

Válasz

Prof. Dr. Balázs Margitnak

„A keratinociták fiziológias és patológiás változásai környezeti hatásokra és ezek szerepe bőrtumorok kialakulásában” című MTA doktori értekezésemre írott hivatalos bírálatára

Hálásan köszönöm Balázs Margit Professzor Asszonynak, hogy az MTA doktori értekezésem bírálatát elvállalta. Megtiszteltetésnek veszem, hogy időt, energiát szentelt a dolgozat részletes áttanulmányozására és értékelésére. Tisztelettel köszönöm elismerő szavait és felettébb értékelem konstruktív észrevételeit.

A dolgozatban előforduló gépelési hibákért elnézést kérek, nagyobb gondossággal kellett volna eljárnom, ebben sajnós a szövegszerkesztő program Macintoshra írt verziója nem kifejezetten volt segítségemre. A gének inkonzekvens írásmódja és az inkomplett rövidítésjegyzék nem magyarázható technikai okokkal. Egyetértek azzal, hogy a rövidítésjegyzék jobb helyen lett volna az értekezés elején, köszönöm az észrevételeket. A dolgozatba valóban nem inkorporáltam az alapjául szolgáló közleményeket, ezt főleg terjedelmi okokból tettem. A cikkeket külön töltöttem fel az MTA erre szolgáló rendszerébe.

Az ábrák címeinél és az ábrák aláírásainál igyekeztem a minél hatékonyabb információközlésre, sajnálom, hogy ezen igyekezetem esetenként kevésbé volt sikeres.

A hivatkozások jelentős része a cikkek megjelenésekor elérhető irodalmi hivatkozások voltak, ezeket részben sikerült a jelenlegi adatokkal összevetni, ebben talán nem voltam elég hatékony. Elismerem, hogy törekedhettem volna egy modernebb, még részletesebb összehasonlításra is, elsődlegesen azonban minden jelentős megfigyelés eredeti közleményét igyekeztem hivatkozásként feltüntetni.

A részletes kritikai észrevételekre és az eredményekhez fűzött kérdésekre az alábbiakban adom meg a válaszaimat:

1. Állatkísérletek során bizonyította, hogy a sunburn-sejt (napégette-sejt) képződés védi az epidermiszt a DNS károsodások további patológiás következményeitől, protektív szerepe van a daganat kialakulás szempontjából. A Trp53 funkciójának szabályozásában az Mdm2 fehérje jelentős szerepet játszik.

Kérdés: A legújabb vizsgálatok mennyiben támasztották alá az állati modellrendszerekben tett megfigyeléseket?

Az Mdm2 és a Trp53 interakciója kétoldalú, amennyiben az Mdm2 a Trp53 degradációját is elő képes idézni, míg a Trp53 szintézisét is fokozza azáltal, hogy a p53mRNS-hez képes kötődni. Az, hogy a két homlokegyenest eltérő válasz közül melyik a fiziológias, az nem volt pontosan ismert, míg 2012 elején nem közölték azt, hogy az Mdm2 Ser395 pozícióban való ATM-függő foszforilációja szükséges a p53 mRNS-Mdm2 interakcióhoz[1]. A p53 mRNS – Mdm2 kötődés gátlása a p53 DNS károsodásra létrejövő stabilizációjának és aktiválásának is akadály, ezzel igazolni lehetett, hogy az ATM aktivítása milyen módon változtatja meg az Mdm2 p53-ra kifejtett pozitív vagy negatív reguláló funkcióját.

Az Mdm2 – Trp53 interakciójának befolyásolása a daganatellenes kezeléseknek is fontos támadáspontja[2]. Számos kismolekulájú gátlószer fejlesztése zajlik jelenleg is, ezek közül a Nutlinok egy számos tagból álló molekulacsalád, amelyek számos tagja ígéretes klinikai vizsgálatokban vesz részt. Ezen gátlószerek alkalmazása vagy önállóan, vagy más kemoterápiás készítménnyel kombinációban történhet.

2. A krónikus UV-besugárzást modellező kísérletei során bizonyította, hogy az epidermiszben kialakult mikroszkopikus méretű daganatok p53 mutációt hordoznak, és szerepük van a daganat iniciáció mellett a daganat progressziójában is.

Kérdés: A p53 mutáció mellett milyen más olyan géneltéréseket írtak le, melyek meghatározóak a tanulmányozott bőrdaganatok kialakulásában? Milyen bizonyítékok vannak az „incipiens tumor előalakok” (p53 mutációt tartalmazó klónok?) daganatprogresszióban betöltött szerepére vonatkozóan?

