

A PTCH GÉN POLIMORFIZMUSAINAK SZEREPE A BASALIOMÁK PATHOGENESISÉBEN

IFJÚSÁGI OTKA PÁLYÁZAT ZÁRÓBESZÁMOLÓ

Témavezető: Dr. Wikonkál Norbert egy. adj.

Semmelweis Egyetem Általános Orvos Kar Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika

Bevezetés

A basalsejtes carcinoma (basalioma) a fehérbőrű embereket érintő leggyakoribb malignus daganat. Alkatileg világos bőrű emberek esetén 60 éves életkor felett igen nagy valószínűséggel számíthatunk basalioma kialakulására. A basalioma az epidermis és a szőrtüsző keratinocytaiból kiinduló daganat, a tumor sejtek morfológiája a basalsejtekére emlékeztet. Az epidermalis malignómák ún. non-melanoma bőrrák csoportjába tartoznak. Lassan növekvő daganatról van szó, ami az esetek túlnyomó részében nem ad metasztázist. A basalioma infiltrálhatja és destruálhatja környezetét, főként, ha elhanyagolják, illetve a bőr-nyálkahárta határt elérve a testüregek és mélyebb struktúrák felé terjed. Halálos is lehet, ha ez a folyamat vitális szerveket érint. Prognózisa - különösen az áttétképzés hiányára - általában véve jó. Kivételesen ritkán jelenik meg a sötét bőrű populációban.

A basalioma incidenciája országonként nagy változatosságot mutat. Általában a két legfontosabb faktor, amely meghatározza ezt az ultraibolya-sugárzás mennyisége és a lakosok bőrtípusa. Hazánkban az incidencia 100 - 150 körül alakul 100 000 lakosra

vetítve, bár az epidemiológiai adatok minden bizonnyal alábecsülik ezt a daganattípust. Ennek oka elsődlegesen a folyamat lassú progressziója és életet relatíve kevésbé veszélyeztető volta, hiszen emiatt számos eset nem kerül felismerésre és ellátásra. Az esetek egy jelentős része főleg idős embereknél más okú elhalálozásnál mellékleletként észlelhető.

A basaliomák elsősorban a napnak rendszeresen kitett bőrterületeken, az arcon, az orron, a füleken, a hajas fejbőrön, felső testfélen és a vállakon észlelhetőek. Legkomolyabb terápiás nehézséget az arcon periorificialisan, a kopoltyúívek záródási vonalainak megfelelően elhelyezkedő tumorok okoznak. A basalioma tenyéren, talpon csak igen ritkán fordul elő, nyálkahártyán primeren szinte sosem alakul ki. A klasszikus forma olyan bőrfelszínen, ahol napsugárzás szinte sosem éri a bőrt, általában sosem fordul elő. Klinikai megjelenésükben is változatosak, ismerünk szolid, pigmentált, cicatrizáló, cisztikus és morpheiform formákat is. Előfordulásuk általában sporadikus, de ismertek öröklődő formák is.

A basaliomák nem köthetőek egyetlen gén egyértelmű érintettségéhez, az UV fény okozta p53 tumor szuppresszor gén mutációt, illetve a PTCH gén mutációját is igazolták a daganat kialakulásának hátterében.

A PTCH gén szerepére a Gorlin és Goltz által leírt nevoid bazalsejtes karcinóma szindróma hívta fel a figyelmet, ahol fejlődési rendellenességek, csontciszták, a corpus callosum fejlődési rendellenességei és karakterisztikus tenyereken észlelhető benyomatok mellett a klinikai kép része a nagyon fiatal életkorban és halmozottan megjelenő basaliomák. A 9-es kromoszóma rövid karjára lokalizált eltérések vizsgálata vezetett a PTCH gén lokuszának identifikálásához. A PTCH gén egy ecetmuslicában korábbról

'patched' néven ismert gén humán megfelelője, és protein terméke újabb vizsgálatok szerint a hedgehog szignáltranszdukciós útvonal kulcsmolekulája. A humán PTCH gén azonosítását követő vizsgálatok igazolták ezen gén mutációinak nagy számú előfordulását Gorlin-Goltz szindrómás betegekből eltávolított basaliomákból származó DNS-ben. További vizsgálatokban felvetették a PTCH gén lehetséges szerepét sporadikus basaliomák kialakulásában is. Ezen munkák eredménye azt mutatta, hogy a sporadikus basaliomák közel 90 százaléka is tartalmaz valamilyen mutációt (deléción, inszerción, pontmutáció) a PTCH génben.

