

A pályázat fő célkitűzése olyan genetikai, celluláris és környezeti tényezők azonosítása volt, amelyek részt vesznek a legsúlyosabb bőrtumor, a melanoma kialakulásában. Fotobiológiai munkáink folyamán azonban olyan eredményeket is kaptunk, amelyek a nem-melanoma bőrtumorsejtek kezelésére használt úgynevezett fotodinámiás terápia hatékonyságának növelését is szolgálhatja a jövőben. Munkánk eredményeként tehát a bőrtumorsejtek kialakulásához vezető genetikai és sejtbioológiai tényezőket azonosítottunk és jellemeztünk – ezeket az eredményeket alapvető aspektusból tekintjük fontosnak - másrészt azonban reményeink szerint a pályázat eredményei a vizsgált bőrbetegségek terápiájában is hasznosításra kerülnek a jövőben.

Az elért eredmények ismertetése:

1)

A szegedi Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán a 2000-es évek közepén indítottuk azt a kutatási programot, melynek keretében a Klinika gondozásában álló familiáris melanomában szenvedő betegek és családtagjaik körében a betegségre predisponáló ciklin dependens kináz inhibitor 2A (CDKN2A) mutációkat azonosítottunk és funkcionálisan jellemeztünk. Ezen programunk keretében detektáltuk az CDKN2A IVS1 +37 G/C introni mutációt egy melanomát halmozottan mutató magyar családban. Célunk az, hogy kiderítsük, vajon a mutációnak van-e kóroki szerepe a melanoma pathogenezisében. Ezt a mutációt mindeddig egy olasz tanulmány említette, ahol a szerzők egy *in silico* analízis eredménye alapján kizárták a mutáció kóroki szerepét. Első célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon *in vivo* tudunk-e detektálni az érintett családtagok bőrében olyan aberráns mRNS splice terméket, amely a mutációnak lehet betudható. Sajnálatos módon azonban az érintett családtagok nem egyeztek bele a bőrminta vételbe (ennek lehetősége már a pályázatban is említésre került). Egy splicing szabályozásában feltehetően részt vevő elem *in vitro* vizsgálatának egyik lehetősége az ún. minigén konstrukció előállítás és ennek révén a génről átíródó mRNS termékek tanulmányozása volt. A trieszti ICGEB intézet Prof. Dr. Franco Pagani által vezetett csoportjával együttműködésben elkészítettünk két CDKN2A minigén konstrukciót, melyek segítségével az IVS1 +37 G/C mutáció mRNS splicing-ra gyakorolt hatása tanulmányozható. A vad típusú és mutáns minigén konstrukciókkal HeLa sejteket transzfektáltunk, majd 24 óra elteltével totál RNS-t izoláltunk a sejtekből. A minigén konstrukciókról átíródó mRNS molekulákat reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) vizsgáltuk, melynek eredménye azt mutatta, hogy a mutációt hordozó minigénről egy, a vad típusú splice variánsnál 120 nukleotiddal nagyobb termék is keletkezik. Mind a vad típusú, mind az alternatív hosszúságú terméket szekvenáltattuk, és megállapítottuk, hogy a mutáns minigénről egy olyan termék íródik át, amely a CDKN2A gén 1. intronjából egy 120 nukleotid hosszúságú szakaszt is tartalmaz. Ezt az eredményt kaptuk három független HeLa sejt transzfekciós kísérlet során.

A fenti eredményeket (a melanomát halmozottan mutató család analízisét, valamint az *in vitro* minigén kísérlet eredményeit) egy kéziratban összegeztük, amelyet a *British Journal of Dermatology* c. lapban fogadtak el közlésre: Balogh K, Szell M, Polyanka H, Pagani F, Bussani E, Kemeny L, Olah J Detection of a rare CDKN2A intronic mutation in a Hungarian melanoma-prone family and its role in splicing regulation. *British Journal of Dermatology* 167:(1) pp. 131-133. (2012).