A munkában elsődlegesen azokkal a génekkel foglalkoztam, amelyek megismerésében a saját vizsgálataink hoztak jelentősebb előrelépést, de egy olyan gyakori daganatcsoport, mint a non-melanoma bőrrákok háttere ennél lényegesen komplexebb.

Az 1990-es években kiterjedt irodalma volt a ras családba tartozó három gén, a Harvey-(H), a Kirsten-(K) és az N-ras közül lényegében mindháromról születtek közlések, hogy a non-melanoma bőrdaganatokban kiemelt szerepük lenne van der 1990, ezekről azonban az újabb irodalmi adatok azt mutatják, hogy inkább csak a tumorok 10-20 százalékában hordoznak mutációt. Az N-ras szerepe a xeroderma pigmentosumban kialakuló bőrdaganatoknál azonban továbbra is elfogadott nézet.

A fentiek mellett a c-myc szerepére is utalnak adatok. Spinaliomákban a 8q kromoszómaszáron izokromoszóma formálódását írták le, majd az is felismerésre került, hogy ez a régió tartalmazza a c-myc gént. Vesetranszplantáltak spinaliomáinak 50 százalékában c-myc amplifikáció volt megfigyelhető. Legfrissebb irodalmi adatok szerint a D-vitamin receptor szabályozó szerepe kiemelt jelentőségű a c-MYC/MXD1 optimális működésében[3].

A dolgozat bevezetésében terjedelmi okokból csak röviden tértem ki a korábban már részletesen leírt génekre, mint a ras, immunszuppresszió szerepére főként a spinocellularis carcinoma kialakulásában, de számos közlemény írja le az immunszuppresszió hatását. Közelmúltban megjelent közleményben írták le, hogy az IL10 hatása elsődleges[4].

A genetikai háttér mellett fontos lehet protein szintű okokra is röviden kitérnem. A humán papilloma vírus (HPV) szerepét nem csak a spinocellularis carcinomában, de egyéb epiteliális karcinómákban is leírták. A spinalioma kialakulása szempontjából legfontosabb azon vírus szerotípusok (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 58) jelenléte, amelyek E6 génje képes a p53 gyors proteasomális degradációját előidézni, és ezzel a G1 sejtciklus megállást és az apoptózis indukciót kivédeni és ezáltal inaktiválni a daganat elleni védőfunkciót[5]. Emellett a telomeráz enzim aktiválására is csak a magas kockázatú HPV-k E6-ja képes[6]. Ma már ennek a felismerésnek terápiás felhasználása is széles körben elterjedt a cervixcarcinoma prevenciójában alkalmazott vakcinák formájában. A fenti szerotípusok mellett újabban a HPV 38 szerepét is igazolták olyan transzgén egerekben, akik HPV 38 E6 és E7 onkoproteinjeit expresszálták a hámban és UV besugárzás hatására solaris keratosisok és spinaliomák alakultak ki rajtuk[7].

A non-melanoma bőrrákok apoptózis-regulációjának effektorainak vizsgálatokor emellett további számos igen fontos faktor került azonosításra, amelyek közül csupán felsorolás szintjén említem meg a Noxa, Puma and Bim[8, 9] és a Fas-Fas-ligand[10, 11] szerepét.

T. Bírálóm arra a kérdésre, hogy milyen bizonyítékok vannak az előalakok daganatprogresszióban betöltött szerepére az alábbi választ adom:

A közlemények megjelenése óta is folytak és folynak vizsgálatok a daganatelőalakok növekedési dinamikájának megértése, ennek részleteinek feltárására[12-14]. Ezen közlésekből további részletekre derül fény a p53 pozitív klónok növekedési dinamikájának matematikai modellezésén, az egyidejűleg alkalmazott immunszuppresszív ágensek jelentőségén keresztül a klónok származási helyének pontos megismeréséig. Ez utóbbi különösen izgalmas eredményt mutatott, amennyiben a klinikai gyakorlatban igen kártékonnak tartott napégést a vizsgálók kísérletes rendszerükben reprodukálva annak p53 pozitív klónokat elimináló hatását észlelték, ezáltal a daganat növekedéséhez szükséges időt jelentősen megnyújtva. Emellett igazolták, hogy a p53 pozitív klónok származási helye az

interfollikuláris epidermisz[12].

