

Vivian Kettunen

ULTRAVIOLETTI B SÄTEILYN AIHEUT- TAMAT SOLUTASON MUUTOKSET IHOSSA JA VUOROKAUSIKELLO

Lääketieteen ja terveystieteiden tiedekunta
Kandidaatintutkielma
Huhtikuu 2021

TIIVISTELMÄ

Vivian Kettunen: Ultravioletti B säteilyn aiheuttamat solutason muutokset ihossa ja vuorokausikello
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2021

Iho on elimistön suurin elin, joka vastaanottaa ympäristöstä ja kehon sisältä tulevia ärsykejä ja signaaleja. Yksi merkittävimmistä ärsykeistä on maahan saapuva ultraviolettisäteily (UV-säteily), joka on yhteydessä lähes kaikkiin ihosyöpiin. UV-säteilyn vaarallisin muoto on UVB-säteily, joka aiheuttaa ihosoluissa DNA-vaurioita eli valotuotteita. Valotuotteet aktivoivat ihosoluissa DNA-vauriovasteen, joka suojaa soluja käynnistämällä vaurioiden korjauksen, solusyklin pysäyttämisen ja solujen ohjelmoidun kuoleman eli apoptoosin. Lisäksi UVB-säteily johtaa ihon punoituksena esiintyvään tulehdusreaktioon.

Lähes kaikki ihon toiminnot noudattavat 24 tunnin vuorokautista rytmiä eli niitä ohjaa elimistön sisäinen vuorokausikello. Samoin UVB-säteilyn aiheuttamassa DNA-vauriovasteessa ja ihon punoituksessa on viime vuosikymmeninä osoitettu vuorokauden ajasta riippuvaa syklistä toimintaa sekä hiirien että ihmisten ihossa. Tätä vuorokausirytmää säätelee aivojen hypotalamuksessa sijaitseva keskuskello, joka vastaanottaa silmien kautta tulevaa valoa ja synkronoi ihon ja sen solut kanssaan samaan tahtiin. Soluissa vuorokausikello rakentuu erityisistä kellogeeneistä, jotka ylläpitävät solujen toiminnoissa noin 24 tunnin rytmiä. Ihosolujen autonomisia kelloja säätelevät keskuskellon lisäksi ulkoiset tekijät, kuten lämpötilan muutokset ja säteily. On mahdollista, että myös UVB-säteily muuttaa ihon kellogeenien ilmentymisrytmiä ja samalla muokkaa ihon vastetta ja sen ajoittumista UVB-säteilyn aiheuttamille DNA-vaurioille.

Varsinaisia *in vivo* -tutkimuksia ihmisihossa toimivan vuorokausikellon ja UVB-säteilyn yhteydestä on hyvin vähän, ja tulokset perustuvat pääsääntöisesti hiirien ihoon. Hiiret luovat hyvän, mutta päinvastaisessa vuorokausirytmisessä kulkevan mallin, joten hiirillä saatujen tulosten perusteella ei voida suoraan vetää johtopäätöksiä ihmisihon vuorokausirytmistä. Vuorokausikellon ja ihosyövän kehittymisen välillä on osoitettu yhteys. Tämä tekee kellon toimintaan ja rytmiin liittyvän kliinisen tutkimuksen tarpeelliseksi syöpähoitojen kehittämisen ja julkisten suositusten asettamisen kannalta. Lisäksi ihosyövän yleistyessä jatkuvasti ihmisihon, UVB-säteilyn ja vuorokausikellon välisen yhteyden selvittäminen on tulevana vuosina välttämätöntä.

Tämän kandidaatintutkielman tarkoituksena on selvittää, millaisia solutason vaikutuksia UVB-säteilyllä on ihossa, ja kuinka vuorokausikello säätelee näitä vasteita sekä hiiren että ihmisen ihossa. Lisäksi työn tavoitteena on kartoittaa, mitä vuorokausikellon ja UVB-säteilyn vuorovaikutuksesta on vielä selvittämättä, ja millaisia jatkotutkimuskohteita se tarjoaa.

Avainsanat: Iho, ultraviolettisäteily, UVB-säteily, ihosyöpä, valotuotteet, DNA-vauriovaste, vuorokausikello

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä kandidaatintutkielma on osa Tampereen yliopistossa suoritetun bioteknologian tutkinto-ohjelman kandidaatin tutkintoa. Haluan kiittää professori Erna Snellmania, joka auttoi minut alkuun ja esitteli minut ohjaajalleni dosentti Piia Karisalolle. Erityisesti haluan kiittää Piiaa jatkuvasta tuesta, neuvoista ja avusta tutkielman suunnittelussa sekä professori Timo Partosta, joka osasi aina tarvittaessa vastata vaikeisiin kysymyksiini ja auttaa eteenpäin. Apulaisprofessori Katri Lindfors on ollut myös korvaamaton apu kandidaatin edetessä, kiitos hänelle. Kiitokset myös perheelleni ja ystäväilleni, jotka kannustivat minua työn edetessä, sekä opettajille, joilta sain aina tarvittaessa apua.

Tampereella, 27.4.2021

Vivian Kettunen

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	4	
2. UV-SÄTEILYN AIHEUTTAMAT SOLUTASON MUUTOKSET IHOSSA	5	
2.1 Ihon rakenne	5	
2.2 UV-säteily	6	
2.3 UVB-säteilyn aiheuttamat akuutit reaktiot ihossa	7	
2.3.1 Ihon punoitukseen liittyvä tulehdusreaktio	7	
2.3.2 DNA-vauriot ihosoluissa	8	
2.4 DNA-vaurioiden aktivoima vaste soluissa	9	
2.4.1 Solusyklin pysäyttäminen	10	
2.4.2 DNA-vaurioiden korjaus	10	
2.4.3 Apoptoosi	12	
3. VUOROKAUSIKELLO JA UVB-SÄTEILYN AIHEUTTAMAT MUUTOKSET IHOSSA		12
3.1 Vuorokausikellon molekulaarinen rakenne	13	
3.2 Vuorokausikello ja ihon punoitusreaktio	14	
3.2.1 Hiiren iho	14	
3.2.2 Ihmisiho	15	
3.3 Vuorokausikello ja solusyklin pysäyttäminen	15	
3.3.1 Hiiren iho	16	
3.3.2 Ihmisiho	16	
3.4 Vuorokausikello ja DNA-vaurioiden korjaus	17	
3.4.1 Hiiren iho	17	
3.4.2 Ihmisiho	18	
3.5 Vuorokausikello ja apoptoosi	19	
3.5.1 Hiiren iho	19	
3.5.2 Ihmisiho	20	
3.6 UVB-säteilyn vaikutus ihon vuorokausirytmiiin	20	
4. YHTEENVETO	21	
5. LÄHDELUETTELO	22	

1. JOHDANTO

Iho on elimistön rajapinnalla sijaitseva suurin elin, joka suojaa kehoa jatkuvasti ympäristöstä tulevilta uhilta, kuten taudinaiheuttajilta ja karsinogeneeneiltä. Yksi yleisimmistä karsinogeneeneista on ultraviolettisäteily (UV-säteily), jonka runsaus ympäristössä tekee siitä merkittävän riskitekijän ihosyövän kehittymiselle (D'Orazio ym. 2013). Ihosyöpä kuuluu yleisimpiin syöpiin maailmassa, ja se voidaan jakaa melanoomaan sekä muihin syöpätyyppeihin, kuten oka- ja tyvisolusyöpiin, joihin sairastui vuonna 2020 yli 1,2 miljardia ihmistä maailmassa (<https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>, 15.4.2021). UV-säteily aiheuttaa ihossa akuuttien DNA-vaurioiden ohella myös monia systeemisiä vasteita muun muassa kehon homeostaasissa ja immuunipuolustuksessa (D'Orazio ym. 2013). Lisäksi ihossa toimii tehokas järjestelmä, jonka avulla DNA-vauriot pyritään korjaamaan ennen solujen kehittymistä syöpäsoluiksi (Dakup & Gaddameedhi 2017).

Iho ja UV-säteily on viime vuosikymmeninä liitetty elimistössä toimivaan sisäsyntyiseen aikasysteemiin, vuorokausikelloon, joka määrittää elävien organismien biokemian, fysiologian ja käyttäytymisen päivittäistä rytmiä (Dakup & Gaddameedhi 2017). Tämä autonominen ajanmittauskoneisto luo soluihin noin 24 tunnin rytmin, joka seuraa Maan pyörimisestä syntyviä vuorokautisia valo-pimeä-syklejä (Matsui ym. 2016). Vuorokausirytmia säätelee aivojen hypothalamuksen suprakiasmaattisessa tumakkeessa (Suprachiasmatic nucleus, SCN) sijaitseva keskuskello, joka vastaanottaa näköhermon kautta ympäristöstä saapuvan valon ja synkronoi ääreiskudokset, kuten ihon ja sen solut, kanssaan samaan ympäristön määrittämään rytmiin (Morgan ym. 2019).

Ihon vuorokausikello säätelee suurinta osaa ihon toiminnoista, kuten ihon lämpötilaa, solujen jakautumista, soluissa syntyvien DNA-vaurioiden korjausta sekä tulehdusreaktioita (Matsui ym. 2016). Vuorokausikellon kehittyneen verkoston takia sen osuutta UV-säteilyn aiheuttamien vasteiden säätelyssä on pyritty selvittämään pääsääntöisesti hiiren, mutta viime vuosien aikana myös ihmisen ihossa (Dakup & Gaddameedhi 2017). Koska vuorokausikello tahdistaa koko elimistön toimintaa, on myös sen häiriöt usein liitetty syövän sekä aineenvaihdunnallisten ja tulehduksellisten sairauksien kehittymiseen (Morgan ym. 2019). Hiirillä saatujen tulosten perusteella vuorokausikellon toiminta on voitu yhdistää ihosyövän syntymiseen, ja tästä on viitteitä myös ihmisihon keskitetyissä tutkimuksissa (Gaddameedhi ym. 2011). Kellon toiminnan selvittäminen luo merkityksellisen pohjan vuorokausiajastettujen syöpähoitojen kehittämiseen, ihosyövän ehkäisemiseen sekä julkisten suositusten laatimiseen turvallisesta ajasta olla auringossa (Gaddameedhi ym. 2015, Sancar & Van Gelder 2021).

