina 4. Fototerapia światłem szerokopasmowym (BBL) i proces starzenia nie cechują się systematycznymi zmianami w wykorzystaniu końca 3'.

- (a) Systematyczne porównanie wszystkich odczytów 3-seq (głębokie 3'-końcowe sekwencjonowanie RNA) wskazujące, że większość odczytów wypadła w anotowanym ostatnim egzonie (na podstawie odstępów około 1000 bp od miejsca startu transkrypcji (TSS)) w przypadku nieleczonych starych, leczonych starych oraz nieleczonych młodych grup. Na osi y przedstawiono średnie natężenie sygnału 3-seq.
- (b) Nie stwierdzono systematycznych zmian wykorzystania 3'-końca mających związek ze starzeniem lub z terapią BBL, ponieważ odczyty cechowały się podobną dystrybucją długości między starszymi nieleczonymi, leczonymi starszymi a nieleczonymi młodymi grupami.

wykryte w odczytach sekwencyjnych. W metodzie tej nie ocenia się długości ogonów poliA.

Alternatywne wykorzystanie końca 3' jest ważnym mechanizmem regulacyjnym (Mayr i Bartel, 2009) i może zmieniać ekspresję genów przez zmianę zawartości regionu 3' niepoddanego translacji, co z kolei może zmienić repertuar celów microRNA lub białek wiążących RNA (jak np. tych, o których wiadomo, że występują w chorobie nowotworowej; Shapiro i wsp., 2011). Tym samym, poza oceną ilościową zmian w nasileniu transkrypcji, poszukiwaliśmy również zmian w terminacji transkrypcji mających związek z procesem starzenia lub terapią BBL. Systematyczne porównanie wszystkich odczytów 3-seq wykazało, że zgodnie z oczekiwaniami, większość odczytów wypadła w anotowanym ostatnim egzonie, tzn. < 1000 bp od miejsca terminacji transkrypcji (rycina 3a) i nie stwierdzono skojarzonych zmian w używaniu 3'-końca mających związek ze starzeniem się lub z terapią BBL (rycina 3b). Na przykład, jeżeli rozkład odległości od miejsca terminacji transkrypcji dla RNA z młodych nieleczonych i ze starych leczonych próbek był odmienny, wówczas starzenie mogło być związane z systemowymi zmianami w terminacji 3' mRNA (rycina 4).

### Specyficzne działanie terapii BBL

Poza wywieraniem wpływu na mający związek z wiekiem program ekspresji genów, rozważaliśmy również możliwość, że terapia BBL może indukować unikalne, swoiste działania, odmienne od procesu starzenia. Na przykład, terapia BBL poza samym działaniem rejuwenacyjnym może indukować odpowiedź w postaci gojenia się ran i bliznowacenia. Stwierdziliśmy stałe zmiany w ekspresji 1112 genów, które występują wyłącznie w próbkach leczonych metodą BBL, a nie stwierdza się ich ani w młodych próbkach niepoddanych terapii, ani w starych próbkach niepoddanych leczeniu. Wśród tych genów specyficznych dla terapii, do najważniejszych pięciu kategorii terminów GO w sposób istotny powiązanych ze wzmożoną ekspresją po terapii należały wymienione poniżej: odpowiedź immunologiczna ( $P = 3,8 \times 10^{-12}$ ), pozytywna regulacja działania układu immunologicznego ( $P = 2,0 \times 10^{-8}$ ), aktywacja komórek ( $P = 5,7 \times 10^{-8}$ ), aktywacja komórek T ( $6,0 \times 10^{-7}$ ) oraz odpowiedź obronna ( $P = 1,4 \times 10^{-7}$ ). Kategorie te sugerują istnienie odpowiedzi immunologicznej na BBL niezależnej od genów odpowiedzi immunologicznej, które również ulegają wzmocnieniu w młodych nieleczonych próbkach (o czym wspomniano w powyższej części). Do pięciu najważniejszych terminów kategorii GO, w sposób istotny związanych z obniżeniem ekspresji po terapii, należały: regulacja transkrypcji ( $P = 2,0 \times 10^{-6}$ ), transkrypcja ( $P = 1,7 \times 10^{-5}$ ), odpowiedź na substancję organiczną ( $P = 1,1 \times 10^{-4}$ ), odpowiedź na bodźce hormonalne ( $P = 4,4 \times 10^{-4}$ ) oraz negatywna regulacja transkrypcji ( $P = 4,7 \times 10^{-4}$ ). Geny te są inne niż

Tabela 1. 10 najistotniej zmienionych poziomów ekspresji genów ogółem między starszymi próbkami leczonymi za pomocą BBL a nieleczonymi starszymi próbkami.