Jelen pályázat közvetlen előzményeként a Yale Egyetemen (New Haven, CT, U.S.A.) végzett munkája során a témavezető Dr. Brash segítségével vizsgálatokat végzett szokatlan klinikai formában megjelenő sporadikus basaliomák PTCH génjében fennálló mutációk azonosítására. A szokatlan klinikai képen egy adott régióban ismételt és nagy számban megjelenő basaliomákat értettünk, ahol az újabban megjelenő tumorok nem az eredeti tumor recidívái voltak. Hét ilyen szokatlan klinikai képet mutató basaliomás beteget vizsgáltuk, olyan módon, hogy első lépésként ezen páciensek egészséges bőréből izoláltunk DNS-t. A DNS mintákból a D9S196, D9S180 és D9S287 próbákkal allélvesztést kíséreltünk meg kimutatni, ám a vizsgált betegek esetén egyetlen allélvesztéses mintát sem láttunk, így direkt szekvenálással folytattuk a vizsgálatainkat. A PTCH gén 24 exonból áll, 2 alternatív 1-es exont tartalmaz és összesen 34 kb genomiális DNS hosszúságú. A hozzávetőleg 6,5 kb hosszúságú mRNS vizsgálatát azért nem választottuk, mert a stop kodont létrehozó mutációk gyakran lebomlanak, így az ilyen mutációk nem kerülnek felismerésre.

A szekvenálás folyamán mellékleletként ismertünk fel egy addig ismeretlen polimorfizmust. Ez a PTCH gén 22-es exonjában az 1315-ös kodonnál található és az eredetileg Leucint kódoló (CTC) szekvencia második pozícióját C-re változtatva a Leucint Prolinra (CCC) cseréli. Az először feldolgozott 7 amerikai betegől származó atípusos basalioma esetek között figyelemre méltó volt az eredetileg vad típusként leírt Leu allél alulreprzentáltsága. Tekintve, hogy a két aminosav mérete és ionos természete egészen más, joggal feltételezhetjük, hogy a szintetizálódó protein térszerkezetében igen jelentős torzulás lép fel a vad típus konformációjához képest. A vizsgált 7 betegből 5 esetén homozigóta módon találtuk meg Pro allélt, egy betegnél heterozigóta formában Pro/Leu, míg egy beteg az eredetileg vad típusként értékel Leu/Leu allélpárt hordozta homozigóta formában.

Ez az eredmény igazán érdekessé az elvégzett kontrollvizsgálatok fényében válik: 24 egészséges önkéntesekből származó DNS mintákat szekvenálva ugyanis a Leu allél dominanciáját észleltük. Ezek az egyedek 17%-ban egyáltalán nem tartalmazták a Pro allélt, túlnyomó többségük (75%) is csak az egyik allélon. A betegpopulációt statisztikailag összevetve a kontroll csoporttal (matched pair analysis) a Pro allél szignifikánsan gyakoribb a betegeknél, mint a kontrolloknál ($p=0,0059$).

Feltételezésünk szerint a Prolint tartalmazó protein valamilyen mechanizmus útján keresztül gátolja a PTCH tumor szuppresszor aktivitását, így az erre az allélre homozigóta egyedeket nagymértékben fogékonyá teszi basaliomák megjelenésére.

Fő célkitűzés:

1. Atípusos klinikai formában jelentkező betegen a genomiális DNS-ből a PTCH gén tanulmányozása a basaliomák kialakulásáért felelős lokuszban.

2. Ezen eredmények alapján az egyes polimorfizmusok szempontjából heterozigóta egyedeken a korábban klinikánkon eltávolított tumorokból allélvesztés (loss of heterozygosity, LOH) tanulmányozása
3. Sporadikusan előforduló „atípusos” klinikai formát öltő basaliomák esetén az allélvesztés LOH vizsgálat elvégzése.

Munkacsoportunk azt kutatta, hogy milyen genetikai eltérés áll a fiatalkori (35 évnél fiatalabb korban jelentkező) sporadikus basaliomák megjelenésének hátterében, illetve a vizsgálat kiterjesztése az idősebb populációra milyen népegészségügyi jelentőséggel bír.

Klinikai célkitűzés: Munkacsoportunk összegyűjtötte az évenkénti új mind fiatalkori, mind időskori basaliomás esetek számát 1999-2005 között. A fiatalkori eseteknél vizsgáltuk az átlagéletkort, nem szerinti eloszlást, első basalioma életkorát, basalioma megjelenése előtti fényexpozíció mennyiségét, napozási szokásokat, szolárium használatot, egyéb betegségeket illetve bőrbetegségeket és családi anamnézist a beteganyagban.