2. UV-SÄTEILYN AIHEUTTAMAT SOLUTASON MUUTOKSET IHOSSA

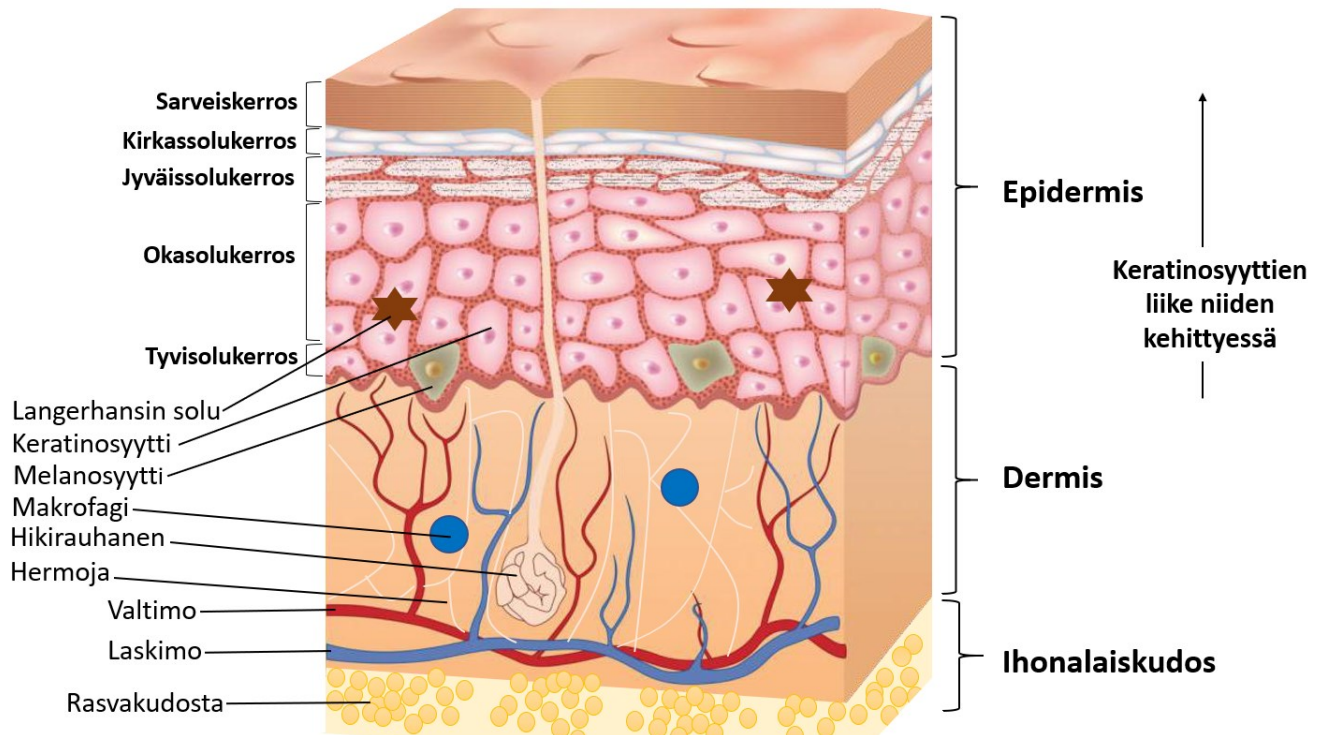
Iho on elimistömme suurin elin, joka sijaitessaan ainutlaatuisesti kehon rajapinnalla altistuu jatkuvasti vuorokauden ajasta riippuen erilaisille ulkoisille tekijöille sekä ottaa vastaan elimistön sisältä tulevia signaaleja (Matsui ym. 2016, Dakup & Gaddameedhi 2017). Yksi ihon tärkeimmistä tehtävistä on suojata elimistöä ympäristön infektoivilta patogeeneiltä, myrkyiltä, ulkoisilta vaurioilta sekä auringon lähettämältä UV-säteilyltä (D'Orazio ym. 2013). UV-säteilyllä on useita vaikutuksia ihmisiin. Se aiheuttaa akuutteja reaktioita, kuten DNA-vaurioita ja tulehdusreaktion sekä kroonisia vasteita, kuten ihon paksuuntumista ja ennenaikaista vanhenemista, jotka ovat seurausta syntyneistä happiradikaaleista (Dakup & Gaddameedhi 2017, Nikkola ym. 2019). DNA-vauriot voivat johtaa ihosyövän kehittymiseen, ja siksi UV-säteily aktivoi DNA-vauriovasteen, joka korjaa muutokset, pysäyttää solusyklin ja ohjaa vaurioituneet solut tarvittaessa apoptoosiin (D'Orazio ym. 2013). UV-säteilyn haitallisista ominaisuuksista huolimatta sillä on merkittävä kliininen potentiaali ihosairauksien hoidossa, esimerkiksi valoterapian muodossa (Nikkola 2021).

2.1 Ihon rakenne

Iho voidaan jakaa anatomisesti kolmeen kerrokseen: ulommaiseen epidermikseen eli orvasketeen, sen alla olevaan dermikseen sekä ihonalaiskudokseen, joista jokaisessa on niiden toiminnoille ominainen rakenne ja solukoostumus (Dakup & Gaddameedhi 2017). Epidermis on itsestään uusiutuva kudos, joka koostuu pääsääntöisesti erilaistumisen eri vaiheissa olevista keratinosyyteistä eli sarveissoluista, jotka eroavat toisistaan koon, muodon ja keratiinimäärän mukaan (D'Orazio ym. 2013). Keratinosyytit syntyvät epidermoksen alimmassa tyvisolukerrossa eli stratum basalella olevista kantasoluista (Marvola ym. 2007). Solunjakautumiset työntävät yläpuolellaan olevia keratinosyyttejä kohti ihon pintaa, jolloin ne käyvät samalla läpi terminaalisen erilaistumisen ohjelmoituja vaiheita (D'Orazio ym. 2013). Lopulta ikääntyessään keratinosyytit kuolevat täytyessään keratiinilla ja muuttuvat korneosyyteiksi, jolloin niistä muodostuu epidermoksen pinnalle stratum corneum eli sarveiskerros, joka on ensilinjassa ihon puolustuksessa (Marvola ym. 2007).

Sen lisäksi, että keratinosyytit muodostavat tiiviitä liitoksia ja mahdollistavat tehokkaan fyysikaalisen esteen ulkoisille tekijöille, ne sisältävät pigmenttiä, melaniinia, joka antaa iholle ja hiuksille värin ja suojaa elimistöä UV-säteilyltä (Dakup & Gaddameedhi 2017). Melaniini muodostuu melanosyyteissä, epidermoksen toiseksi yleisimmässä solutyypissä, ja siirtyy sieltä melanosomien kautta keratinosyytteihin (D'Orazio ym. 2013). Keratinosyyttien ja melanosyyttien lisäksi epidermiksessä esiintyy runsaasti Langerhansin ja Merkelin soluja (Dakup & Gaddameedhi 2017). Epidermoksen

alla sijaitseva dermis eli verinahka sen sijaan rakentuu sidekudoksesta ja kollageenista ja sisältää hermopäätteitä sekä hiusverisuonia, joista epidermikseen siirtyy ravinteita (Marvola ym. 2007). Dermiksessä on fibroblasteja ja immuunisoluja, kuten syöttösoluja, lymfosyyttejä ja makrofageja, ja lisäksi sieltä lähtevät karvatupet sekä tali- ja hikirauhaset (D'Orazio ym. 2013, Dakup & Gaddameedhi 2017). Ihonalaiskudos koostuu rasvasoluista ja löyhästä sidekudoksesta, ja eri kohdissa sen paksuus vaihtelee (Marvola ym. 2007). Kuva 1 esittää ihon rakenteen.



Kuva 1: Ihon rakenne. Ihon kolme kerrosta ovat epidermis, dermis ja ihonalaiskudos. Epidermiksessä on viisi toiminnallista kerrosta keratinosyyttien erilaistumisvaiheiden perusteella: tyvisolukerros (*stratum basale*), okasolukerros (*stratum spinosum*), jyväissolukerros (*stratum granulosum*), kirkassolukerros (*stratum lucidum*) sekä marraskesi eli sarveiskerros (*stratum corneum*). Dermis sisältää hermopäätteitä ja verisuonia, jotka ravitsevat verisuonettoman epidermiksen soluja. Alimpana on rasvakudoksesta koostuva ihonalaiskudos. Kuva: Shutterstock, jota muokattu D'Orazio ym. (2013) ja Marvola ym. (2007) pohjalta.

2.2 UV-säteily

Yksi merkittävimmistä ärsykeistä, jolle iho altistuu, on auringon UV-säteily (Dakup & Gaddameedhi 2017). UV-säteily asettuu aallonpituudeltaan näkyvän valon ja röntgensäteilyn väliin elektromagneettisen säteilyn spektrissä. Se on jaettu saapuvien fotonien energian sekä aallonpituuden perusteella kolmeen luokkaan: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) ja UVC (100–280 nm) (Budden & Bowden 2013, D'Orazio ym. 2013). Säteilyluokkien aallonpituuksien lyhentyessä fotonien energiat kasvavat, mikä tekee UVC-säteilystä energialtaan suurinta ja vahingollisinta eläville

organismeille (Dakup & Gaddameedhi 2017). UVC-säteily absorboituu kuitenkin ilmakehän otsonikerrokseen samoin kuin osa UVB-säteilystä, joten Maahan saapuvasta UV-säteilystä noin 95 % koostuu UVA-säteistä ja loput 5 % UVB-säteistä (Budden & Bowden 2013).

Maan pinnalle saapuvat UV-säteet tunkeutuvat paljaaseen ihoon aallonpituudesta riippuvalla tavalla. Kun pidemmän aallonpituuden UVA-säteily absorboituu syväälle dermikseen asti, saavuttavat lyhyemmät energialtaan suuremmat UVB-säteet pääsääntöisesti vain epidermaalisen ihokudoksen (D'Orazio ym. 2013). Riippuen epidermiksen paksuudesta eri ihoalueilla kapeakaistaisesta, ihotautien valohoidossa käytetystä UVB-säteilystä (Narrow-band, NB-UVB, 309–313 nm) alle 10 % pääsee dermikseen asti (Nikkola 2021). Suhteellisen pienestä määrästäan huolimatta UVB on maahan saapuvan UV-säteilyn mutageenisin komponentti, sillä se absorboituu suoraan ja UVA-säteilyä tehokkaammin ihosolujen DNA:han. Siten se on pääsääntöisesti vastuussa epidermiksen karsinomista ja UV-säteilyn aiheuttamista akuuteista vasteista ihossa (Budden & Bowden 2013, Sun ym. 2018).

2.3 UVB-säteilyn aiheuttamat akuutit reaktiot ihossa

UVB-säteilyn aiheuttamiin akuutteihin reaktioihin kuuluvat D-vitamiinin synteesi, ihon immuunipuolustuksen heikkeneminen, DNA-vauriot, jotka aktivoivat ihon punoituksena ilmenevän tulehdusreaktion, sekä ihon ruskettuminen, jossa lisääntynyt melaniinin tuotto suojaa soluja UV-säteilyltä (Nikkola 2021). UV-säteilyn aiheuttamat vauriot riippuvat sekä aallonpituudesta että ihotyypistä: UVA-säteily synnyttää DNA-vauriota välillisesti muodostuvien happiradikaalien vaikutuksesta, kun sitä vastoin UVB aiheuttaa DNA-vaurioita suoraan. Ihon vaurioalttius perustuu muun muassa perittyyn ihon pigmenttityyppiin (D'Orazio ym. 2013).