3. Fontosnak tartom azt a felismerést, melynek értelmében keratinocitákban az E2F1 szerepet játszik az UVB indukálta apoptózisban. Továbbá E2F1 és p53 együttes hiánya fokozott apoptózis készséget eredményez.

Kérdés: A dolgozatban a nem-melanoma bőrdaganatok jellegzetességeivel foglalkozik, érdekelne, hogy milyen szerepe van az E2F1-nek melanomákban, hiszen az UV sugárzás szerepe ezekben a daganatokban vitathatatlan?

Bár a dolgozat témája a non-melanoma bőrdaganatok, talán túlzás és elfogultság nélkül kijelenthető, hogy a melanoma az onkológia egyik legizgalmasabb és jelenleg még legkevésbé értett területe. Az E2F1 melanomában játszott szerepéhez szorosan hozzátartozik a p53 szerepének megértése a tumorban. Annak ellenére, hogy a p53 igen sok daganat esetén játszik mutációi révén kiemelt szerepet, a melanoma esetén régóta ismert tény, hogy alacsony frekvenciával találunk mutációkat a p53 génben. Az, hogy ennek a magyarázata az, hogy a melanoma sejtek túléléséhez van-e szükség a p53ra, vagy esetleg nem DNS, hanem protein szinten kerül a p53 funkciója gátlás alá, nem teljesen értett. Már a '90-es évek végére ismertté vált, hogy a melanoma esetén az E2F transzkripcionális aktivitásának a deregulációja történik[8]. Ezen közlemény szerzőjével rövidebb ideig együttműködtem, az ő laboratóriumából szereztük be az E2F1 knockout egereket. Ezt a területet tovább vizsgálva az elmúlt években további ismeretekhez jutottunk az E2F-1 szerepére melanomában. Friss közlések tanulmányozzák a p53 és E2F1 komplex viszonyát[15]. Ebben arra derült fény, hogy megfigyelhető a melanoma sejteknek egy E2F1-hez köthető MDM2-irányú dependenciája. Igazolni lehetett, hogy mind in vivo, mind in vitro az MDM2 kiemelkedően fontos eleme a pro-szeneszcens szignálok elleni fellépésben. Ezzel magyarázzák, a melanoma esetén a kulcs az MDM2 inaktiválása, amellet, hogy p53 mutációs státusza kevésbé jelentős ahhoz képest, hogy miként képes az E2F1-hez kötődni. Ezek a megfigyelések további bizonyítékok arra nézve, hogy az MDM2 lehet potenciális gyógyszer target a melanoma kezelésében.

5. Különböző szfingolipid származékokról megállapította, hogy azoknak keratinocita differenciációt moduláló hatásuk van. Bizonyította, hogy egyes származékok számos gén expressziójának megváltozását eredményezik. A különböző szfingolipid vegyületek közül a fitosztingozin-szalicilát és a szfingozin-szalicilát tűnik leginkább alkalmasnak bőrgyógyászati és kozmetológiai, klinikai felhasználásra.

Kérdés: A bőrgyógyászati alkalmazás mellett milyen más klinikai alkalmazása lehetséges a szfingolipideknek?

A nem-bőrgyógyászati alkalmazások tárgyalása előtt fontosnak érzem kiemelni a szfingolipidek szerepét a lipid-barrier veleszületett zavarával járó kórképek, pl. az atopiás dermatitis kezelésében.

A szfingolipidek metabolizmusának zavara elsőként az ú.n. tárolási betegségekből, a szfingolipidózisokból vált ismertté. Ez egy meglehetősen heterogén betegségcsoport, amelyet dominálónan neurológiai eltérések jellemeznek. A csoport ismert tagjai a Niemann-Pick, Fabry, Krabbe, Gaucher, Tay-Sachs-betegség és a metachromaticus leukodystrophia. Általában autoszom recesszíven öröklődő kórképek, kivéve az X-hez kötött öröklődésű Fabry-kórt. Terápiájuk nem megoldott, de vannak biztató eredmények a károsodott enzim pótlásával való kezelés sikerességéről.

A szfingolipidek gyulladásos folyamatokban játszott szerepére utal az a közlemény, amelyet ob/ob egereken az adipociták funkcióját vizsgálva ismertek fel. Ennek a vizsgálatnak a konklúziója, hogy a szfingolipidek egy új szerepét igazolják az adipociták pro-thrombotikus és a pro-inflammatorikus fenotípusának a kialakításában ezzel hozzájárulva a obezitáshoz társuló kardiovaszkuláris és metabolikus szövődmények kialakításában[16].