2)

Melanomára predisponáló CDKN2A mutációkat azonosító munkánk során figyelmünk középpontjába került egy család, amelyben halmozottan fordulnak elő malignus betegségek, a Klinikánk gondozásában álló fiatal nőbeteg esetében pedig hármás primer tumor (melanoma, hasnyálmirigy és emlő carcinoma) előfordulása volt megfigyelhető. A beteg műtéti ellátása és az azt követő kombinált kemoterápia után jelenleg tünetmentes. A fiatal nőbeteg és gyomor és légcső carcinomában szenvedő édesapa genetikai vizsgálata feltárta, hogy mindketten heterozigóta hordozói a már jól ismert R24P CDKN2A mutációnak. Mivel az édesapa évtizedekkel ezelőtt elhunyt leánytestvére, valamint a Klinika gondozásában álló fiatal nőbetegünk is emlő carcinomában szenvedtek, megvizsgáltuk annak a lehetőségét is, hogy a feltárt R24P CDKN2A mutáción kívül hordoz-e a család emlő carcinomára predisponáló BRCA1 vagy BRCA2 mutációt. Mutáció analízisünk során 15, az emlő carcinomával leggyakrabban kapcsolatba hozott alapító BRCA1 és BRCA2 mutációt vizsgáltunk a fiatal nőbeteg esetében, de egyiket sem sikerült detektálnunk. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a R24P CDKN2A nem csupán a melanomára való hajlam kialakításában vett részt, hanem feltehetően hozzájárult a fiatal nőbeteg, ill. a családban előforduló egyéb malignus betegségekre való hajlam kialakításához is.

Fenti eredményeinket egy könyvfejezet formájában írtuk le, amelyet kiegészítettünk a vonatkozó irodalom áttekintése után született összefoglalóval. Ebben az összefoglalóban részletesen bemutatjuk azokat az eredményeket, amelyeket az R24P CDKN2A mutációval kapcsolatosan mindeddig közöltek, valamint áttekintettük az irodalmat abból a szempontból is, hogy CDKN2A mutációk milyen mértékben tekinthetők genetikai hajlamosító faktoroknak emlő daganatok esetében (Klára Balogh, Edina Nemes, Gabriella Uhercsák, Zsuzsanna Kahán, György Lázár, Hilda Polyánka, Rolland Gyulai, Erika Varga, Erika Keresztne Határvölgyi, Kaizer László, Lajos Haracska, László Tiszlavicz, Lajos Kemény, Judit, Oláh, Márta Széll: Melanoma-predisposing CDKN2A mutations in association with breast cancer: a case-study and a meta-analysis). A könyvfejezet az InTech Open Access Publisher "Melanoma", ISBN: 978-953-307-290-6 c. kiadványában került elfogadásra.

A melanoma terápiájának egyik legnagyobb áttörése az utóbbi években a V600E mutáns BRAF kináz gátlására építő személyre szabott célzott terápia. Laboratóriumunkban lehetőségünk van ennek a mutációnak a detektálására a paraffinba ágyazott léziókból. A pályázat futamideje alatt megkezdtük egy olyan vizsgálatsorozat kivitelezését is, amelyben arra keressük a választ, hogy az ivarsejtvonalbeli CDKN2A mutációt hordozó familiáris melanomában szenvedő betegek eltérő arányban hordozzák-e a BRAF V600E mutációt a CDKN2A mutáció negatív betegekhez képest, és hogy az ivarsejtvonalbeli mutáció hordozása predisponálja-e a szomatikus BRAF mutáció kialakulását.

3)

A pályázat másik fő célkitűzése a genetikai és környezeti faktorok együtthatásának tanulmányozása volt a melanoma predisponáló anyajegyek megjelenésének tekintetében. Ebbe a kísérletbe olyan ikerpárokat vontunk be, akik közül az egyik újszülött korában kapott kékfény kezelést az újszülöttkori magas bilirubinszint által okozott neurológiai eltérések kivédésére, a másik nem. A kékfény kezelést tanulmányunkban olyan környezeti hatásként értékeltük, amely feltételezéseink szerint az újszülöttek még nem teljesen érett védekezésű bőrére káros hatással van, és a későbbiekben elősegíti a melanoma predisponáló anyajegyek

kialakulását. Kísérleteinkbe 59 ikerpárt vontunk be, koruk 3-30 évig terjedt. Minden egyes ikerpárt nagyon alaposan megvizsgálták a bőrgyógyász kollégák, közönséges és diszplasztikus anyajegyek száma rögzítésre került. Szemészeti vizsgálat is történt, ahol az írisz szeplők és az anyajegyek számát jegyeztük fel. Ezen kívül minden egyes ikerpárnak ki kellett töltenie egy olyan részletes kérdőívet, amellyel bőrük fényterhelését mértük fel. A vizsgálatba bevont ikerpároktól szájnyalkahártya mintavétel történt és mindegyikőjük genomi DNS-ét izoláltuk. Genomikai vizsgálatokat azokon az ikerpárokon végeztünk, ahol a közönséges és diszplasztikus anyajegyek száma nagymértékben eltért egymástól.