2.3.1 Ihon punoitukseen liittyvä tulehdusreaktio

Liiallisen UVB-säteilyn seurauksena ihoon syntyy akuutti tulehdusreaktio, joka havaitaan ihon punoituksena eli ihon palamisena (Hruza & Pentland 1993). Punoitus on seurausta UVA-säteilyn aiheuttamista happiradikaaleista ja ennen kaikkea UVB-säteilyn välittämistä DNA-vaurioista, jotka aktivoivat punoitukseen johtavan immuunipuolustuksen (Nikkola 2021). Punoituksen taustalla on dermiksessä kulkevien verisuonien laajentuminen ja verenkierron voimistuminen, ja se alkaa tavallisesti noin 3–4 tunnin kuluttua altistuksesta, vaikkakin huippu esiintyy vasta 24 tuntia myöhemmin (Hruza & Pentland 1993). Usein voimakkaalle UVB-säteilylle altistuneella ihoalueella havaitaan punoituksen lisäksi tulehduksen aikaansaamaa turvotusta, kuumotusta sekä kipua (Hruza & Pentland 1993). Kun punoitusreaktio hälvenee, seuraa epidermiksen paksuuntuminen ja ihon ruskettuminen, jotka suojaavat ihoa saapuvilta UV-säteilyltä (D'Orazio ym. 2013).

Punoitusvaste välittyy neutrofiilien ja makrofagien tuottamien proinflammatoristen sytokiinien sekä vaso- ja neuroaktiivisten aineiden avulla (D'Orazio ym. 2013, Gaddameedhi ym. 2015). Näitä punoitusreaktiota välittäviä tekijöitä ovat muun muassa syöttösolujen vapauttama histamiini, joka saa aikaan verisuonien laajenemisen, sekä prostaglandiinit ja arakidonihappo, jotka aiheuttavat verisuonien sileän lihaksen supistumista (Hruza & Pentland 1993, Nikkola 2021). Lisäksi UVB-säteily vapauttaa ihossa typpioksidia, jonka epäillään olevan osa ihon punoitusreaktiota (Nikkola 2021). Palamista säätelee DNA-vaurioiden aktivoima kasvunrajoiteproteiini p53, joka välittää myös DNA:n korjauksen, solusyklin pysäyttämisen ja keratinosyyttien ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin vaurioiden ylittäessä tietyn kynnsarvon. Näitä keratinosyyttejä kutsutaan "palaneiksi soluiksi" ("Sunburn cells") (D'Orazio ym. 2013).

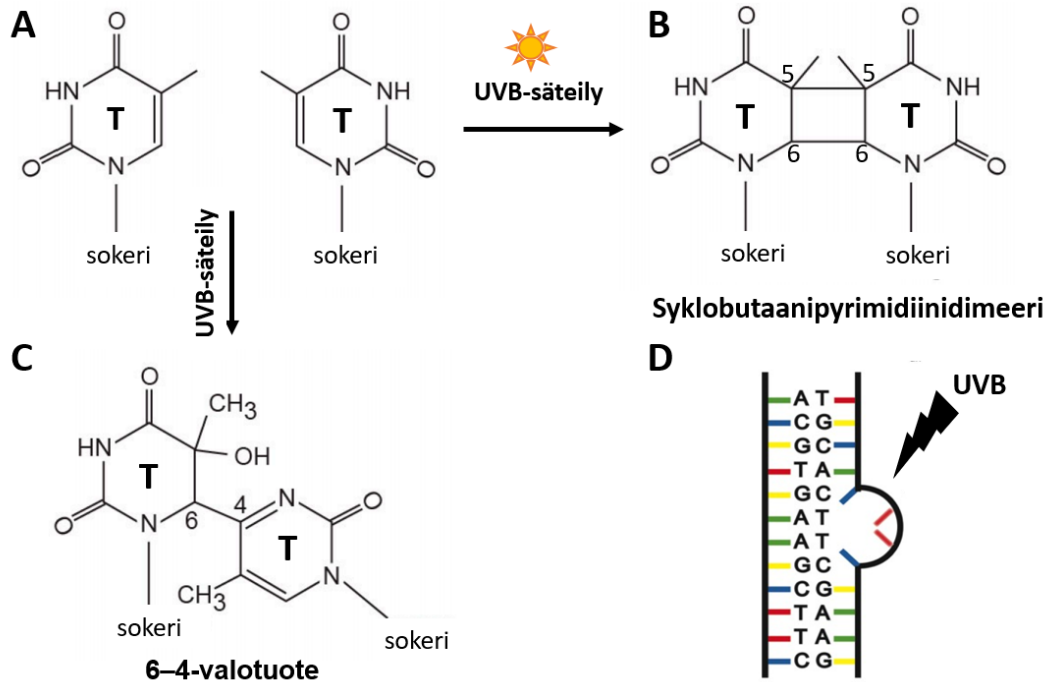
Ihon punoituksen intensiteetti riippuu useista tekijöistä, kuten UV-säteilyn aallonpituudesta ja saadusta annoksesta, henkilön geneettisestä herkyydestä UV-säteilylle sekä altistuskohdasta iholla (Nikkola 2021). Ihon punoitusherkkyttä voidaan kuvata MED-arvolla (Minimal erythema dose). Se osoittaa pienimmän UVB-säteily määrän, joka aiheuttaa ihon vähäisen punoituksen 24–48 tuntia altistuksen jälkeen. Lisäksi eri ihotyypit on luokiteltu Fitzpatrickin kuuteen kategoriaan (I–VI), jotka perustuvat yksilöiden taipumukseen ruskettua ja palaa (D'Orazio ym. 2013). Pääsääntöiset geneettiset tekijät, jotka vaikuttavat ihon UV-herkyyteen, ovat epidermiksen melaniinin määrä ja tyyppi. Melaniinia on kahta tyyppiä: tummapigmenttistä eumelaniinia, joka suojaa tehokkaasti UV-foto-neilta sekä säteilyä läpäisevää feomelaniinia, jolla on vaaleampi pigmentti (D'Orazio ym. 2013). MED-arvo ja kyky sietää UVB-säteilyä, ovat suurimmat tummaihoisilla henkilöillä, joilla epidermiksen eumelaniini suojaa ihoa palamiselta ja ihosyövän synnyltä (D'Orazio ym. 2013).

2.3.2 DNA-vauriot ihosoluissa

UVB-säteily sisältää tarpeeksi energiaa tunkeutuakseen epidermikseen ja jossain määrin myös dermikseen, mikä aiheuttaa DNA-vaurioita keratinosyyteissä, melanosyyteissä ja muissa ihosoluissa (Sun ym. 2018). Vuorovaikutus UVB-säteilyn ja DNA:n välillä perustuu pyrimidiiniemäksiin, sytosiiniin (C) ja tymiiniin (T), jotka absorboivat UVB-säteitä (Budden & Bowden 2013). Tämä synnyttää solujen DNA:han pääsääntöisesti kahdentyyppisiä DNA-vaurioita: syklobutaanipyrimidiinidimeerejä (Cyclobutane pyrimidine dimers, CPD) ja 6–4-valotuotteita (6–4 Photoproducts, 6–4 PP) (D'Orazio ym. 2013). Näistä käytetään yhteisnimitystä valotuotteet, ja ne syntyvät DNA-juosten dipyrimidiinejä (CC, CT, TT, TC) sisältäviin kohtiin, joista tyypillisimpiä ovat tymiinistä koostuvat TT- ja CT-dimeerit (Budden & Bowden 2013).

Valotuotteet syntyvät, kun UVB-säteily katkaisee kahden vierekkäisen pyrimidiiniemäksen sisäisiä kaksoissidoksia ja muodostaa sitten uusia ja epänormaaleja kovalenttisia sidoksia niiden välille

(D’Orazio ym. 2013). CPD on 4-hiilinen syklobutyylirengas, joka muodostuu, kun vierekkäisten pyrimidiinirenkaiden välille syntyy kaksi ylimääräistä kovalenttista sidosta (Budden & Bowden 2013). 6–4-valotuotteessa pyrimidiinirenkaiden väliin muodostuu yksi uusi sidos renkaiden neljännen ja kuudennen hiilen välille (Dakup & Gaddameedhi 2017). Syntyneet vauriot muuttavat DNA-heliksin kolmiulotteista rakennetta, mikä estää DNA:n replikaatiota ja transkriptiota sekä normaalia emäspariutumista (D’Orazio ym. 2013, Kemp ym. 2017). Kuva 2 esittää valotuotteiden rakenteen.



Kuva 2: UVB-säteilyn aiheuttamien valotuotteiden rakenteet. (A) Tymiinin (T) kemiallinen rakenne (B) TT CPD:n kemiallinen rakenne. UVB-säteily vuorovaikuttaa saman DNA-juosteen viereisten pyrimidiinimästen kaksoissidosten kanssa ja luo kaksi uutta kovalenttista sidosta niiden välille. (C) TT 6–4-valotuotteen rakenne. Kovalenttinen sidos muodostuu vierekkäisten pyrimidiinirenkaiden karbonyyliryhmän ja kaksoissidoksen välille. (D) Syntyneet valotuotteet taivuttavat DNA-juostetta normaalista poikkeavasti ja estävät replikaatiota ja transkriptiota. G = Guaniini, A= Adeniini. Kuva on rakennettu Budden & Bowden (2013) ja Kemp ym. (2017) pohjalta.

Korjaamatta jäädessään valotuotteet voivat johtaa UVB-säteilylle tyypillisiin C > T- ja CC > TT-nimikkomutaatioihin, jotka toimivat luotettavina merkkeinä UV-säteilyn aiheuttaman ihosyövän, kuten melanooman, tunnistamisessa (Dakup & Gaddameedhi 2017, Sun ym. 2018). CPD:t muodostavat jopa 80 % syntyneistä valotuotteista ja ovat hitaampia korjata, ja siksi huomattavasti useammin näiden mutaatioiden lähteitä (Budden & Bowden 2013). Korjausmekanismeista valotuotteiden poistamisesta huolehtii nukleotidien poistoon erikoistunut koneisto (Dakup & Gaddameedhi 2017).

2.4 DNA-vaurioiden aktivoima vaste soluissa

Ihon epiteeli on yksi nopeimmin jakautuvista kudoksista ihmiskehossa, ja siksi jakautumisrytmin ylläpitämiseksi tarvitaan mekanismi DNA-vaurioiden varalle (Dakup & Gaddameedhi 2017). UVB-säteilyn synnyttämät valotuotteet käynnistävät epidermiksen soluissa DNA-vauriovasteen (DNA

damage response, DDR), joka johtaa kaskadireaktioiden kautta solusyklin pysäyttämiseen tiettyihin tarkastuspisteisiin, DNA:n korjaukseen ja ohjelmoituun solukuolemaan eli apoptoosiin (Sancar ym. 2010, Dakup & Gaddameedhi 2017). Merkittävä yhteinen tekijä näiden kolmen reitin välillä on ATR-kinaasi (Ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase), joka käynnistää DNA-vauriovasteen tunnistessaan valotuotteesta syntyneen solustressin (Musich ym. 2017). DNA-vauriovaste on tärkeä mekanismi ihosolujen mutatoitumisen ja ihosyövän kehittymisen estämisessä (Sun ym. 2018).