Symbol genu	Krotność zmiany: starsze leczone w porównaniu do starszych nieleczonych	Kierunkowość zmian
HEP1L1	3,19	w dół
ZNF660	3,09	w dół
LY6G6D	2,53	w dół
COCH	2,38	w dół
CCL18	2,36	w górę
CEP78	2,36	w dół
ANGPTL7	2,34	w dół
SLN	2,17	w dół
CPXM1	2,10	w górę
SAMD5	2,08	w dół

Skrót: BBL, broadband light, światło szerokopasmowe.

wcześniej opisana „sygnatura rany”, charakteryzująca się odpowiedzią na zranienie skóry (Chang i wsp. 2005). Jednakże trudno jest bezpośrednio porównać sygnatury z opisanymi w naszym badaniu, ponieważ nie ma opublikowanych danych w równoważnym punkcie czasu od momentu zranienia zastosowanym w tym badaniu (4 tygodnie).

I wreszcie, najważniejsze 10 genów, których ekspresja jest najbardziej zwiększona i najbardziej obniżona w starych próbkach poddanych leczeniu w porównaniu ze starymi próbkami niepoddanych leczeniu, wymieniono w Tabeli 1.

## DYSKUSJA

Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że czynniki odpowiedzialne za regulację procesu starzenia mogą zmieniać się w ludzkiej skórze po zastosowaniu powszechnie dostępnej technologii BBL. W jaki sposób taka plastyczność procesu starzenia może być modulowana, aby uzyskać korzyści natury zdrowotnej, takie jak zapobieganie lub leczenie zaburzeń skóry związanych z wiekiem, pozostaje nadal kwestią, którą należy wyjaśnić. Mimo, że technologia BBL została wykorzystana ze względu na swój potencjał do uzyskania klinicznie bardziej „młodszy” wyglądu, to wyniki naszego badania sugerują, że doszło również do rejuwenacji na poziomie molekularnym i wiele genów związanych z procesem starzenia uległo zmianie w fazie ekspresji po przebytej terapii i bardziej przypominały młodą skórę. Dlatego jest możliwe, że fenotyp kliniczny odpowiada funkcjonalnej rejuwenacji (przynajmniej krótkotrwałej), a nie jest jedynie kosmetyczną imitacją młodego wyglądu.

Jako, że technologia BBL jest wykorzystywana nie



dłużej niż 20 lat, nie jest znany jeszcze jej efekt długoterminowy. Mimo, że w tym badaniu dokonywano oceny skóry po upływie 4 tygodni od leczenia, nie jest jasne, na ile trwały jest efekt kliniczny i molekularny. Nie wiadomo również, czy wraz z upływem czasu nie dochodzi do spadku zmian skórnych związanych z wiekiem, takich jak rogowacenie łojotokowe lub rogowacenie słoneczne. Wiele informacji może przynieść prowadzenie oceny kontrolnej u osób uczestniczących w tym badaniu w perspektywie długoterminowej (np. > 5 lat), wykonywanie zdjęć i biopsji skóry, aby określić czas trwania klinicznych, histologicznych i molekularnych efektów terapii BBL.

Dokładny mechanizm, w jakim BBL (niekoherentne promieniowanie świetlne) zmienia ekspresję genów, nie jest aktualnie dobrze poznany. Na przykład wiadomo, że BBL jest pochłanianie przez różne elementy docelowe, w tym przez melaninę i hemoglobinę, co prowadzi do złagodzenia rumienia i zmian barwnikowych. Uważa się, że złagodzenie drobnych zmarszczek wynika częściowo z wytwarzania nowego kolagenu (Fisher i wsp., 2008). Jednakże geny zidentyfikowane w tym badaniu nie były specyficzne dla kolagenu. Możliwe, że gdyby biopsje skóry po terapii były wykonywane wcześniej niż po 4 tygodniach, można byłoby stwierdzić pewne zmiany w ekspresji genów mających związek z produkcją kolagenu.

Wydaje się, że programy ekspresji genów mające związek z procesem starzenia u człowieka różnią się w zależności od narządów. Na przykład, starzejąca się ludzka nerka i mięsień cechują się odmiennymi sygnaturami ekspresji genów (Rodwell i wsp., 2004; Zahn i wsp., 2006). Profile ekspresji genów starzenia ludzkiej skóry wygenerowane w tym badaniu nie wydają się być takie same, jak w innych opisywanych narządach. Jednakże przyszłe bezpośrednie badania porównawcze mogą rzucić więcej światła na tą kwestię.