Molekuláris: Vizsgáljuk a PTCH gén két allélének gyakoriságát a beteganyagban és bizonyítani kívánjuk, hogy a Pro allél homozigóta hordozása növeli a basalioma kialakulásának esélyét.

Vizsgálat menete

Beteganyag

A Semmelweis Egyetem Bőrklínikájának kartonjai alapján 1999-ig visszamenően gyűjtöttük ki a fiatalkori (35 évnél nem idősebb egyének) basaliomás eseteket. 33 esetet

találtunk. Az anamnézis felvételekor bizonyos szempontokat kellett követni: napfény-expozíció mennyisége, nyaralási, szabadidő eltöltési szokások, családi anamnézis, előfordult-e már az egyénnél korábban tumor, egyéb bőrbetegségek, illetve szolárium használata.

Anyaggyűjtés

- tumor szövet
- ép bőr

Basaliomás betegek PTCH génjének vizsgálata

- PCR amplifikáció
- Restrikciós endonukleázos hasítás
- PTCH exon szekvenálás
- LOH meghatározás

Direkt szekvenálással meghatározni a vizsgált személy 22-es exonjának teljes bázissorrendjét túlságosan munkaigényes és lassú folyamat. Ehelyett restrikciós endonukleázzal történő emésztéses technikát is lehet alkalmazni, melyhez sikerült találnunk egy megfelelő endonukleázt. Az MlnI-es restrikciós endonukleáz felismerő szekvenciája tartalmazza az eredeti CTC bázissorrendet. Ha a bázissorrend Leucint kódol (vad típus), akkor 4 hasítási termék keletkezik, ha Prolint (mutáns), akkor 3 fragment képződik. A fragmentek aztán 2,5%-os agaróz gélelektroforézis során 1%-os TBE pufferben futtatva feloldhatók. Öt esetet elküldtünk a Genoida Kft-hez automata

szekvenálásra, mintegy önmagunk ellenőrzésére. Az szekvenálás eredményei minden esetben megegyeztek a mieinkkel.

Anyagok és módszerek

DNS izolálása

A betegekből vett vért az extrakcióig EDTA-s csövekben 4°C-on tároljuk.

Sigma Gen Elute™ emlős genomikus DNS miniprep Kit (GN170)

Szobahőmérsékletű EDTA-s vér 180 µl-t 20 µl Proteináz K-val (20 mg/ml) vortexeltük 1,5 ml mikrocentrifuga csőben. A lizált mintához 200 µl Lysis Solution-t adtunk, majd 14 percig vortexeltük (homogenizálás). Ezt követően 10 percig 55°C-os vízfürdőben inkubáltuk. Az inkubáció után 200 µl abszolút alkoholt adtunk hozzá, majd 5-10 percig vortexeltük. A mintát ezt követően nagylyukú pipettaheggyel a gyárilag megjelölt csőbe helyeztük, majd maximális fordulatszámon (14000rps) centrifugáltuk. Az alsó folyadékot leöntöttük, majd a kötő oszlopot új mikrocentrifuga csőbe vittük át. A minta mosását Wash Solution Concentrat-tal kétszer végeztük. Az elúcióhoz 20 µl Elution Solution-t használtunk.

DNS kicsapás

A vért az EDTA-s csövekből egyenként átöntöttük 50 ml-es Falcon csövekbe, majd a pufferrel (TrisHCL, szacharóz, MgCl₂, Triton X-100) egészítettük ki. 5 perc 400-on történő rázást követően 4 percig 3500g-vel centrifugáltuk. A felülúszót kiöntöttük.

A steril centrifugálást követően a sejtek lizálásához 3x1 ml B reagenst (Tris, EDTA, NaCl, DW, SDS) használunk. A csövek óvatos döntögetését követően a folyadékot

mindkét csőből egy 15 ml-es csőbe átöntöttük, majd a fehérjék kicsapásához szükséges Na-perklorátot adtunk hozzá. A mintákat 15 percig 400-on rázógéppel ráztuk, majd 25 percig 65°C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően 5,5 ml -20°C-os kloroformot adtunk hozzá, majd 10 percig rázógéppel 400-on ráztuk. A rázás után 4 percig 1400g-vel centrifugáltuk. A mintát steril transzferpipettával átemeltük majd kétszeresére hígítottuk 4°C-os 96%-os alkohollal.