2.4.1 Solusyklin pysäyttäminen

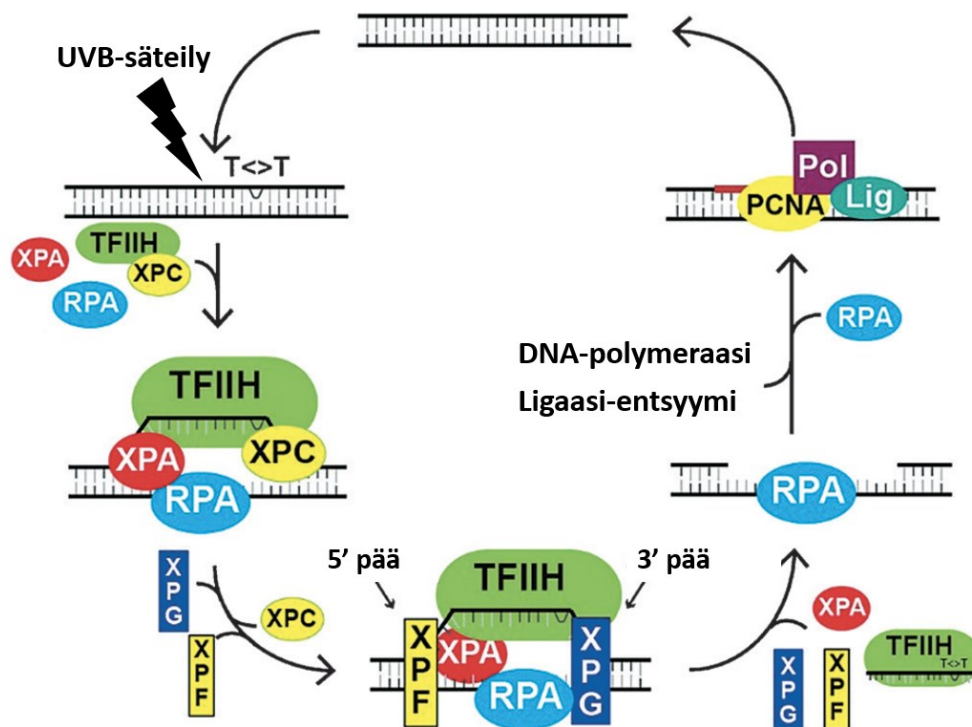
DNA-vaurion tarkastuspisteet (DNA damage checkpoints, DDC) ovat DNA-vaurion, kuten UVB-valotuotteen, aktivoima suojelumekanismi, joka joko hidastaa solusykliä vaurion korjaamisen ajaksi tai pysäyttää syklin kokonaan. Pääsääntöiset pysäyttämiskohdat ovat ennen replikaatiota ja sen aikana (G1/S ja intra-S) sekä ennen mitoosia (G2/M) (Sancar ym. 2010). DNA-vauriovastetta aktivoiva ATR-sensorikinaasi havaitsee vauriokohdan apuproteiiniensa avulla, jolloin signaali johtaa CHK1:n (Checkpoint kinase 1) aktivaatioon. Yksi apuproteiineista on ATRIP (ATR-interacting protein), joka osallistuu vaurion tunnistamiseen ja aktivoi ATR-kinaasin (Sancar ym. 2010, Kemp ym. 2017). CHK1 fosforyloi edelleen useita proteiineja, kuten CDC25-fosfaatin, joka pysäyttää solusyklin G2/M-tarkastuspisteeseen. Samaan tapaan c-MYC- ja WEE1-proteiinit estävät solusyklin etenemistä G1/S- ja G2/M-pisteissä (Sancar ym. 2010, Dakup & Gaddameedhi 2017).

CHK1 aktivoi myös p53-proteiinin (Musich ym. 2017). p53 edistää *p21*-geenin transkriptiota, jolloin solusyklin eteneminen estyy G1/S- ja intra-S-pisteissä (Sancar ym. 2010). ATR-CHK1-p53-signaalireitti aktivoi ja tehostaa solusyklin pysäyttämisen rinnalla DNA:n korjausta ja solujen apoptoosia (Dakup & Gaddameedhi 2017). Normaaleissa soluissa p53-proteiinin tasot ovat matalat johtuen MDM2-proteiinista, joka edistää sen hajottamista proteosomeissa (Gaddameedhi ym. 2015). DNA-vaurion seurauksena ATR-CHK1-riippuvainen p53-aktivaatio estää MDM2:n toimintaa, mikä havaitaan UVB-valituksen jälkeen korkeampina p53-tasoina (Gaddameedhi ym. 2015).

2.4.2 DNA-vaurioiden korjaus

UVB-säteilyn synnyttämät valotuotteet korjataan mahdollisimman nopeasti mutaatioiden syntymisen estämiseksi. Ihosoluissa valotuotteita korjaa pääsääntöisesti konservoitunut nukleotidin poistomekanismi (Nuclear excision repair, NER). Siinä on neljä päävaihetta: UVB-valotuotteen havaitseminen, vaurioituneen juosteen poistaminen, DNA-synteesi eli poistetun alueen uudelleen rakentaminen sekä rakennetun juosteen liittäminen (Dakup & Gaddameedhi 2017). NER-mekanismien ytimen muodostaa ihmisillä kuusi korjaustekijää: RPA (Replication protein A), XPA (Xeroderma pigmentosum group A), XPC, XPG, XPF ja TFIIH (Transcription factor II H) (Sancar ym. 2010, Budden & Bowden 2013).

NER-mekanismin aloittavat XPA-, RPA- ja XPC-proteiinit, jotka tunnistaessaan vauriokohdan rekrytoivat TFIIH-proteiinikompleksin DNA-korjaukseen. TFIIH-kompleksin helikaasientsyymit XPB ja XPD avaavat DNA-heliksin, jolloin XPG- ja XPF-nukleaasit katkaisevat vaurioituneesta DNA-juosteesta noin 30 nukleotidin mittaisen oligomeerin. Jäljelle jäänyt yksijuosteinen DNA pysyy peittyneenä RPA-proteiinilla, mikä luo signaalin poistetun DNA-juosteen uudelleen rakentamiseksi ja liittämiseksi (Sancar ym. 2010, Sancar 2016). NER-korjausmekanismin tärkeydestä kertoo geneettinen Xeroderma Pigmentosum (XP) -sairaus, jossa mutaatiot korjaustekijöissä aiheuttavat sairastuneelle voimakasta herkkyyttä UV-säteilylle ja tuhatkertaisen riskin melanooman kehittymiselle (Sancar 2016). Kuva 3 esittää korjausmekanismin toiminnan.



Kuva 3: NER-mekanismin toiminta. UVB-säteilyn synnyttämä valotuote tunnistetaan ja DNA-juoste avataan XPA:n, XPC:n, RPA:n ja TFIIH:n helikaasiaktiivisuuden toimesta, jolloin XPF ja XPG katkaisevat DNA-juosteen sekä 5' että 3' suuntaan ja vapauttavat noin 30 nukleotidin mittaisen oligomeerin. DNA-polymeraasi ϵ tai δ rakentaa uuden juosteen, ja ligaasi liittää sen osaksi DNA:ta. Solun tuma-antigeeni (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) edistää DNA-synteesiä. Pol = polymeraasi, Lig = ligaasi. Kuva muokattu Sancar (2016) pohjalta.

ATR-CHK1-p53-signaalireitin p53-proteiini aktivoi NER-mekanismin, kun valotuotteita syntyy DNA:han (Dakup & Gaddameedhi 2017, Sun ym. 2018). DNA-vaurioaste on laaja verkosto, jossa NER-mekanismi voi myös itse aktivoitua tunnistaessaan vaurion. Tällöin DNA:n korjauksessa syntyvä yksijuosteinen DNA ja siihen kiinnittynyt RPA toimivat signaalina ATRIP-ATR-kompleksin aktivoitumiselle ja edelleen solusyklin pysäyttämiseksi (Kemp ym. 2017). CHK1-kinaasin on osoitettu olevan merkittävä tekijä myös XPA-proteiinin aktivoinnissa ja edelleen NER-mekanismin toiminnan edistäjänä (Musich ym. 2017).

2.4.3 Apoptoosi

DNA-vauriovaste johtaa apoptoosiin, jos UVB-säteilyn aiheuttama DNA-vaurio on liian laaja korjattavaksi (D’Orazio ym. 2013, Musich ym. 2017). Apoptoosia tapahtuu ihon palaessa, ja tämä reaktio suojaa vaurioituneiden solujen kehittymistä syöpäsoluiksi (Gaddameedhi ym. 2015). UVB-välitteinen apoptoosi jaetaan kahteen biokemialliseen reittiin, sisäiseen ja ulkoiseen apoptoosiin. Sisäinen reitti aktivoituu ATR-CHK1-p53-signaalikaskadin kautta vasteena valotuotteille, jolloin p53 lisää pro-apoptoottisten tekijöiden, *Bax* ja *Bak*, ilmentymistä. Nämä tekijät vapauttavat sytokromi c:tä mitokondriosta, mikä aktivoi solun apoptoosiin johtavia kaspasientsyymejä (Sancar ym. 2010). Ulkoista reittiä sen sijaan säätelee tuumorinekroositekijä α (Tumor necrosis factor α , TNF- α), joka sitoutuu UVB-valotuotteen seurauksena solun pinnalla oleviin kuolemanreseptoreihin. Tästä syntynyt signaali johtaa solun sisällä kaspasien aktivointiin ja solun kuolemaan. (Sancar ym. 2010)

p53-proteiinilla on merkittävä rooli ihon punoituksen ja siihen liittyvän tulehdusreaktion, solusyklin pysäyttämisen, DNA:n korjaamisen sekä apoptoosin säätelyssä ihmisten ihosta (Sun ym. 2018, Gaddameedhi ym. 2015). Tämän takia UVB-säteilystä tekee haitallisen sen taipumus muodostaa nimikkomutaatioita juuri *p53*-geenissä, mikä häiritsee solun normaalia toimintaa DNA-vaurioita vastaan (Dakup & Gaddameedhi 2017). Näitä *p53*-mutaatioita löydetään normaalista ihosta aurin-gonvalolle altistumisen jälkeen, ja ne ovat yhteydessä lähes kaikkiin ihosyöpiin (Sun ym. 2018).