Genomikai vizsgálatainkat két olyan génen végeztük, amelyekről feltételeztük, hogy szerepet játszanak a melanoma predisponáló anyajegyek kialakulásában: az egyik a hisztidáz (HAL) gén, melynek fehérjeterméke a bőr immunfunkcióinak szabályozásában játszik szerepet, a másik pedig a melanokortin 1 receptor gén (MC1R), melynek fehérje terméke a bőr pigmentációjának kulcs szabályozója. A HAL génen egyetlen, a működését alapvetően befolyásoló polimorfizmust azonosítottak (I439V), míg az MC1R gén erősen polimorf. Genomikai vizsgálatunkban a HAL gén I439V polimorfizmusát PCR-RFLP módszerrel, míg az MC1R gént teljes hosszúságú szekvenálással vizsgáltuk. A polimorfizmusok laboratóriumi vizsgálatát követően egy – és kétváltozós analíziseket végeztünk annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a fenti gének polimorfizmusainak van-e szerepe a melanoma predisponáló anyajegyek kialakulásában, illetve hogy fel tudunk-e fedni gén-környezet kölcsönhatási tényezőket.

A statisztikai analízisek eredményei szerint a melanoma predisponáló anyajegyek megjelenésében az életkornak és az újszülött kori kékfény szerepe van, és erre a folyamatra sem a bőr immunregulációjában részt vevő HAL gén I439V polimorfizmusának, sem az MC1R polimorfizmusoknak nincs befolyása. Természetesen nem zárható ki azonban annak a lehetősége sem, hogy kapott eredmény a viszonylag alacsony elemszámnak (59 ikerpár) tudható be.

Epidemiológiai és genetikai vizsgálataink eredményeit közleményben foglaltuk össze (Zsanett Csoma, Edit Tóth-Molnár, Klára Balogh M.D, Hilda Polyánka, Hajnalka Orvos, Henriette Ócsai, Lajos Kemény, Márta Széll and Judit Oláh: Neonatal blue light phototherapy and melanocytic nevi: a twin study), amelyet a Pediatrics c. lap közölt.

A fenti közleményben beszámoltunk róla, hogy az egyik tanulmányozott ikerpár férfi tagja esetében azonosítottunk egy olyan melancortin-1 receptor (MC1R) mutációt, amelyet mindeddig nem írtak le az irodalomban. Mivel W169R a mutációt heterozigóta formában hordozó fiatalember rendkívül világos bőrű, kék szemű, valamint világos szőke hajú, ill. esetében extrém magas közönséges (n=90) és diszplasztikus anyajegy (n=19) számot állapítottunk meg, felvetődik a kérdés, hogy ez az újonnan azonosított mutáció funkcionális és erősen befolyásolja a páciens pigmentációját valamint hajlamát melanoma predisponáló anyajegyek kialakulására. Felvetésünket az is erősíti, hogy a fiatalember leánytestvére - aki vad típusú erre az MC1R variációra, de gyermekkorában ugyanolyan környezeti hatások érték, mint ikertestvérét – jóval alacsonyabb közönséges (n=30) és diszplasztikus (n=3) anyajegyeket hordoz.

A továbbiakban nemzetközi kooperációban végrehajtott funkcionális vizsgálatokat tervezünk. Személyes konzultációt végeztünk Professor García-Borrón-nal (Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain), aki az MC1R mutációk funkcionális jellemzésének nemzetközileg is legelismertebb szakembere. A García-Borrón professzorral elvégzendő kísérletek választ fognak nekünk adni arra, hogy az általunk elsőként azonosított W169R MC1R mutáció a receptor fehérje funkcióvesztéses verziója-e, és felelős-e a vizsgált fiatalember pigmentációjának kialakításáért, valamint nagyszámú melanoma predisponáló közös és diszplastikus anyajegyéért.