1ml 70%-os alkoholt mikrocsőbe bemérünk, majd a mintából kicsapódott DNS-t steril injekciós tű segítségével átemelünk. 3 perc 10000g-s ultracentrifugálás után a felülúszót leszívjuk a mintából és a rajtamaradt alkoholt hagytuk elpárologni, majd 0,1 M Tris-HCL és 0,01 M EDTA elegyből 500 µl-t mérünk rá, majd -20°C-on tároltuk.

A PCR reakció paraméterei

A start hőmérséklet 95°C (5 perc), ciklusok (40), denaturálás 95°C (45 másodperc), primer anellálás 58°C (30 másodperc), DNS szintézis 72°C (30 másodperc), véghőmérséklet 72°C (10 perc).

A polimeráz lánreakciót Techne TouchGene és Biometra T3 Thermocycler típusú készüléken végeztük. Mind a konformációszenzitív gélelektroforézis céljából, mind a szekvenálási célból végzett reakciókhoz Promega Taq polimerázenzimet használtunk. A reakcióelegy (50 µl) az enzimen (0,75 µl /reakcióelegy) és a gyárilag meghatározott pufferen kívül a következőket tartalmazta: 1,5 mM MgCL₂, 0.2mM dNTP, 20 pM primer, valamint 1 µl templát DNS.

A PCR reakcióhoz használt primerek az alábbiak voltak:

primer 2220: 5' ..CCCCAGAGACTTGTGGC..3' és

primer 2221: 5'..GTGGTGATGGGCTGGCAGTA..3'.

A PCR reakció sikerét 2%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

DNS vizsgálata agaróz gélelektroforézissel

A gél anyaga az agar-agar nevű természetes polimer. A nagy tisztaságú agar porból 2%-os gél készítettünk: 1 g agarózt lombikban TAE pufferrel felöntöttük, hogy 50 ml-t kapjunk. Forrásig melegítettük. Lehűlés után 5 µl Etidium-bromid (EtBr) oldatot adunk, majd cellába öntjük.

Az EtBr DNS kötő fluoreszcens festék. Polimerizálódás után a gél a futtató kádba helyezük. Minták felvitele után 90 V-on 20 percig futtatjuk. Ezután analízis következik UV transzilluminátorral.

Akrilamid gélelektroforézis

Alapoldat: 20 ml BAP, 2,5 ml 20x GT puffer, 15 ml Formamid, 10 ml Etilénglikol és 51,5 ml desztillált víz. Ebből a keverékből 19 ml-t elvettünk. Ehhez a 19 ml-hez adunk 200 µl 10%-os APS-t és 400 µl TEMED-et. 10 percig hagytuk polimerizálódni. 1 ml 10 %-os APS-t és 69 µl TEMED-et öntöttünk a maradék keverékhez. 1,5 óráig hagytuk polimerizálódni. A futtatópuffer 25 ml GTG pufferből és 975 ml desztillált vízből áll. A minták felvitele után 35 W-on 30 percig futtattuk. Az előhíváshoz Cyber-green festéket használtunk.

Szekvenálás a Sanger-féle stop nukleotid módszer segítségével

USB Sequenase 2.0 Kit

3-5 DNS μg minta szükséges egy szekvenáláshoz. A mintát $40\mu\text{l}$ -re hígítjuk, $4\mu\text{l}$ 2M NaOH és 2 mM EDTA oldatot adunk hozzá, majd 3°C -on 30 percig inkubáltuk. A denaturált mintákat $4.4\mu\text{l}$ 3M Na-acetát és $145\mu\text{l}$ -20°C -os abszolút alkohol hozzáadásával precipitáltuk, majd 15 percig 14000 rpm -en centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, a mintát 70%-os -20°C -os etanollal mostuk, szárítottuk, majd $7\mu\text{l}$ desztillált vízben felvettük.

A DNS mintához $2\mu\text{l}$ reakciópuffert és $1\mu\text{l}$ szekvenáló primert ($5\mu\text{M}$) adtunk, majd 37°C -on 20 percig inkubáltuk. A mintához a következőket adtuk: $1\mu\text{l}$ mikroliter $0,1\text{ M}$ DTT, $2\mu\text{l}$ Labeling Mix (5x hígított) $0.5\mu\text{l}$ alfa- ^{32}S -dATP, $2\mu\text{l}$ Sequenase 2.0 (8x hígított), majd a keveréket 2-5 percig laborhőmérsékleten állni hagytuk.