3. VUOROKAUSIKELLO JA UVB-SÄTEILYN AIHEUTTAMAT MUUTOKSET IHOSSA

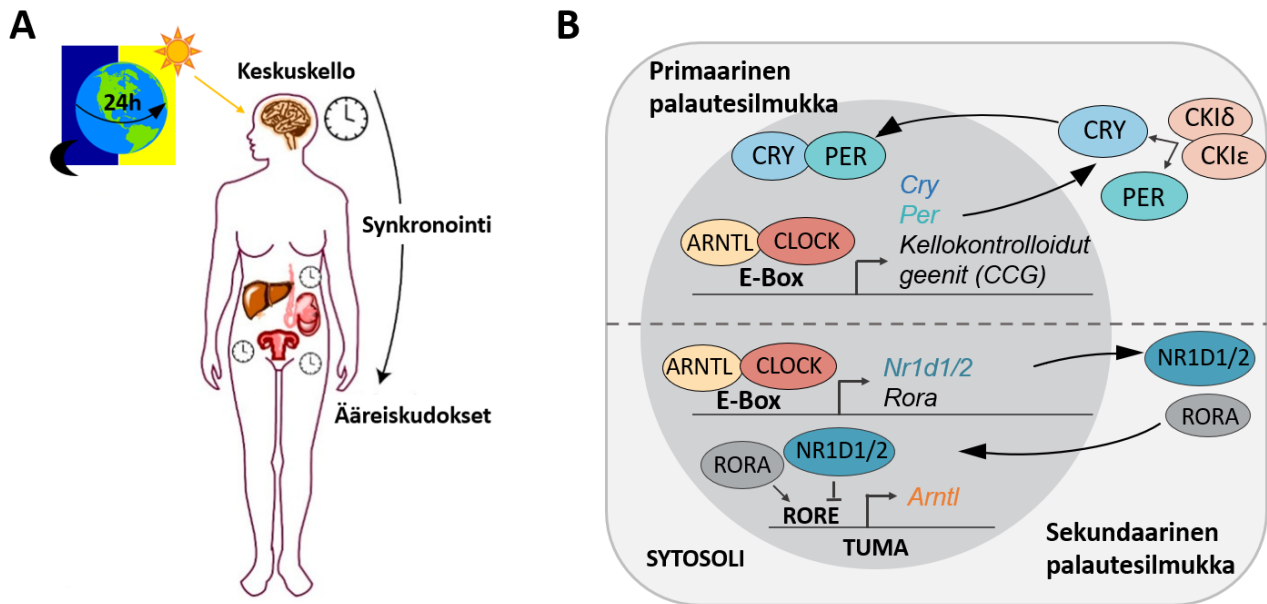
Vuorokausikello on aikaa mittaava järjestelmä, joka tahdistaa koko elimistön fysiologisia toimintoja, kuten hormonituotantoa, unirytmia ja kehon lämpötilaa, noudattamaan noin 24 tunnin mittaista rytmiä (Morgan ym. 2019). Tässä hierarkkisessa järjestelmässä hypotalamuksen suprakiasmaattisessa tumakkeessa (SCN) sijaitseva keskuskello reagoi näköhermon kautta ympäristöstä saapuvaan näkyvään valoon ja tahdistaa eli asettaa kellon oikeaan aikaan (Matsui ym. 2016). Keskuskello synkronoi ääreiskudokset, kuten maksan, keuhkot ja ihon sekä näiden kudosten solut, kanssaan samaan rytmiin hormonien, kuten melatoniinin, ja hermoston signaalien kautta (Kuva 4) (Morgan ym. 2019). Näin koko elimistö toimii vuorokauden ajasta riippuvalla tavalla. Merkittävää on, että ilman keskuskelloa tulevaa synkronointiakin kaikissa ihosoluissa toimii autonominen kello ja ilmenee noin 24 tunnin rytmi, joka voi itse säätyä ympäristön ärsykkeistä, kuten lämpötilan muutoksista ja UV-säteilystä. Onkin siis mahdollista, että myös UVB-säteily voi säätää vuorokausikellon toimintaa ja rytmiä ihosoluissa (Matsui ym. 2016, Nikkola ym. 2019, Nikkola 2021).

Ihossa vuorokautista rytmisyyttä on osoitettu lähes kaikissa sen toiminnoissa: ihosolujen jakautumisessa, kasvussa ja erilaistumisessa, verenkierrassa, ihon pH:n ja lämpötilan vaihteluissa sekä talin tuotannossa (Matsui ym. 2016, Nikkola ym. 2018). Lisäksi vuorokausikellon on osoitettu säätelevän UVB-säteilyn aktivoimia vasteita, kuten DNA-vaurioiden korjausta sekä solusyklin pysäyttämistä, apoptoosia ja ihon punoitusreaktiota (Sarkar & Gaddameedhi 2018). Näistä yhteyksistä ei kuitenkaan ihmisihossa vielä tiedetä paljoa, joten tutkimukset ovat pääsääntöisesti keskittyneet hiirimalleihin, jotka luovat hyvän pohjan myös ihmisiin perustuvien tutkimusten suunnitteluun.

3.1 Vuorokausikellon molekulaarinen rakenne

Molekyylitasolla vuorokautiset oskillaatiot luodaan sekä suprakiasmaattisen tumakkeen että ääreiskudosten soluissa autonomisella transkriptio-translaatio palautejärjestelmällä (Transcription-translation feedback loop, TTFL). Järjestelmä koostuu primaarisesta ja sekundaarisesta palautesilmukasta, jotka ylläpitävät suurin piirtein 24 tunnin mittaista rytmiä monien geenien ilmentymisessä (Sancar 2016, Sancar & Van Gelder 2021). Kellon ytimen ja samalla primaarisen silmukan muodostavat ihosoluissa seitsemän kelloproteiinia: CLOCK (Circadian locomotor output cycles kaput), ARNTL (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like), CRY1 ja CRY2 (Cryptochrome 1, 2) sekä PER1, PER2 ja PER3 (Period 1,2,3) (Dakup & Gaddameedhi 2017). Palautesilmukan toiminta alkaa, kun ARNTL-CLOCK-dimeeri muodostuu ja sitoutuu *Cry*- ja *Per*-geenien promoottorialueelta löytyvään E-box-sekvenssiin (CACGTG tai CACGTT) edistään niiden transkriptiota. Syntyvät CRY- ja PER-proteiinit kulkevat sytoplasmaan ja siirtyvät sieltä viivästyksen jälkeen edelleen tumaan inhiboimaan ARNTL-CLOCK-kompleksin toimintaa ja samalla omaa ilmentymistään (Sarkar & Gaddameedhi 2018). PER- ja CRY-proteiineja hajottavat sytosolissa CKI ϵ - ja CKI δ -proteiinit (Casein kinase 1 ϵ ja δ), jolloin PER ja CRY ilmentyvät vuorokausirytmisissä (Morgan ym. 2019). Samaan tapaan ARNTL-CLOCK-dimeeri säätelee monien muiden geenien transkriptiota, jolloin niitä kutsutaan kellokontrolloiduiksi geneiksi (Clock-controlled genes, CCG) (Matsui ym. 2016).

Sekundaarinen palautesilmukka avustaa ja säätelee primaarisen silmukan toimintaa. Sen muodostavat NR1D1 ja 2 (Nuclear receptors REV-ERB α ja β) ja RORA (Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha), jotka aktivoivat ja inhiboivat *Arntl*-geenin transkriptiota ja säätelevät siten kellon tahtia (Kuva 4) (Morgan ym. 2019). Palautejärjestelmien lisäksi vuorokausikelloon kuuluu erilaisia apuproteiineja, kuten TIM-proteiini (Timeless) (Lamia 2017). Vuorokausikello säätelee tällä mekanismilla jopa 10 %:a ihmisen geneistä ja muodostaa kudoksen soluihin geenien kudosspesifisiä ilmentymismalleja, joita keskuskello edelleen synkronoi. Tämän suuren geenimäärän perusteella on oletettu, että kellon häiriöillä voi olla suuri merkitys syövän kehittymisessä (Matsui ym. 2016). Ihossa geenien vuorokautista oskillointia on osoitettu keratinosyyteissä, melanosyyteissä ja muissa ihosoluissa (Sun ym. 2018). Kuva 4 esittää kellon toiminnan.



Kuva 4: Vuorokausikellon anatominen ja molekulaarinen rakenne. (A) Keskuskello lähettää signaaleja ääreiskelloille varmistaakseen, että kaikki yksittäisen elimen solut ovat synkronoituja toistensa ja ulkoisen Maan pyörimisestä syntyvän rytmien kanssa. **(B)** Soluissa vuorokausikellon primaarisessa silmukassa *Per*- ja *Cry*-geenien transkriptiota ohjaa ARNTL-CLOCK-heterodimeeri. CRY ja PER siirtyvät tumaan ja estävät dimeerin toimintaa. Sekundaarisessa silmukassa ARNTL-CLOCK-ohjattu transkriptio kasvattaa NR1D1/2- ja RORA-tasoja, joista RORA edistää *Arntl*-geenin transkriptiota ja NR1D1/2 laskee sitä. Proteiinitasojen lasku CK1ε:n ja CK1δ:n toimesta mahdollistaa uuden 24 tunnin syklin alkamisen. RORE = ROR-elementti *Arntl*-geenin promoottorialueella. Kuvat muokattu Sancar & Van Gelder (2021) ja Morgan ym. (2019) pohjalta.

3.2 Vuorokausikello ja ihon punoitusreaktio

Valotuotteiden aiheuttaman tulehduksen näkyvin merkki on ihon punoitus eli palaminen (Nikkola 2021). Hiirillä ja ihmisillä näiden UVB-säteilyn aiheuttamien useiden palamistapahtumien on osoitettu olevan yhteydessä melanooman ja okasolusyövän kehittymiseen (Gaddameedhi ym. 2015). Koska hiirillä UV-altistuksen ajankohta vaikuttaa ihosyövän syntyyn, on näin ollen pyritty selvittämään yhteys vuorokausikellon ja UVB-säteilyn aiheuttaman palamisvasteen välillä hiiren ja ihmisten ihossa (Gaddameedhi ym. 2011, Gaddameedhi ym. 2015, Nikkola ym. 2018).

3.2.1 Hiiren iho

Karvattomilla hiirillä ihon palamisessa ja siihen liittyvässä apoptoosissa esiintyy vuorokauden ajasta riippuvaa vaihtelua. Aamulla UV-säteilyllä valotettujen hiiren ihossa kehittyi voimakkaampi punoitusvaste verrattuna iltapäivällä valotettuihin hiiriin (Gaddameedhi ym. 2015). Hiiren herkkyttä ihon palamiselle säätelee siis UV-altistuksen kellonaika, ja tämä herkkyys on vuorokausirytmiltään samanlainen kuin hiiren herkkyys ihosyövän kehittymiselle (Gaddameedhi ym. 2011). Vuorokausivaihteluun johtaa ATR-CHK1-p53-signaalireitti, joka aktivoituu CRY2-proteiinin välityksellä

voimakkaasti aamulla, ja säätelee siten p53-proteiinin kautta ihon punoitusreaktion vuorokausirytmää (Gaddameedhi ym. 2015, Sancar & Van Gelder 2021).

Vuorokausikello säätelee ihon punoitusvastetta välittäen sytokiinien tuotantoa. Aamulla UV-säteilylle altistettujen hiiren ihossa tulehdusreaktiota voimistavien proinflammatoristen sytokiinien, kuten TNF- α :n ja interferoni γ :n (IFN- γ), tasot nousevat merkittävästi ilta-altistettuihin hiiriin verrattuna. Lisäksi monien interleukiinien (IL) määrä lisääntyy ihossa aamuvalotuksen jälkeen. Punoitusvaste ja sytokiinien tuotanto siis noudattavat hiiren ihossa tiettyä vuorokautista rytmiä, ja herkkyys palamiselle on suurin aamutunteina. (Gaddameedhi ym. 2015)

3.2.2 Ihmisiho

Koska hiiret ovat yöeläimiä ja noudattavat vastakkaista valve-uni-rytmiä ihmiset kanssa, on luotu hypoteesi, jonka mukaan ihmisten vuorokausikello toimisi päinvastaisessa rytmin vaiheessa (Gaddameedhi ym. 2011). Tämän hypoteesin pohjalta on ehdotettu, että ihmiset olisivat alttiimpia ihon palamiselle myöhään iltapäivällä kuin aamulla (Sarkar & Gaddameedhi 2018). Nikkola ym. (2018) osoittivat tämän hypoteesin pitävän paikkaansa *in vivo*: UVB-säteilyn aiheuttama punoitusreaktio on ihmisen ihossa voimakkaampi illalla kuin aamulla. Päinvastaisesti CRY2:n määrä on ihossa suurempi aamulla, ja henkilöillä, joilla henkilökohtaiset CRY2-tasot ovat korkeat, ihon punoitus on vähäisempää (Nikkola ym. 2018). Tämä voi johtua CRY2:n yhteydestä c-MYC-proteiiniin, joka aktivoi ihosolujen solusykliä ja apoptoosia. CRY2 säätelee c-MYC-proteiinin hajotusta, jolloin korkea CRY2-määrä edistää c-MYC-proteiinin hajottamista ja saattaa vähentää ihon palamiseen liittyvää punoitusta ja solujen kuolemaa (Sarkar & Gaddameedhi 2018). On siis mahdollista, että CRY2:n säädely vuorokausirytmii ja korkeammat tasot aamulla suojaavat ihoa palamiselta (Nikkola 2021). Sytokiineilla varsinaista vuorokausirytmää ei ihmisihossa ole havaittu, vaikkakin UVB-säteily lisää IL-1:n, IL-6:n ja TNF- α :n ilmentymistä (Nikkola ym. 2019).