NF-κB jest ważnym czynnikiem regulacyjnym ekspresji genów w szerszym kontekście. W tym przypadku najistotniejszą rolę NF-κB jest najprawdopodobniej kontrola starzenia się komórki (Bernard i wsp., 2004; Adler i wsp., 2007) i odpowiedzi immunologicznej. Odkrycie przez nas, że RGs są mocno wzbogacone w geny związane z NF-κB sugeruje, że BBL może wywierać wpływ na szlaki kontrolowane przez NF-κB. Dokładne mechanizmy za to odpowiedzialne muszą być zbadane. Tym niemniej nasze wyniki są zgodne z wynikami poprzedniego badania, w którym wykazano, że indukowalna blokada NF-κB w starzejącej się skórze myszy odtwarza program ekspresji genów i fenotyp charakterystyczny dla młodej skóry (Adler i wsp., 2007).

Trudno w sposób bezpośredni porównać wyniki naszego badania z profilami ekspresji genów u ludzi opisywanych aktualnie w piśmiennictwie, z dwóch przyczyn: (1) czas wykonania biopsji może nie być dokładnie taki sam oraz (2) natura jednostki chorobowej lub terapii nie

jest taka sama jak BBL. Na przykład, wzorec ekspresji genów w ludzkich hipertroficznym bliznach pooperacyjnych po upływie 6-15 miesięcy u dwóch pediatrycznych i dwóch dorosłych pacjentów wykazał sześć genów jako istotnie zwiększonych (Paddock i wsp., 2003), z których żaden nie uległ istotnej zmianie w naszym badaniu z BBL. W innym przykładzie model *in vitro* z ludzkimi keratynocytami wykorzystujący rany w postaci zadrapań wykazał zwiększoną aktywację NF-κB w komórkach między 1 a 14 dniem (Adams i wsp., 2007). W naszym badaniu stosowano punkt czasowy po upływie 1 miesiąca, kiedy efekt gojenia się rany może ulegać zmniejszeniu i z większym prawdopodobieństwem możemy stwierdzić efekty rejuwenacji. W naszym punkcie czasowym po upływie 1 miesiąca poziom NF-κB nie był podwyższony, ale geny, o których wiadomo, że wchodzi w interakcję z NF-κB, były istotnie podwyższone, co jest odmiennym i, zgodnie z naszą wiedzą, dotychczas nieopisywanym zjawiskiem.

Dwa RGs, RING1 i MOV10, są elementem szlaku Polycomb i potencjalnie przyczyniają się zarówno do efektu rejuwenacji, jak i gojenia się ran. U myszy oraz w hodowlach komórkowych szlak Polycomb kontroluje długość przeżycia ludzkich fibroblastów (Itahana i wsp., 2003) i wiąże się ze zwiększeniem ekspresji genów odpowiedzialnych za gojenie się ran (Shaw i Martin, 2009).

Opisywano, że ligandy receptorów Toll-podobnych 2, 3 i 5 mają wpływ na transkrypcję i poziom białek metaloproteinaz macierzy 1 i 9 oraz że indukują jądrową translokację NF-κB po upływie 24-48 godzin w hodowli ludzkich keratynocytów (Lee i wsp. 2009). Nie stwierdziliśmy istotnego wzrostu receptorów toll podobnych 2, 3 i 5, ani NF-κB, ale nasze badanie było prowadzone w warunkach *in vivo*, a próbki skóry były pobierane po upływie 1 miesiąca.

Poza tym, mimo że nasze dane wskazują, że koherentne kwestie biologiczne, takie jak „translacja” lub „przetwarzanie RNA”, ulegają zmianom po terapii BBL, to w przeprowadzonym przez nas badaniu nie udało się zidentyfikować populacji komórek w skórze, które podlegałyby tym zmianom. Przyszłe badania dotyczące tej kwestii mogą lepiej wyjaśnić, w jaki sposób terapia BBL prowadzi do histologicznych lub strukturalnych zmian, takich jak resorpcja zmian o charakterze elastozy lub odkładanie się kolagenu.

Interesujące może być porównanie, czy inne modalności, o których wiadomo, że redukują kliniczne objawy starzenia skóry, jak np. miejscowe stosowanie tretinoiny, wywołują zmiany w ekspresji genów, często stwierdzane wśród zmian po terapii BBL.