Elisa lemez különböző vájataiba felvittünk $2,5\text{-}2,5\mu\text{l}$ ddGTP-t, ddATP-t, ddCTP-t, ddTCP-t tartalmazó oldatot, majd ezekre vittünk $3.5\text{-}3.5\mu\text{l}$ -t a szekvenálási elegyből.

5 percig 37°C -on inkubáltuk, majd a mintákhoz $4\text{-}4\mu\text{l}$ STOP oldatot adtunk.

A szekvenáló géll 80 ml-hez 40 g urea, $13,3\text{ ml}$ 29:1 AA:BB, 8 ml 10XTBE, $30\mu\text{l}$ cc TEMED, $370\mu\text{l}$ 10% APS volt szükséges.

Automata szekvenálás

Az automata szekvenálásokat a H-Med illetve a Genodia Kft. végezte.

Szekvencia analízis

A kapott szekvenciákat munkacsoportunk manuálisan elemezte, szekvencia adatbázisok adatai alapján.

A munkához használt szekvencia adatok:

- Gén databank: <http://www.ensembl.org/>
- PTCH: ENSG00000185920

Eredmények

Klinikai eredmények

33 új fiatalkori esetet regisztráltak a SE Bőr klinikáján 1999 óta. 1999-ben 5; 2000-ben 2; 2001-ben 8; 2002-ben 4, 2003 folyamán 6, 2004-ben 6, 2005-ben 2 új eset volt. Ebből 19 volt nő-, illetve 14 volt férfibeteg. 30 beteggel tudtunk kapcsolatba lépni, illetve DNS-t nyerni, összesen 18 nő és 12 férfibetegtől. Az első basalioma átlagéletkora 27,9 év. 10 esetben az évek során több basalioma is megjelent. 9 esetben fordult elő nagy igazolhatóan károsító mennyiségű fényexpozíció az anamnézisben. Volt, aki elmondása szerint az egész gyermekkorát napon töltötte, de akadt, aki versenyszerűen kajakozott, illetve volt egy tengerész is közöttük. A 33 esetből 18 esetben jelent meg a basaliomára nem típusos, vagyis napsugárzásnak rendszeresen ki nem tett bőrterületen. A vizsgált 30 fiatalkori basaliomás eseten kívül 91 különböző életkorú (születési év 1917 és 1964 között) basaliomás beteg DNS mintáját sikerült laborunkban feldolgozás alá vonni. A mintákból a PCR technika segítségével végzett szűrés során csupán 82 bizonyult hasznosíthatónak. A genetikai vizsgálataink alapján a fiatalkori esetekből 13 Pro homozigóta, 12 heterozigóta és csak 5 Leucin genotípusú egyént kaptunk.

Részletes eredmények

2002.-ben indult el a munka az adatgyűjtéssel, és feldolgozással, amely során a klinika archívumában jelenleg megtalálható anyagokat visszamenőleg 1999-től dolgoztuk fel, illetve 2002-től prospektív módon is gyűjtöttük a klinikailag szokatlan megjelenést mutató basaliomás betegek anyagát.

Első lépésként az adatgyűjtés kritériumait pontosítottuk. Jelen vizsgálatunk szempontjából két kategóriát kezelünk kiemelkedő figyelemmel: 1) fiatal basaliomás betegek, akik a fényexpozíciós anamnézistől függetlenül szövettanilag igazolt basaliomával bírnak, amely 35 éves életkor előtt jelentkezik, és 2) idősebb betegek, akiknek a tumorai nagy számban jelentkeztek. Ez utóbbi csoportba azok az esetek tartoznak, ahol 50 év alatt 5, 60 év alatt 10, 65 év alatt 15, míg ennél idősebb betegek esetén 20, vagy annál több basaliomát észleltünk, ill. verifikálható az anamnesisből.

A fenti kritériumok meghatározását követően végig a fenti kategóriáknak megfelelően történt a DNS gyűjtési-, feldolgozási folyamat, illetve a feldolgozás szempontjából érdekes eseteknél a klinika szövettani archívumában jelenleg megtalálható paraffinba ágyazott blokkok kikeresése is megtörtént.

A betegek mintáiból egy DNS bank létrehozását kezdtük el, a vizsgálatra megjelent betegtől vérvétel történt, a vérmintákat centrifugáltuk, és egy DNS extrakciós kit (Qiagen) segítségével DNS-t szeparáltunk. A DNS mintákat felhasználásukig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk. A projekt jelenlegi állásánál összesen 112 DNS mintát őrzünk olyan betegektől, akik a beválasztási kritériumoknak eleget tesznek.

