

Hazai melanomakutatások: reményt keltő eredmények egy korábban reménytelen daganatban

Balázs Margit^{1,2}, Vízkeleti Laura^{1,2}, Ecsedi Szilvia^{1,2}, Ádány Róza^{1,2}, Rásó Erzsébet³,
Hegedűs Balázs⁴, Ladányi Andrea⁵, Tóvári József⁵, Tímár József^{3,4}

¹MTA-DE Népegészségügyi Kutatócsoport, ²Debreceni Egyetem Népegészségügyi Kar, Megelőző Orvostani Intézet, Debrecen,

³Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézet, ⁴MTA-SE Molekuláris Onkológia Kutatócsoport, ⁵Országos Onkológiai Intézet, Budapest

A hazai melanomakutatások immáron két évtizedes múltat tekintenek vissza és három hazai kutatócsoportnak köszönhetőek, melyek az Országos Onkológiai Intézetben, a Semmelweis Egyetemen és a Debreceni Egyetemen dolgoznak. Korábban e folyóiratban már beszámoltunk az Országos Onkológiai Intézetben született eredményekről, a jelen közlemény együttműködésük újabb eredményeit mutatja be. A debreceni kutatócsoport a sokszorosan mutált melanomagenom klinikai jelentőséggel rendelkező új, eddig még nem ismert hibáit figyelte meg, amelyek jelentősége minden bizonnyal felértékelődik az egyre szélesebb körben alkalmazott célzott kezelések fényében. Kutatásaik külön értéke, hogy felhívták a figyelmet a melanoma progressziója során bekövetkező sajátos epigenetikai változásokra, melyek nem járnak a gének struktúrájának további károsodásával, de azokhoz hasonló funkcionális következményekkel járnak. A budapesti kutatócsoport elsősorban kísérleti rendszereken dolgozott, és kimutatta a gazdaszervezet nemének meghatározó szerepét a melanoma progressziójában, aminek háttere az NK-sejtek hormonfüggő működése. Érdekes lehet a glükokortikoidreceptorok szerepének kimutatása is, amely bizonyos leukémiákhoz hasonló szereppel bírhat melanomában. Évtizedes múltat tekint vissza a melanomamatrix-kutatás, amelynek újabb eredményei a XVII kollagén és a CD44v3 variánsainak progressziót elősegítő szerepét igazolták. A melanoma ún. kettős vad genotípusa még nem rendelkezik hatékony kezeléssel, ezért izgalmas lehet ebből a szempontból az FGFR, a c-MET vagy a kannabinoidreceptorok expressziójának terápiás kiaknázása, amit a kísérletes rendszereken szerzett eredmények támogatnak. Ugyanakkor nem lebecsülendők a heparinszármazékok vagy a biszfoszfonát alkalmazásával kapott antitumorális hatások sem, amelyek kiegészíthetik a jövőben a célzott terápiákat. Magyar Onkológia 59:275–281, 2015

Kulcsszavak: melanoma, progresszió, molekuláris markerek, mikrokörnyezet

Melanoma research has a two decade history in Hungary and is based on three groups located at the National Institute of Oncology (NIO), the University of Debrecen (DU) and Semmelweis University (SU). Previously we have summarized the achievements of the NIO group in this Journal, now this paper summarizes the recent results of their collaborations. The research group of DU revealed several novel genetic alterations in the melanoma genome which might have clinical relevance as prognosticators or predictors in light of the novel target therapies. Data indicating unique, perhaps melanoma-specific epigenetic changes during progression might be even more important, identifying novel genes otherwise not detected as genetically altered ones. The research group in Budapest extensively used experimental human melanoma models and demonstrated the host sex as a key factor in progression due to the specific function of NK cells. Identification of functional glucocorticoid receptor in human melanoma might lead to therapeutic exploitation similar to certain leukemias. Studies on extracellular matrix revealed collagen XVII and CD44 splice variants as progression associated factors of melanoma. Since the double wild type genotype of melanoma is lacking effective therapy, data on the use of FGFR2, c-met or cannabinoid receptor as target can be important. On the other hand, experimental data on the antitumoral effects of heparin derivatives or bisphosphonate in melanoma models can also be encouraging.