Näyttäisi siis siltä, että vuorokausikello säätelee ihon palamista ja siihen liittyvää punoitusta myös ihmisihossa. Tämä vuorokausivaihtelu suojaa ihoa ja voi mahdollisesti liittyä ihon syöpäalttiuden ajankohtaan. Jatkotutkimusta tästä yhteydestä vaaditaan vielä runsaasti, sillä ihmisten monimuotoiset ihotyypit ja erot yksilöiden vuorokausikellojen välillä tekevät tulosten yleistämisestä haastavaa. (Nikkola ym. 2018, Sarkar & Gaddameedhi 2018)

3.3 Vuorokausikello ja solusyklin pysäyttäminen

DNA-vauriovasteen aktivoituessa vasteena UVB-valotuotteille solusykli pysäytetään sen eri vaiheisiin, niin kutsuttuihin tarkastuspisteisiin, tai sitä hidastetaan DNA:n korjaamisen ajaksi (Sancar ym.

2010). Vuorokausikello säätelee tätä DNA-vaurion tarkastuspistevastetta kahdella tavalla: transkriptiotasolla kontrolloimalla tarkastuspistegeenien transkriptiota sekä vuorovaikuttamalla suoraan tarkastuspisteproteiinien kanssa (Sancar ym. 2010, Sancar & Van Gelder 2021).

3.3.1 Hiiren iho

Vuorokausikellon suora yhteys tarkastuspistevasteeseen välittyy TIM-proteiinin (Timeless) kautta, joka yhdistää vuorokausikellon ATR-CHK1-signaalireittiin (Sancar ym. 2010). TIM-proteiini sitoutuu sekä CRY1-kelloproteiiniin että ATRIP-ATR-kompleksiin, jolloin solusyklin pysähtyminen tapahtuu tietyssä vuorokausirytmisissä CRY1:n mukaan. Tämä luo vuorokautisen rytmien myös ATR-kinaasin kohdeproteiinien, CHK1:n ja p53:n, aktivaatiolle (Kang & Leem 2014). Näitä löydöksiä tukevat Gaddameedhi ym. (2015) hiiritutkimukset, joiden mukaan CHK1-proteiini aktivoituu voimakkaammin aamulla UVB-valotettujen hiirien ihosta verrattuna iltaryhmään. Tämä osoittaa ATR-kinaasin aktivaation CRY1-proteiinin toimesta aamulla ja vuorokausikellon osuuden UVB-säteilyn aiheuttaman DNA-vauriovasteen säätelyssä hiirillä (Kang & Leem 2014).

Epäsuorasti vuorokausikello yhdistyy UVB-säteilyn aktivoimaan tarkastuspistevasteeseen säätelemällä siihen osallistuvien geenien transkriptiota. Tällaisia kellokontrolloituja geenejä ovat hiirillä ainakin *c-Myc*, *p21*, *Wee1* ja *Nono* (Sancar ym. 2010, Sancar & Van Gelder 2021). *P21*-geenin transkriptiota säätelee vuorokausirytmisissä NR1D1/2/RORA-palautesilmukka (Sancar ym. 2010). Tämän kellon välittämän säätelyn ohella p21:n tasoissa on vuorokautista vaihtelua myös p53-proteiinin kautta. Aamulla UVB-valotetuilla hiirillä p53:n ja sen säätelemän p21-proteiinin tasot ovat iltaltistusta merkittävästi suuremmat, joten solusykli pysäytetään aamulla tulleiden valotuotteiden seurauksena tehokkaammin (Gaddameedhi ym. 2015). Samaan tapaan myös *Wee1*-, *c-Myc*- ja *Nono*-geenit oskilloivat CRY- ja PER-kelloproteiinien määräämässä tahdissa (Sancar ym. 2010, Morgan ym. 2019, Sancar & Van Gelder 2021).

3.3.2 Ihmisiho

Hiirien tapaan myös ihmisillä vuorokausikellon suora yhteys vauriovasteeseen välittyy TIM-proteiinin kautta (Dakup & Gaddameedhi 2017). Ihmissoluissa TIM sitoutuu sekä CRY2-proteiinin että ATR-ATRIP-kinaasikompleksin kanssa ja säätelee siten CHK1-kinaasin aktivaatiota CRY2-proteiinin määräämässä vuorokausirytmisissä (Sancar & Van Gelder 2021). Tämän myötä myös CHK1:n aktivoimien proteiinien, kuten p53:n, ilmentyminen voisi olla syklistä. Sun ym. (2018) kuitenkin osoittivat, että ARNTL- tai CLOCK-proteiinin häiriö ei vaikuta p53:n tai CHK1:n aktivaatioon HaCaT-keratinosyyttisolulinjassa. Tämä antaa viitteitä siitä, että hiiristä poiketen vuorokausikellolla ei olisi vaikutusta UVB-valotuotteiden aktivoimaan tarkastuspistevasteeseen. Toisaalta primaarisissa keratinosyyteissä CLOCK-proteiinin häiriö vähentää p53:n fosorylaatiota, mikä osoittaa, että

CLOCK voisi kontrolloida vastetta (Sun ym. 2018). Huomattavaa on siis, että eri solutyypeissä kellogeeneillä on erilainen merkitys solusyklin etenemisen säätelyssä. (Sun ym. 2018)

Sekä hiiren että ihmisten ihossa kellon häiriön on osoitettu edistävän solujakautumista, mikä altistaa häiriintyneet solut syövän kehittymiselle (Geyfman ym. 2012, Sun ym. 2018). Lisäksi hiiren tavoin myös ihmisillä on useita kellokontrolloituja geenejä kuten *p21* ja *c-Myc*, jotka säätyvät vuorokausikellon rytmissä (Sancar & Van Gelder 2021). Sun ym. (2018) havaitsivat kellon häiriön laskevan *p21*-proteiinin tasoja ihmisen keratinosyyteissä, ja *c-MYC*-proteiinin vuorokautisen ilmentymisen häiriö voidaan usein liittää syövän kehittymiseen (Sancar & Van Gelder 2021).

3.4 Vuorokausikello ja DNA-vaurioiden korjaus

DNA-vaurioiden korjauksella on merkittävä rooli ihosyövän kehittämisessä, ja tämän takia sen yhteys vuorokausikelloon on yksi eniten tutkituista vuorovaikutuksista (Sancar & Van Gelder 2021). Yhteys on jo havaittu hiirillä, ja nyt tarkoituksena on selvittää ihmisillä, milloin iho on alttein UVB-säteilyn synnyttämille vaurioille (Bee ym. 2015).

3.4.1 Hiiren iho

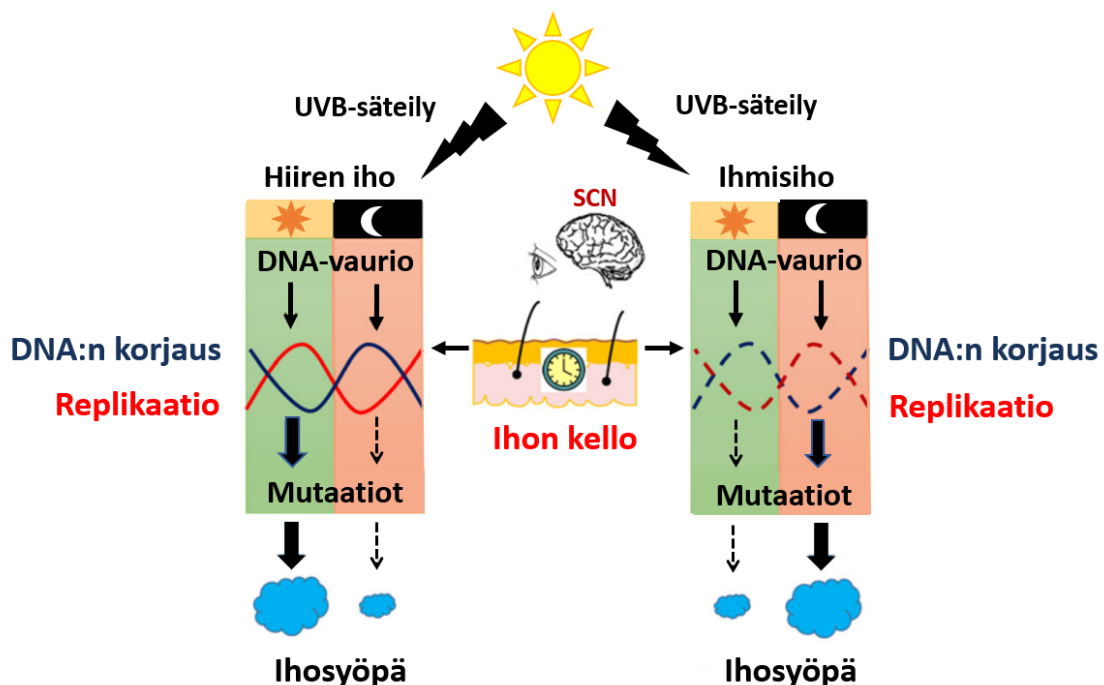
Hiiritutkimukset ovat osoittaneet, että vuorokausikello säätelee NER-mekanismia hiiren epidermissä. Säätely perustuu kellokontrolloituun *Xpa*-geeniin, jonka proteiinituote XPA on korjausvas-teen nopeuden määräävä tekijä. *Xpa* ilmentyy ihossa vastakkaisessa rytmissä *Cry1*-geenin kanssa niin, että sen RNA- ja proteiinitasot ovat kaikkein matalimmat aikaisin aamulla (kello 5.00) ja suurimmillaan iltapäivällä (kello 17.00). Tämän johdosta koko NER-mekanismi noudattaa samanlaista päivittäistä jaksollisuutta eli valotuotteita korjataan aktiivisimmin myöhään iltapäivällä UVB-valote- tuissa hiirissä. Tällainen korjausrytmi menetetään kuitenkin *Cry1/2*-mutatoiduilla hiirillä, mikä osoit- taa vuorokausikellon merkittävän roolin sen säätelyssä. (Gaddameedhi ym. 2011)

Korjausaktiivisuus hiiren keratinosyyteissä kulkee ARNTL-tasojen kanssa samassa vaiheessa, jo- ten ARNTL-proteiinin määrän ollessa minimissä, ovat solut herkimpiä valotuotteiden kertymiselle (Geyfman ym. 2012). Valotuotteiden kasaantuminen aamulla johtaa ATR-CHK1-p53-kaskadireitin aktivoitumiseen, mikä pysäyttää hiirillä myös solusyklin tehokkaimmin aamutunteina (Gadda- meedhi ym. 2015). Merkittävää on, että korjauksen jaksollisuus on yhteydessä hiirillä todettuun syöpäalttiuteen: hiirille, joita valotetaan jatkuvasti UVB-säteilyllä aikaisin aamulla (kello 5.00), ke- hittyi invasiivinen okasolusyöpä viisi kertaa todennäköisemmin verrattuna iltapäivällä valotettuihin hiiriin, joilla korjaus on valotuksen aikana maksimissaan (Gaddameedhi ym. 2011, Sancar 2016). Lisäksi Geyfman ym. (2012) osoittivat DNA-replikaation noudattavan vuorokautista rytmiä hiirten ihossa. Replikaatio kulkee päinvastaisessa rytmissä DNA:n korjauksen kanssa, mikä myös selittää

aamutunteihin painottuvaa syöpäherkkyyttä. UVB-säteilyn karsinogeenisyys on siis vuorokauden ajasta riippuvaista hiirten ihossa (Dakup & Gaddameedhi 2017).