A DNS mintákat mind feldolgoztunk PCR reakcióval. A tervezetben vázolt és előkísérletekkel bevált PCR körülményeit át kellett dolgoznunk, mivel nehézségeink támadtak a reakció kivitelezésében. Vélhetően a problémát két tényező idézte elő: egyrészt frissen szintetizált primereket használtunk, amely a reakció körülményeire hatással lehetett, másrészt más gyártótól származó Taq polimeráz enzimet sikerült beszerezni. Fenti tényezők miatt több kísérletes körülményt kipróbálva konklúzióként két változtatás történt. Egyrészt a reakció „annealing” hőmérsékletét 61-ről 58 °C-ra csökkentettük, másrészt a Mg⁺⁺ koncentrációját megemeltük. Jelenleg ezen paraméterek alkalmazása mellett a reakció csaknem minden esetben kielégítő terméket eredményezett.

A projektnek ezen a pontján a rutinszerűen használt enzimatikus hasítás mellett a svédországi Uppsala egyetemével kollaborálva (Dr. Fredrik Pontén és laboratóriuma) ún. „pyrosequencing” módszerrel direkt szekvenálást végeztünk néhány esetben az akkor készülő közlemény számára, azonban azokat az adatokat akkor nem publikáltuk.

A beszámolási időszakban megoldottuk a PCR során korábban tapasztalt problémákat, a reakció mostanra megbízhatóan működik. A megoldást a PCR-hoz használt enzim eredeti gyártótól való beszerzése jelentette, mivel más helyettesítő Taq enzim esetén a reakciót hosszadalmas és költséges optimalizálás során sem sikerült megbízhatóan beállítani.

Technikai újításunk volt a kivitelezés szempontjából, hogy a restriktív enzimmel történő hasítás után a korábban használt agar-gél elektroforézis helyett a mintákat polyakrilamid gélen futtattuk. Ezzel a változtatással a kevés bázispárból álló fragmentek jobban ábrázolódnak, így a hasítási termékek pontosabban beazonosíthatóak. Eredményeink közül a fiatal basaliomás populáción végzett vizsgálatokat mutattuk be. Tekintve, hogy a projektnek ezen a pontján a munkában Kaszab Csilla VI. éves orvostanhallgató is részt

vett, a munkával a Semmelweis Egyetem TDK Konferenciáján előadást tartott és ott II. díjat érdemelt ki.

A csatolt táblázatban a 30 értékelhető fiatalkori basaliomás betegünknek a vizsgálati eredményét mutatjuk be. A SE Bőrkinikán az elmúlt 5 évben 33 esetben végeztünk 35 éves, ill. annál fiatalabb betegnél basalioma eltávolítás, akik közül 30 betegről sikeresen izoláltunk DNS-t. A minták megoszlását az alábbi táblázatban tüntetjük fel:

	Betegszám
Homozigóta - Pro	13
Heterozigóta	12
Vad típus - Leu	5

Az allélfrekvencia meghatározásához a megfelelő kontroll csoport kiválasztása nagy körültekintést igényel. A basaliomák megjelenése nagy valószínűséggel várható fehér bőrű és napexpozíciónak rendszeresen kitett egyének esetén, így fiatal emberek esetén még előfordulhat basalioma a jövőben. A pontos kontrollcsoport megválasztásához DNS minták begyűjtését olyan populációból végeztük és végezzük, akik kellően magas életkorúak és az anamnézisben tartós napfényexpozíció szerepel, illetve ennek klinikai jelei észlelhetők (pl. solaris keratosis, cutis rhomboidale nuchae ill. kiterjedt solaris elastosis).

A 2004.- 2005. év során vizsgálataink tovább haladtak a terveknek megfelelően. 2 irányban haladtak az eredeti vizsgálati tervek szerint a munkák: egyrészt további fiatalkori basaliomás betegek kerültek a vizsgálati minták közé, másrészt nagyobb számban kezdtük az idősebb korban, de szokatlan formában jelentkező tumorok

feldolgozását. Az összes feldolgozott mintaszám 2005. decemberig az időskori szokatlan basaliomákat tekintve meghaladta a 80-at, az ebből született adatokat alább részletezzük. Az adatok feldolgozása jelenleg is tart, az eddigi eredmények szerint a Pro allél dominanciája nem szignifikáns a kontroll csoporthoz képest.