A szfingolipidek gyulladás-regulációjával kapcsolatos funkciójára utal az a németországi klinikai vizsgálat, ahol pulmonáris ödéma során vizsgálják a szfingolipidek szerepét.

A ma talán legígéretesebb területe a szfingolipidek használatának az onkológia. Felismerve ezen vegyületcsoport apoptózist reguláló funkcióját, a ceramidok metabolismusának módosításán keresztül lehet terápiásan beavatkozni a daganatsejtek elpusztításának érdekében. Ennek a terápiás célpontnak a másik oldala is igaz, a daganatsejtek gyógyszer-rezisztenciájának is fontos eleme a ceramid-szignalling olyan módosítása, hogy a pro-apototikus jelek alóli kiszabadulás útján éljenek túl és alakuljon ki gyógyszer-rezisztencia[17].

Még egyszer köszönöm Balázs Margit Professzor Asszonynak a dolgozatom részleteire is kiterjedő alapos bírálatát. Köszönöm, hogy MTA értekezésemet mind formailag, mind tartalmilag az előírt követelményeknek megfelelőnek tekinti és elfogadásra javasolja. Tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2012. november 6.

Dr. Wikonkál Norbert
egyetemi docens

Referenciák:

1. Gajjar M, Candeias MM, Malbert-Colas L, Mazars A, Fujita J, Olivares-Illana V et al. The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer Cell*. 2012;21(1):25-35.
2. Wang S, Zhao Y, Bernard D, Aguilar A, Kumar S. Targeting the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction for New Cancer Therapeutics. In: Wendt MD, editor. *Protein-Protein Interactions*. Heidelberg: Springer Berlin; 2012. p. 57-79.
3. Salehi-Tabar R, Nguyen-Yamamoto L, Tavera-Mendoza LE, Quail T, Dimitrov V, An BS et al. Vitamin D receptor as a master regulator of the c-MYC/MXD1 network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012.
4. Welsh MM, Karagas MR, Kuriger JK, Houseman A, Spencer SK, Perry AE et al. Genetic determinants of UV-susceptibility in non-melanoma skin cancer. *PLoS One*. 2011;6(7):e20019.
5. Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*. 2004;109(2):157-62.
6. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8211-6.
7. Viariso D, Mueller-Decker K, Klotz U, Aengeneyndt B, Kopp-Schneider A, Grone HJ et al. E6 and E7 from beta HPV38 cooperate with ultraviolet light in the development of actinic keratosis-like lesions and squamous cell carcinoma in mice. *PLoS Pathog*. 2011;7(7):e1002125.
8. Naik E, Michalak EM, Villunger A, Adams JM, Strasser A. Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J Cell Biol*. 2007;176(4):415-24.
9. Nys K, Maes H, Andrei G, Snoeck R, Garmyn M, Agostinis P. Skin mild hypoxia enhances killing of UVB-damaged keratinocytes through reactive oxygen species-mediated apoptosis requiring Noxa

and Bim. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(6):1111-20.

10. Hill LL, Ouhtit A, Loughlin SM, Kripke ML, Ananthaswamy HN, Owen-Schaub LB. Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science*. 1999;285(5429):898-900.

11. Qureshi A, Nan H, Dyer M, Han J. Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes and risk of skin cancer. *J Dermatol Sci*. 2010;58(1):78-80.

12. Rebel HG, Bodmann CA, van de Glind GC, de Gruijl FR. UV-induced ablation of the epidermal basal layer including p53-mutant clones resets UV carcinogenesis showing squamous cell carcinomas to originate from interfollicular epidermis. *Carcinogenesis*. 2012;33(3):714-20.

13. Brash DE, Zhang W, Grossman D, Takeuchi S. Colonization of adjacent stem cell compartments by mutant keratinocytes. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(2):97-102.

14. de Graaf YG, Rebel H, Elghalbzouri A, Cramers P, Nellen RG, Willemze R et al. More epidermal p53 patches adjacent to skin carcinomas in renal transplant recipients than in immunocompetent patients: the role of azathioprine. *Exp Dermatol*. 2008;17(4):349-55.

15. Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):738-48.

16. Samad F, Hester KD, Yang G, Hannun YA, Bielawski J. Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes*. 2006;55(9):2579-87.

17. Huang WC, Chen CL, Lin YS, Lin CF. Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. *J Lipids*. 2011;2011:565316.