Poza tym, porównanie skóry osób starszych nieeksponowanej na promieniowanie słoneczne przed i po leczeniu może umożliwić zidentyfikowanie zmian w ekspresji genów, które są specyficzne dla procesu endogennej starzenia się skóry.

Jest to badanie rozpoznawcze i będzie uwzględnione w przyszłych badaniach, łącznie z danymi dotyczącymi młodej skóry poddanej leczeniu. W tym badaniu nie prowadziliśmy terapii skóry u młodszych pacjentów (zgodnie z definicją dla tego badania – wiek < 30 r.ż.), ponieważ nie było wskazań klinicznych. U tych uczestników badania nie było objawów starzenia endogennego, ani fotostarzenia na skórze ramion. Jako że jest to mało prawdopodobne, że terapia BBL będzie wykorzystywana w praktyce na młodej skórze bez objawów fotostarzenia (ewentualnie z wyjątkiem usuwania włosów), dlatego nie uwzględniliśmy tej grupy w badaniu.

Aktualnie dostępne informacje w piśmiennictwie dotyczące potencjału terapii BBL w indukowaniu neokolagenezy są niejednoznaczne. Mimo, że istnieją doniesienia na temat zmian histologicznych indukowanych pod wpływem BBL, w których opisywano neokolagenezę (Negishi i wsp., 2001), to są również badania, w których nie wykazano takich zmian (Prieto i wsp., 2002). W ostatnim z wymienionych badań również nie opisano zmian w zawartości włókien elastycznych po leczeniu. W przeprowadzonym przez nas badaniu nie wykazano obecności wyraźnych zmian w zawartości kolagenu po wykonaniu barwienia metodą PAS. W barwieniu metodą von Giesena stwierdzono spadek ilości elastyny. Nie udało się nam stwierdzić żadnych istotnych zmian w ekspresji genów elastyny lub kolagenu po terapii. Możliwym wyjaśnieniem jest fakt, że badanie histologiczne wykonywaliśmy w pojedynczym punkcie, który mógł nie uchwycić czasu, kiedy poziomy ekspresji kolagenu lub elastyny były wyraźniej zmienione. W przyszłych badaniach konieczne będzie wykonywanie biopsji skóry w perspektywie longitudinalnej, aby wychwycić kinetykę aktywacji / supresji docelowych genów. Poza tym jest to dokładnie cel niniejszego badania, aby sięgać poza konwencjonalną analizę histopatologiczną oraz oceniać molekularne zmiany zachodzące w trakcie starzenia się skóry i po leczeniu metodą BBL. Zaobserwowaliśmy wiele zmian w ekspresji genów mających związek ze szlakami przebiegającymi poza tkankę łączną, które mogą być modulowane pod wpływem BBL.

I wreszcie, przyszłe badania z wykorzystaniem większego rozmiaru próbki mogą umożliwić nam zidentyfikowanie dodatkowych, ważnych genów (zarówno kodujących, jak i niekodujących), których ekspresja zmienia się w próbkach skóry od młodych nieleczonych osób w porównaniu z nieleczonymi osobami w starszym wieku, jak również od nieleczonych starszych i leczonych starszych osób. Większy rozmiar próbki mógłby również umożliwić skorelowanie stopnia odpowiedzi klinicznej ze zmianami ekspresji bardziej „odmłodzonych” genów.

## MATERIAŁY I METODY

### Ludzie jako uczestnicy badania i pobieranie próbek

Badanie to przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej. Po uzyskaniu zgody ze strony Instytucjonalnej Komisji Rewizyjnej i podpisaniu formularza, pięć pacjentek w wieku powyżej 50 roku życia poddano terapii BBL w obrębie lewego przedramienia. Kryteriami włączającymi do badania pacjentki poddane leczeniu był II lub III fototyp skóry wg Fitzpatricka i ogólna ocena skóry przedramienia jako starzenie się skóry o nasileniu umiarkowanym lub ciężkim (zmodyfikowane, walidowane narzędzie wg McKenzie i wsp. 2010). Leczenie prowadzono za pomocą Sciton Joule Platform, moduł BBL. Ten sam badacz prowadził leczenie w 4-tygodniowych odstępach, w sumie trzy zabiegi z wykorzystaniem filtra 515 nm lub 560 nm z pojedynczymi, długimi impulsami o czasie trwania 10-20 ms, z fluencją od 8-14 J/cm<sup>2</sup>. Podczas każdej sesji zabiegowej wykonywano dwa lub więcej naświetlań laserem. Po upływie 4 tygodni od trzeciego zabiegu BBL wykonywano 4-mm biopsje sztanckowe skóry, stosując technikę wg Keys w obrębie skóry poddanej leczeniu i z przyległego obszaru. Biopsje sztanckowe (4 mm) pobierano ze skóry ramienia nieekspozowanej na promieniowanie słoneczne u pięciu uczestników badania w wieku < 30 roku życia. Próbkę skrawano i umieszczano w roztworze RNAlater (Ambion, cat. no. AM7022, Grand Island, NY) lub w formalinie w celu wybarwienia metodą H+E, metodą von Giesena lub PAS.