Szokatlan klinikai megjelenésű basalioma összes esetszám: 82

	Betegszám
Homozigóta - Pro	36
Heterozigóta	29
Vad típus - Leu	17

A nagyobb számban feldolgozott időskori szokatlan klinikai megjelenésű tumorok közül a korábban felállított kritériumrendszer szerint folytatjuk az adatgyűjtést, mivel az egyes alcsoportok esetén ez még relatíve alacsony esetszámot mutat. Ez az esetszám a szigorú követelmények miatt nem tekinthető kevésnek, hiszen célunk is elsődlegesen a ritka, atípusos alakok vizsgálata volt.

A 2005. év során megjelent a jelen munka alapjául szolgáló kollaborációs közlemény a British Journal of Dermatology c. újságban. Ebben a cikkben közölt eredményei között a jelenleg folyó kutatás adatai szándékoltnak nem szerepelnek, amennyiben ennek folyamánként kívánjuk egy önálló cikk formájában megjelentetni a hazai adatokat. Erre jó alapot teremt a cikkben vázolt több geográfiai régióból származó minták analízise és az ezekkel való egybevetés.

A heterozigóta egyedeknél, ott ahol elérhető volt a betegnek több korábbi tumora, elvégeztük az allélvesztés detektálását (LOH). Természetesen, mivel a bevásztási kritériumok során az anamnézisben szereplő tumorokat is tekintetbe vettük, így gyakran az adott betegnél nem találtunk a Klinika archívumában csak egy tumort. A fiatal basaliomás betegkörben annak relatíve kicsi esélye volt, hogy több tumort találjunk, így itt minden fellelhető esetben elvégeztük az LOH vizsgálatot. Az időskori szokatlan basaliomák esetén feltétel volt a multiplex tumor, így ebben a csoportban csak akkor végeztük el az LOH vizsgálatot, ahol legalább 2 tumort találtunk a szövettani archívumban. A két alcsoport esetén az alábbi eredmények születtek: A fiatal basaliomás betegek esetén a 12 heterozigóta egyed esetén 8 esetben találtunk allélvesztést ($8/12=67\%$), a két allél megoszlása 3 Prolint és 5 Leucint kódoló allél volt. A szokatlan megjelenésű basaliomák esetén az észlelt 29 heterozigóta egyednél a két vagy több fellelhető tumor esetén végeztük el az LOH vizsgálatot, összesen 17 ilyen beteget találtunk. Itt az allélvesztés aránya $17/29$ (58%) volt az összes beteget alapul véve. Ennél a mintacsoportnál az allélvesztés még kiegyenlítettebb volt, mint a fiatal basaliomások esetén, mivel a két allél a 17 beteg 40 tumorából 18 (45%) Pro és 22 Leu (55%) allélvesztést igazolt.

A klinikán összegyűjtött kontroll csoportban (48 minta) a két allél aránya 18 (38%) Prolin vs. 30 (62%) Leucin.

Az adatok igazolni látszanak a korábban általunk közölt eredményeket, amennyiben a világosabb karakterű geográfiai régiókban a világnak Pro allél dominál, mivel ez az eumelanint tartalmazó bőrre jellemző variáns, míg a Leu allél a pheomelanint tartalmazó bőrtípusokra. A Pro az ősi allél, ezt jól reprezentálja, hogy a csimpánz genom is ezt

tartalmazza. Az amerikai kis esetszámú vizsgálat során több tumorról bíró világos bőrű páciensek feltételezhetően kelta eredettel bírnak, innen a magas Pro reprezentáció. Ennek alapján elmondható, hogy a világos bőrű embereknél a Leu allél hiánya hajlamossá teszi a basaliomák kialakulására. A magyarországi jellemző bőrtípus inkább tartalmaz pheomelanint, azaz sötétebben pigmentált. Ezzel párhuzamosan, a feldolgozott mintáknál a Leucin jelentősen volt reprezentálva. Az allélvesztés tanulmányozása kapcsán az adatok statisztikailag nem szignifikánsan erősítik meg az előkísérletekben vizsgált egy betegnél észlelt preferenciális allélvesztést. A vizsgált esetszám sajnálatos módon csupán abszolút értékben tekinthető alacsonynak, hiszen egy olyan kórfolyamattal állunk szemben, amelynek a megjelenése 50 éves kor alatt gyakorlatilag ismeretlen volt még néhány évtizede is. Ez a SE Bőrklínikáján évente ellátott beteganyaghoz - ami évi 1200 – 1500 basalioma esetet jelent - képest ez a szám nem elhanyagolható. A fiatalkori basaliomás esetek éves száma alacsony. Erre tekintettel ezekből az adatokból nem lehet egyértelműen kijelenteni, hogy a fiatalkori esetek száma évről-évre növekedne, de több évre visszatekintve mégis az esetszám növekedését lehet észlelni.