A pályázat új eredménye által felvetett fenti munka végrehajtására a futamidő nem bizonyult elegendőnek, ezért kérvényeztük annak meghosszabbítását, valamint a fennmaradt pénzügyi források átcsoportosítását egy valós idejű PCR készülék megvásárlására.

4)

Az UV sugárzás a melanomára hajlamosító legfontosabb környezeti tényező. A pályázat támogatásával került befejezésre az a munkánk, amely az UV-B sugárzás intracelluláris hatásainak tisztázását tűzte ki célul. Megmutattuk, hogy a humán COP1 gén és fehérje kifejeződik a keratinocitákban, és E3 ligázként részt vesz a keratinociták UV válaszában kialakításában. Megmutattuk, hogy a COP1 fehérje mind a magban, mind a citoplazmában jelen van, és UV-B besugárzásra mind mennyiségének csökkenése, mind intracelluláris eloszlása megváltozik. Csendesítéses kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a COP1 fehérje negatív regulátora a p53 fehérjének, amely alapján feltételezzük, hogy a sejtek UV válaszában betöltött szerepét a p53 ubiquitinálásán keresztül fejt ki.

A fenti eredményeket közleményben foglaltuk össze (Kinyó A, Kiss-László Z, Hambalkó S, Bebes A, Kiss M, Széll M, Bata-Csörgő Z, Nagy F, Kemény L: COP1 contributes to UVB-induced signaling in human keratinocytes, *J Invest Dermatol.* 130: 541-5, 2010), amely a *The Journal of Investigative Dermatology* c. lapban jelent meg.

További célunk, hogy a COP1 fehérjét stabilan csendesítsük, és ezekben a sejtekben vizsgáljuk, hogy a COP1-nek milyen szerepe van az UV-B indukált jelátviteli folyamatok szabályozásában. Ehhez előállítottunk egy olyan immortalizált keratinocita sejtvonalat (HPV-KER), amelynek a p53 szabályozása (ellentétben más immortalizált keratinocita sejtvonalakkal) nem károsodott. A HPV-KER sejteket kontroll és a COP1 fehérjét stabilan csendesítő konstrukciókkal transzformáltuk: 3-3 ilyen stabilan transzformált sejtvonalat sikerült előállítanunk. Western blott módszerrel és immuncitokémiai festésekkel igazoltuk, hogy a csendesítő konstrukcióval transzformált sejtekben a COP1 fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll konstrukcióval transzformált sejtekben. Ezekkel a stabilan transzformált sejtvonalakkal sikerült megteremtünk az alkalmas kísérleti rendszert, amelynek segítségével a továbbiakban nagyskálájú génexpressziós módszerekkel vizsgáljuk, hogy a COP1 fehérje a milyen módon vesz részt a keratinociták UV válaszában szabályozásában.

5)

A melanoma a melanociták tumoros transzformációjának eredményeként jön létre. Ezért a melanociták proliferációjának és differenciációjának megértése nagymértékben hozzájárulhat

a betegség pathomechanizmusának feltárásához. A pályázat támogatásával fejeztük be egy, a melanociták *in vitro* tenyésztésével kapcsolatos munkánkat. Korábbi munkánk során kidolgoztunk egy kémiai mitogénektől mentes *in vitro* tenyésztési módszert, amelyben a tenyésztett keratinociták sajátságos morfológiát és proliferációs sajátságokat vesznek fel. Az ily módon tenyésztett keratinociták dedifferenciálódnak, elvesztik c-Kit és TRP-1 expressziójukat és kifejezik a nestint. Kimutattuk azt is, hogy kolera toxinnal és PMA-val, illetve UV-B besugarazott keratinociták felülűszojával a dedifferenciált sajátság visszafordítható. Eredményeink arra utalnak, hogy az új tenyésztési módszer a melanociták könnyen tanulmányozható és transzdedifferenciálható rendszerét biztosítja, amely nagyon fontos a melanoma pathogenezisének megismerése szempontjából. Eredményeinket közleményben foglaltuk össze (Bernadett Kormos, Nora Belso, Attila Bebes, Gabor Szabad, Sarolta Bacsa, Marta Szell, Lajos Kemeny, Zsuzsanna Bata-Csorgo: *In Vitro Dedifferentiation of Melanocytes from Adult Epidermis*, PLoS ONE 6(2): e17197.doi:10.1371/journal.pone.0017197, 2011), amely megjelent a PLoS ONE c. szaklapban.