### 3-seq i bioinformatyka

Całe RNA ekstrahowano za pomocą RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Germatown, MD). 3-seq wykonano wg opisu Becka i wsp. (2010). W skrócie, oligo-dT odwrócona transkrypcja generowała komplementarne fragmenty DNA odpowiadające końcom 3' transkryptów poliA. Komplementarne fragmenty DNA klonowano i poddano głębokiemu sekwencjonowaniu w platformie Illumina GAIIx (San Diego, CA) o długości surowego odczytu równej 36 bp. Surowe odczyty konfrontowano z genomem człowieka (hg18) za pomocą bowtie (Langmead i wsp., 2009). Każda próbka wygenerowała 6,5-12,4 milionów niepowtarzalnie mapowalnych odczytów. Aby ocenić rozkład długości, wykonano sekwencjonowanie 3' transkryptów skóry.

Za pomocą skryptu samodzielnie opracowanego przez Kun Qu obliczano liczbę odczytów na tysiąc par zasad egzonu na milion mapowalnych odczytów (RPKM, bezpośrednia metoda oceny nasilenia transkrypcji) oraz liczbę surowych odczytów wypadających w każdym z genów. Włączono sekwencję referencyjną (RefSeq; [www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq)) i niekodujące anotowane geny Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Określono istotne

geny, stosując pakiet DESeq (<http://www.bioconductor.org>), porównując stare próbki poddane terapii ze starymi próbkami niepoddany terapii (geny zmieniły się pod wpływem leczenia). Za pomocą Cluster przeprowadzono nienadzorowane klastrowanie hierachiczne genów istotnie różniących się ekspresją. Stworzono terminy GO za pomocą bazy DAVID (Database of Annotation, Visualisation and Integrated Discovery), Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Geny zbliżone do IncGenes zidentyfikowano za pomocą bazy danych GREAT (<http://great.stanford.edu>). Dane te umieszczono w Gene Expression Omnibus.

Aby określić nakładanie między RGs a wiązaniem NF- $\kappa$ B, pobraliśmy geny związane z NF- $\kappa$ B zidentyfikowane w projekcie ENCODE (ENCODE Consortium, 2011) za pomocą doświadczeń z sekwencjonowaniem immunoprecypitacji chromatyny. W sumie 9650 genów wiązało się z NF- $\kappa$ B w jednym lub więcej typów komórek i porównano je z listą genów RG.

### **RT-qPCR**

Całe RNA ekstrahowano za pomocą TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY), a następnie przeprowadzono oczyszczanie na kolumnach RNeasy (Qiagen) i DNase Turbo Treatment (Ambion). Wykonano RT-qPCR wykorzystując całe RNA (10 ng), odczyn Taqman One Step RT-PCR master mix oraz jeden z poniższych odczynów Taqman: GAPDH (Hs99999905\_m1) i ZMPSTE24 (Hs00956778\_m1; Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Reakcje wykonywano w trzech kopiach dla każdej próbki i przeprowadzono je co najmniej dwukrotnie. Dane normalizowano do poziomu dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanowej.

### **Konflikt interesów**

PB prowadził wykłady dotyczące technologii fototerapii szerokopasmowej. Pozostali autorzy potwierdzili brak konfliktu interesów.

### **PODZIĘKOWANIA**

Badanie to było finansowane z grantu naukowego Sciton. Jesteśmy wdzięczni Paulowi Khavari i Jeanowi Tang za wstępne sprawdzenie niniejszej pracy. Dziękujemy Olenie Mykhaylichenko i Sarze Jacobs za pomoc administracyjną.

### **MATERIAŁ UZUPEŁNIAJĄCY**

Materiał uzupełniający dołączono do wersji online niniejszego artykułu pod adresem:

<http://www.nature.com/jid>