3.4.2 Ihmisiho

Samaa rytmisyyttä valotuotteiden korjaukselle on pyritty etsimään ihmisiholta. Koska hiiret noudattavat päinvastaista vuorokausirytmää ihmisten kanssa, muodostivat Gaddameedhi ym. (2011) hiirillä saatujen tulosten perusteella mallin ihmisihossa toimivasta vuorokausirytmistä (Kuva 5). Tämän hypoteettisen mallin mukaan DNA:n korjaus ja replikaatio rytmittyvät käänteisesti, jolloin ihmisen epidermiksessä korjausaktiivisuus olisi aamutunteina iltaa voimakkaampi. Näin ollen riski ihosyövän kehittymiselle kasvaisi ilta-altistuksen jälkeen. Tätä vuorokausirytmisyyttä ei kuitenkaan ole vielä todistettu ihmisihossa *in vivo* (Dakup & Gaddameedhi 2017). Kuva 5 esittää tämän mallin.



Kuva 5: Karsinogeneesimalli. Hypoteettinen malli esittää, että vuorokauden aika on merkittävä tekijä hiirien ja ihmisten ihosyövän kehittymisen kannalta. Hiirillä UVB-säteilyn aiheuttamilla DNA-vaurioilla on aamulla suurempi potentiaali aiheuttaa ihosyöpää, kun korjausmekanismi toimii hitaasti ja DNA-synteesi on tehokkaimmillaan. Koska ihmiset noudattavat päinvastaista vuorokausirytmää, tämä hypoteesi esittää näiden mekanismien kulkevan päinvastaisessa syklissä aiheuttaen suurimman syöpäalttiuden illalla saadulle UVB-säteilylle. SCN = suprakiasmaattinen tumake eli keskuskello. Kuva muokattu Dakup & Gaddameedhi (2017) pohjalta.

Hypoteesista riippumatta NER-mekanismien tehokkuudessa ja DNA:n herkkyudessa UV-valotuotteille on havaittu ihmisen fibroblasteissa tiettyä vuorokauden ajasta riippuvaa rytmisyyttä. Bee ym. (2015) osoittivat, että NER-järjestelmän toiminta muodostaa noin 24 tunnin mittaisen syklin, jonka aikana sen tehokkuus korreloi hiirien tavoin ARNTL-proteiinitasojen kanssa. Korjausmekanismien vuorokausirytmii ei heidän mukaansa kuitenkaan välity XPA-proteiinin kautta vaan mahdollisesti kellonäädellän kromatiinin rakenteen mukaan: valotuotteita korjataan tehokkaimmin, kun DNA:n

kromatiini on löysimmillään eli vuorokausikello säätelee NER-mekanismiin aktiivisuutta kontrolloimalla kromatiinin pakkautumista. (Bee ym. 2015)

3.5 Vuorokausikello ja apoptoosi

Vuorokausikello yhdistyy UVB-säteilyn aktivoimaan DNA-vauriovasteeseen myös säätelemällä vasteen viimeistä osaa, apoptoosia (Sancar ym. 2010, Dakup & Gaddameedhi 2017). Apoptoosi on tärkeä suojelumekanismi ihosyövän kehittymistä vastaan ja sen vuorokautisen rytmin selvittäminen voi mahdollisesti lisätä myös kliinistä ymmärrystä ihosyövän synnystä (Sancar & Van Gelder 2021). Tutkimukset kellon ja UVB-säteilyn aiheuttaman apoptoosin välillä ovat viime aikoina siirtyneet hiirimallien lisäksi ihmisen keratinosyytteihin (Sun ym. 2018).

3.5.1 Hiiren iho

Hiirien ihossa aamuinen UVB-säteily johtaa korkeampaan apoptoottiseen vasteeseen verrattuna hiirien ilta-altistukseen (Gaddameedhi ym. 2015). Tämä vaste on yhteneväinen sen kanssa, että DNA:n korjaus syklittyy iltaan ja replikaatio aamutunteihin (Gaddameedhi ym. 2011) (Kuva 5). Näin ollen aamulla matalan DNA-korjauksen aikana valotuotteet johtavat ihon palamisen ja solusyklin pysäyttämisen ohella myös ihosolujen lisääntyneeseen apoptoosiin. Vuorokausikellon roolin apoptoosin säätelyssä osoittaa myös se, että *Cry*- ja *Per*-mutatoiduissa hiirissä apoptoosin vuorokautiset erot häviävät (Gaddameedhi ym. 2015).

Kasvunrajoiteproteiini p53 säätelee apoptoosin käynnistämistä UVB-indusoiman DNA-vaurion seurauksena. Hiirillä apoptoosin sisäinen reitti yhdistyy vuorokausikelloon p53-proteiinin kautta, joka edistää apoptoosiin johtavien Bax- ja Bak-proteiinien ilmentymistä (Sancar ym. 2010). Vuorokaudenaika näyttäisi vaikuttavan p53:n ilmentymiseen ihossa siten, että sen tasot ovat aamulla iltaa korkeammat (Gaddameedhi ym. 2015). P53-proteiini ei kuitenkaan itse ole vuorokausisäädeltä kellon toimesta, vaan vaste välittyy aamulla lisääntyneen ATR-CHK1-p53-signaloinnin sekä laskeneiden MDM2-proteiinitasojen kautta. Ne mahdollistavat aamulla korkeammat p53-tasot edistäen ihon palamista ja solujen ohjausta apoptoosiin (Gaddameedhi ym. 2015). *Mdm2*-geenin ilmentymistä säätelee PER2-proteiini ja ATR-vaste välittyy TIM-kelloproteiinin kautta (Lamia 2017).

P53-proteiini ei ole luotettavin proteiini apoptoosin ajankohdan arviointiin, sillä sen määrää säätelevät ihon soluissa monet signaalireitit (Sancar ym. 2010). Apoptoosi voi tapahtua myös p53-riippumatonta reittiä pitkin vasteena UVB-säteilylle. Tätä osoittavat tulokset, joiden perusteella *Cry1/Cry2* sekä *p53*-mutatoiduissa soluissa herkkyys apoptoosiin kasvaa vasteena UV-säteilylle (Sancar ym. 2010, Sancar & Van Gelder 2021). Kasvanut apoptoosiherkkyys välittyy *p73*-geenin lisääntyneen ilmentymisen kautta, eli kellon *Cry*-häiriö edistää solujen UV-indusoitua apoptoosia.

Tämä myös osoittaa, että vuorokausikellon häiriöt eivät suoraan johda ihosyöpään vaan voivat myös ehkäistä sen kehittymistä kuolemattomissa p53-vajavaisissa soluissa (Sancar & Van Gelder 2021). Lisäksi *Cry*- ja *p53*-mutaatiot herkistävät solut TNF- α -aloitteiseen apoptoosin ulkoiseen reittiin säätelemällä NF- κ B-signalointireittiä (Nuclear factor- κ B) (Dakup & Gaddameedhi 2017).

3.5.2 Ihmisiho

Ihmisen keratinosyyteissä apoptoosin ja vuorokausirytmien välinen yhteys perustuu kellon ARNTL- ja CLOCK-proteiineihin. Soluissa, joissa on *Arntl*- tai *Clock*-geenin häiriö, UVB-säteily johtaa normaalia matalampaan apoptoositasoon. Tämä osoittaa, että ainakin kuolemattomissa HaCaT- sekä primaarisissa keratinosyyteissä ARNTL- ja CLOCK-proteiinit edistävät ja säätelevät solun menemistä ohjattuun solukuolemaan UVB-säteilyn jälkeen. (Sun ym. 2018)

Primaarisissa keratinosyyteissä CLOCK-proteiinin ehtyminen laskee UVB-valotuksen jälkeistä p53-proteiinin aktivaatiota ja määrää. Tämän perusteella vuorokausikellon CLOCK-proteiini säätelisi ainakin näissä keratinosyyteissä UVB-indusoidun apoptoosin rytmiä. HaCaT-keratinosyyteissä kellon häiriöllä ei ole samanlaista vastetta, mikä voi johtua HaCaT-soluihin kertyvistä p53-mutaatioista. P53-mutaatioita esiintyy auringonvalolle altistuneiden ja okasolusyövän keratinosyyteissä, ja siksi HaCaT-solut voivat auttaa ymmärtämään, kuinka kellogeenit säätelevät mutatoituneiden ihosolujen kohtaloa. Merkittävää on, että eri solutyypin välillä kelloproteiineilla on erilainen vaikutus apoptoosin säätelyssä. (Sun ym. 2018)

Nikkola ym. (2018) osoittivat, että ihmisiho on herkempi palamiselle myöhään iltapäivällä. Koska apoptoosi on vahvasti yhteydessä ihon palamiseen, on mahdollista, että myös apoptoosia tapahtuu herkemmin illalla. Sancar & VanGelder (2021) mainitsevat artikkelissaan, ettei varsinaisia apoptoosia sääteleviä kellogeenejä ole havaittu. Tästä huolimatta edellä mainitut tutkimukset osoittavat, että vuorokausikello on ainakin välillisesti yhteydessä UV-valotuotteiden aktivoiman apoptoosireitin säätelyyn. Varsinaista *in vivo* ihmistutkimusta apoptoosin vuorokausirytmistä ei vielä ole, mutta reitin selvitys on merkityksellistä kliinisten hyötyjen, kuten vuorokausiajastettujen syöpähoitojen kehittämisen kannalta (Sancar & Van Gelder 2021).