6)

A pályázat fő célkitűzése a melanoma kialakulására hajlamosító genetikai és környezeti tényezők vizsgálata volt, de végrehajtása során lehetőségünk nyílt egy olyan kutatási programba is bekapcsolódni, amelynek eredményei lehetővé tehetik a nem-melanoma bőrrákok egyik kezelési lehetőségének, a fotodinámiás terápia a hatékonyságának növelését. Korábbi munkánk során kimutattuk, hogy az ABCG2 xenobiotikum transzporter mRNS és fehérje magas szinten expresszálódik *in vitro* proliferáló keratinocitákban. HaCaT sejtekben génspecifikus csendesítéssel az ABCG2 fehérjeszintet jelentősen sikerült csökkenteni, a sejtek viabilitására azonban ez nem volt hatással. Az ABCG2 fehérje specifikus gátlószerével, a nem toxikus fumitremorgin C analóg Ko-134-el kezelt keratinocitáknak szintén nem csökkent a viabilitásuk. Eredményeink alapján az ABCG2 transzporter feltehetően nem esszenciális a keratinociták proliferációjához. Ezt követően célul tűztük ki az ABCG2 transzporter szerepének vizsgálatát a keratinocita stresszválaszban. Egészséges humán bőrben UV-B fényvel való besugárzást követően az ABCG2 transzporter fehérje az epidermisz granuláris rétegében jelentős indukciót mutatott. *In vitro* körülmények között Ko-134 kezelés hatására szignifikánsan csökkent a keratinociták viabilitása UV-B besugárzás után, az ABCG2 transzporter tehát részt vesz a keratinociták UV-B indukált stresszválaszában. Ismert, hogy a szabad porfirinek sejtől való kipumpálásának feladatát részben az ABCG2 transzporter végzi, ezért feltételeztük, hogy a porfirinek fényérzékenyítő hatásán alapuló fotodinámiás terápia eljárások hatékonyságának befolyásolásához jelentős mértékben hozzájárulhat az ABCG2 fehérje. Hipotézisünket igazolta, hogy delta aminolevulinsav előkezeléssel érzékenyített HaCaT keratinociták viabilitása jelentős csökkenést mutatott fotodinámiás kezelés hatására az ABCG2 transzporter specifikus gátlásakor. Eredményeink szerint a Ko-134 egy ígéretes molekula lehet a különböző bőrbetegségek kezelésére egyre elterjedtebben használt fotodinámiás eljárások hatékonyságának növelésében.

Fenti eredményeinket közleményben foglaltuk össze: Bebes A, Nagy T, Bata-Csörgő Z, Kemeny L, Dobozy A, Szell M.: Specific inhibition of the ABCG2 transporter could improve the efficacy of photodynamic therapy., *J Photochem Photobiol B*. 105: 162-166, 2011.

Összefoglalóan tehát elmondhatjuk, hogy a pályázat eredményeképpen számos értékes adatot szolgáltatunk a melanoma kialakulásáért felelős genetikai, környezeti és sejtbiológiai tényezőkről. Eredményeinket öt eredeti közleményben (össz. impakt faktoruk 21,752), egy könyvfejezetben és számos konferencia absztraktban foglaltuk össze. Beszámolónk végén kiemelnénk, hogy a pályázat eredményei olyan közleményekben is megjelentek, ill. olyan fórumokon is elhangzottak, ahol a tágabb orvostársadalom ill. a lakosság figyelmét szeretettük volna felhívni azokra a tényezőkre, amelyek szerepet játszanak a legsúlyosabb kimenetelű bőrtumor, a melanoma kialakulásában. Ily módon úgy véljük, hogy a végrehajtott munkának nem csupán tudományos értéke van, hanem eredményei - reményeink szerint - társadalmi szinten is hasznosulnak.