Célzott adatgyűjtésünknek köszönhetően felismerésre került 4, Klinikánk által eddig nem gondozott Gorlin-Goltz szindrómában szenvedő beteg is. Ezek az esetek a klasszikus Gorlin-Goltz szindróma jeleivel bírnak, típusos módon az anamnézisben szereplő több tucat ellátott és jelenleg is észlelhető basaliomával. Ezen betegek ellátása és gondozásba vétele ennek a kutatási munkának egy igen fontos klinikai kihatása, amely így fokozottabban felhívta a bőrgyógyász-társadalomban erre a ritka, de a beteg életét igen komolyan érintő kórképre.



1. ábra Fiatal férfibeteg hátán észlelhető nagyszámú basalioma



2. ábra Fiatal nőbeteg arcán észlelhető multiplex basaliomák

Eredeti terveink között szerepelt tumorsejtek inváziójára specifikus integrinek immunhisztokémiai módszerrel való tanulmányozása, ez azonban a források pályázat közbeni szűkülése miatt nem valósult meg. Magát az immunhisztokémiai technikát p53 tumorszuppresszor gén ellenes CM-5 poliklonális antitesttel beállítottuk, azonban a

α IIb β 3 integrin ellenes antitest beszerzésére nem volt alkalmunk. A p53 ellenes antitest immunhisztokémiai reakciójának beállításával a lényeges technikai lépéseket megtettük, a módszer beállítása megtörtént, a későbbiekben ilyen irányban tovább kívánunk dolgozni.

Következtetések és az eredmények hasznosítása

Eredményeink egy ismert tumor szuppresszor génben fellelhető klinikailag releváns polimorfizmus meglétének felismerését hozta. A basalioma ártalmatlannak imponáló jellege ellenére egy szűk betegkör számára mégis komoly veszélyeztetettséget jelent. A vizsgálatok jelentősége abban rejlik, hogy egy nagyon gyakori tumorféleségen belül molekuláris genetikai vizsgálatokkal a tumor kialakulásának szempontjából jelentőséggel bíró polimorfizmust azonosítottunk. A beteganyagban eddigi vizsgálataink alapján ugyan nem találtunk szignifikáns eltérést a különböző allélek gyakorisága között, azonban értékelhető eltérések voltak az átlag tumormentes populációhoz képest. Ennek a génnek a szerepe más tumorok esetén is felmerül, így a polimorfizmus tanulmányozása hozhat eredményeket a basaliomán túlmutatóan is. Jelenleg az irodalomban még mindig vitatott, hogy a polimorfizmus az egészséges populációban pontosan hogyan oszlik meg. Folytatjuk a vizsgálatok kiterjesztését további esetekre is, mivel csupán a fokozott napfény expozícióval a basalioma esetek egy része nem magyarázható, így ezeknél az eseteknél a tumor megelőzése esetleg genetikai vizsgálatokkal is megvalósítható lenne. Az egészséges heterozigóták kiszűrésével bizonyos egyedek fokozott veszélyeztetettségére fel lehetne hívni a figyelmet, így lehetőség nyílna arra is, hogy életmód változtatással nagyobb eséllyel el tudják kerülni a rákos megbetegedést.

Természetesen, egy ilyen nagy gyakorisággal bíró tumornál egyetlen gén egyetlen polimorfizmusa nem állhat a betegség hátterében egyedüli genetikai eltérésként. Érdekes azonban megjegyezni, hogy 2003. folyamán közöltek német szerzők egy vizsgálatot amely ugyanennek a lokusznak a hatását vizsgálta emlőrák esetén (Chang-Clude et al. Int. J. Cancer:103, 779-783, 2003). Eredményeik szerint a Leu allél hordozása önmagában nem eredményez szignifikáns kockázat-növekedést mellrák szempontjából, de ha a páciens orális antikoncepciens szedett, akkor a Leu alléllal bírók esetén statisztikailag igazolhatóan nagyobb kockázattal alakult ki emlőrák. Ennek analógiájára folytatjuk munkánkat, hogy az eddigi eredmények mellett a nagyon nagyszámú basaliomás beteganyagban be tudjuk határolni a fokozott kockázattal bíró csoportokat, illetve klinikai típusokat.

Vizsgálati adataink feldolgozása a beszámoló benyújtásakor még nem teljes. Az esetszám további emelése kívánatos a statisztikai feldolgozás számára, ezzel együtt azonban 2005.-ös év végén megkezdjük az eredmények közlésre szolgáló kézirat megírását.