3.6 UVB-säteilyn vaikutus ihon vuorokausirytmisiin

Vaikka keskuskello synkronoi erilaisten signaalien kautta ihon ääreiskellon samaan aikaan, pystyy iho asemansa vuoksi vastaamaan myös ulkoa tuleviin ärsykkeisiin, kuten UV-säteilyyn sekä lämpötilan ja ympäristön kosteuden muutoksiin (Matsui ym. 2016, Morgan ym. 2019). Silmän verkkokalvoilta on immunohistokemiallisesti löydetty CRY1- ja CRY2-proteiineja, jotka toimivat valoreseptoreina UV-säteilylle (Nikkola ym. 2019). Samaan tapaan on mahdollista, että ihmisillä ihosolujen

CRY-proteiinit vastaanottavat UVB-säteitä ja muuttavat valoärsyksen kautta ihon kellon rytmia eli kellogeenien ilmenemistä ihosoluissa (Kawara ym. 2002, Nikkola ym. 2019, Nikkola 2021).

UVB-säteilyn aiheuttamia muutoksia vuorokausirytmia säätelevien kellogeenien ilmenemisessä on osoitettu viljellyissä keratinosyyteissä sekä *in vivo* -kokeissa. Kawara ym. (2002) havaitsivat pieniannoksisen UVB-säteilyn laskevan *Arntl*-, *Clock*- sekä *Per1*-geenien ilmenemistasoja ja muokkaavan niiden vuorokausirytmia ihmisen keratinosyyteissä. Samaan tapaan UVB-säteilyn osoitettiin aiheuttavan *Arntl*-geenin mRNA-tasoihin muutoksia HaCaT-soluissa: *Arntl*-geenin mRNA-tasot nousivat lähes nelin kertaisiksi 24 tuntia valotuksen jälkeen (Sun ym. 2018). Lisäksi *in vivo* -tutkimuksessaan Nikkola ym. (2019) osoittivat, että UVB-säteily laskee merkittävästi *Cry2*-geenin ilmentymistasoja epidermaalisessa ja dermaalisessa ihossa. *Cry2*-tasojen lasku kasvattaa CRY1/CRY2-suhdetta, ja koska tämä suhde säätelee vuorokautisen jakson pituutta, on mahdollista, että UVB-säteily pidentää vuorokautista jaksoa ihossa (Nikkola ym. 2019).

UVB-säteilyn ja vuorokausikellon välinen vuorovaikutus näyttäisi siis toimivan myös toiseen suuntaan eli UVB-säteily voi toimia ihon kellon ulkoisena tahdistajana (Nikkola 2021). On mahdollista, että UVB:n aiheuttamat muutokset kellogeenien ilmenemisrytmissä vaikuttavat myös DNA-vaurio-vasteen ja punoitusvasteen ajastukseen ihossa (Nikkola ym. 2019). Koska vuorokausikello tahdistaa myös monia muita ihon ja koko elimistön toimintoja, voi UVB-säteilyllä olla merkittävä rooli koko kehon toiminnan säätelyssä. Yhteyden kliinisen merkityksen ymmärtämiseen vaaditaan kuitenkin vielä runsaasti lisätutkimuksia *in vivo* sekä suurempia koehenkilöjoukkoja (Nikkola 2021).

4. YHTEENVETO

UVB-säteily aiheuttaa ihon soluissa moniulotteisen vasteen säteilyn synnyttämien DNA-vaurioiden korjaamiseksi ja solujen jakautumisen turvaamiseksi (Dakup & Gaddameedhi ym. 2017). Hiirillä vuorokausikellon on osoitettu kontrolloivan näistä vasteista kaikkia: ihon punoitusreaktiota, DNA-vaurioiden korjausta, solusyklin pysäyttämistä sekä apoptoosia (Gaddameedhi ym. 2011, Gaddameedhi ym. 2015). Tämä osoittaa, että kellon toiminnalla on suuri merkitys ihon kykyyn suojautua UVB-säteilyltä vuorokauden eri aikoina sen ajastaessa vastereaktiot ympäristöstä riippuvalla tavalla (Nikkola ym. 2021). Hiiristä poiketen tutkimukset ihmisihossa ovat vasta alussa ja varsinaisia *in vivo* -tuloksia on löydetty ainoastaan ihon punoituksen vuorokausirytmistä (Nikkola ym. 2018). Tietoa tarvitaan siis vielä paljon vuorokausikellon yhteydestä sekä ihoon että UVB-säteilyyn, jolla voi mahdollisesti olla suuri merkitys kellon toiminnan säätelyssä elimistössä (Nikkola ym. 2019).

Yksi suurimmista haasteista vuorokausikelloon liittyvissä tutkimuksissa kohdistuu pääsääntöisesti käytettyihin eläinmalleihin ja soluviljelmiin, jotka eivät täysin vastaa ihmiskehon monimutkaista järjestelmää (Matsui ym. 2016, Nikkola 2021). Ihmisiin ja vuorokausikelloon perustuvia *in vivo*-tutkimuksia on vain muutamia, minkä takia ne eivät riitä UVB-säteilyn turvallisuuteen liittyvien julkisten suositusten asettamiseksi (Gaddameedhi ym. 2015). Syitä tutkimusten vähäiseen määrään ovat haasteet niiden toteuttamisessa: ihmisten välillä vuorokausikellon toiminnassa ja rytmissä voi olla merkittäviä eroja, jotka aiheutuvat erilaisista ihotyypeistä ja elämäntavoista, kuten ruoka- ja unirytmistä sekä sosiaalisista kontakteista (Sarkar & Gaddameedhi). Tämän vuoksi *in vivo*-ihmistutkimuksissa UVB-valotus tulisi optimoida koehenkilöiden vuorokausikellon mukaan, mikä vaikeuttaa ja hidastaa tutkimusta suuresti (Nikkola 2021). UVB-säteilyn indusoimien vaurioasteiden vuorokausisäätelyn selvittämisellä on tulevaisuudessa todennäköisesti suurta kliinistä merkitystä ajastettujen syöpähoitojen kehittämisessä ja ihonsyövän ehkäisemisessä, mikä luo jatkotutkimukselle suuren tarpeen. Perusteellinen ymmärrys vuorokausikelloa tahdistavista tekijöistä on myös merkittävää ihmisen kokonaisvaltaisen hyvinvoinnin kannalta (Nikkola 2021).

5. LÄHDELUETTELO

- Bee, L., Marini, S., Pontarin, G. ym. (2015). Nucleotide excision repair efficiency in quiescent human fibroblasts is modulated by circadian clock. *Nucleic Acids Research* **43**(4), 2126-2137. doi:10.1093/nar/gkv081
- Budden, T. & Bowden, N. A. (2013). The role of altered nucleotide excision repair and UVB-induced DNA damage in melanomagenesis. *International Journal of Molecular Sciences* **14**(1), 1132-1151. doi:10.3390/ijms14011132
- Dakup, P. & Gaddameedhi, S. (2017). Impact of the circadian clock on UV-Induced DNA damage response and photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology* **93**(1), 296-303. doi:10.1111/php.12662
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. ym. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences* **14**(6), 1222-12248. doi:10.3390/ijms140612222
- Gaddameedhi, S., Selby, C. P., Kaufmann, W. K. ym. (2011). Control of skin cancer by the circadian rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* **108**(46), 18790-18795. doi:10.1073/pnas.1115249108
- Gaddameedhi, S., Selby, C. P., Kemp, M. G. ym. (2015). The circadian clock controls sunburn apoptosis and erythema in mouse skin. *Journal of Investigative Dermatology* **135**(4), 1119-1127. doi:10.1038/jid.2014.508
- Geyfman, M., Kumar, V., Liu, Q. ym. (2012). Brain and muscle arnt-like protein-1 (BMAL1) controls circadian cell proliferation and susceptibility to UVB-induced DNA damage in the epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* **109**(29), 11758-11763. doi:10.1073/pnas.1209592109
- Hruza, L. L. & Pentland, A. P. (1993). Mechanisms of UV-induced inflammation. *Journal of Investigative Dermatology* **100**(1), S35-S41. doi:10.1038/jid.1993.21

- Kang, T. & Leem, S. (2014). Modulation of ATR-mediated DNA damage checkpoint response by cryptochrome 1. *Nucleic Acids Research* **42**(7), 4427-4434. doi:10.1093/nar/gku094
- Kawara, S., Mydlarski, R., Shivji, G. ym. (2002). Low-dose ultraviolet B rays alter the mRNA expression of the circadian clock genes in cultured human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **119**(6), 1220-1223. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.19619.x
- Kemp, M. G., Spandau, D. F. & Travers, J. B. (2017). Impact of age and insulin-like growth factor-1 on DNA damage responses in UV-irradiated human skin. *Molecules (Basel, Switzerland)* **22**(3), 356. doi:10.3390/molecules22030356
- Lamia, K. A. (2017). Ticking time bombs: Connections between circadian clocks and cancer (version 1). *F1000 Research*, **6**, 1910. doi:10.12688/f1000research.11770.1
- Marvola, M., Urtti, A. & Mönkkönen, J. (2007). *Biofarmasia ja farmakokinetiikka*. Kuopio: Fortis.
- Matsui, M. S., Pelle, E., Dong, K. ym. (2016). Biological rhythms in the skin. *International Journal of Molecular Sciences* **17**(6), 801. doi:10.3390/ijms17060801
- Morgan, M. N., Dvuchbabny, S., Martinez, C. ym. (2019). The cancer clock is (not) ticking: Links between circadian rhythms and cancer. *Clocks & Sleep* **1**(4), 435-458. doi:10.3390/clockssleep1040034
- Musich, P. R., Li, Z. & Zou, Y. (2017). Xeroderma pigmentosa group A (XPA), nucleotide excision repair and regulation by ATR in response to ultraviolet irradiation. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* **996**, 41-54. doi:10.1007/978-3-319-56017-5_4
- Nikkola, V. (2021). *Interactions between ultraviolet B (UVB) radiation and circadian clock in the skin*. Tampere University.
- Nikkola, V., Grönroos, M., Huotari-Orava, R. ym. (2018). Circadian time effects on NB-UVB-Induced erythema in human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* **138**(2), 464-467. doi:10.1016/j.jid.2017.08.016
- Nikkola, V., Miettinen, M. E., Karisola, P. ym. (2019). Ultraviolet B radiation modifies circadian time in epidermal skin and in subcutaneous adipose tissue. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **35**(3), 157-163. doi:10.1111/phpp.12440
- Sancar, A. (2016). Mechanisms of DNA repair by photolyase and excision nuclease (nobel lecture). *Angewandte Chemie (International Ed.)* **55**(30), 8502-8527. doi:10.1002/anie.201601524
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L., Kang, T. ym. (2010). Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS Letters* **584**(12), 2618-2625. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.017
- Sancar, A., & Van Gelder, R. N. (2021). Clocks, cancer, and chronochemotherapy. *Science (American Association for the Advancement of Science)* **371**(6524), 42. doi:10.1126/science.abb0738
- Sarkar, S. & Gaddameedhi, S. (2018). UV-B-induced erythema in human skin: The circadian clock is ticking. *Journal of Investigative Dermatology* **138**(2), 248-251. doi:10.1016/j.jid.2017.09.002
- Sun, Y., Wang, P., Li, H. ym. (2018). BMAL1 and CLOCK proteins in regulating UVB-induced apoptosis and DNA damage responses in human keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology* **233**(12), 9563-9574. doi:10.1002/jcp.26859