Keywords: melanoma, progression, molecular markers, tumor microenvironment

Levelezési cím: Dr. Tímár József, Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93.

Tel.: 06-20-825-9685, e-mail: jtimar@gmail.com

Közlésre érkezett: 2015. október 8. • Elfogadva: 2015. október 25.

Magyar Onkológia 59:275–281, 2015

BEVEZETÉS

A malignus melanoma az onkológia egyik legnagyobb kihívása, mert szemben a legtöbb gyakori szolid daganattal, genetikailag kemo- és sugárterápia-rezisztens. Ezzel párosul az, hogy biológiailag a legagresszívebb rosszindulatú daganat, amely az ún. T1-es, milliméteres stádiumban is nem elenyésző százalékban végül is áttétes betegséggé fejlődik. Bár az elmúlt évek paradigmaváltást hoztak ennek a daganatféleségnek a kezelésében is a molekulárisan célzott és az immunterápia bevezetésével, ezek eredményei az esetek csak igen kis százalékában tartósak. Hazánkban a malignus melanoma nem szerepel a leggyakoribb rosszindulatú daganatok között, mégis a daganathaláláshoz jelentős a hozzájárulása. Bizonyos értelemben árva (orphan) daganatnak tekinthető, ezért a rákkutatás figyelmének nincsen (vagy nem volt) a középpontjában. Különösen igaz ez hazánkban, ahol maga a rákkutatás sem prioritás, és így a melanomakutatás sem. Ennek ellenére az elmúlt évtizedben jelentős melanomakutatás folyt a Semmelweis Egyetemen, a Debreceni Egyetemen és az Országos Onkológiai Intézetben, amelyek eredményei nemzetközi híreik ma már. Korábban az Országos Onkológiai Intézethez köthető immunonkológiai és molekuláris patológiai kutatásokról beszámoltunk (1,2), a jelen tanulmány a kutatócsoportok azóta született eredményeit foglalja össze abban a reményben, hogy ezek legalább egy része hamarosan klinikai felhasználásra kerülhet, amennyiben ezek a kutatások további támogatást kapnak.

A MELANOMA PROGRESSZIÓJÁNAK MOLEKULÁRIS MARKEREI (DEBRECENI EGYETEM)

Humán melanomaszöveteknél is jól ismert a heterogenitás mind sejt-, mind molekuláris szinten egyaránt. Az eltérő molekuláris összetételű sejtklónok jelenléte ugyanazon daganaton belül különböző biológiai kimenetelhez vezethet, jelentősen befolyásolva mind az alkalmazott terápia hatékonyságát, mind pedig a betegség prognózisát, a daganatsejtek invazív tulajdonságát és áttétképző hajlamát. A melanoma egy olyan komplex daganatos betegség, mely mind molekuláris, mind fenotípusszinten egyaránt megjelenik. Az egyre elterjedtebbé váló nagy felbontású array technikák és az elmúlt két évtized robbanásszerű bioinformatikai fejlődése ma már lehetővé teszi a különböző biológiai viselkedésű és molekuláris altípusú melanoma minták közötti molekuláris eltérések feltérképezését, a nagy mennyiségű adatból biológiailag releváns információk kinyerését. Az eltérések közül jól ismert, hogy a melanomák 50–70%-ában kimutatható a BRAF onkogén aktivációs mutációja, mely 80–90%-

ban a 600-as aminosav kodonon elhelyezkedő valin-lizin konverziót jelenti (V600E). A BRAF gén mutációja mellett az NRAS aktiváló mutációi (melanomák ~13–25%-a) – leginkább a Q61 és G12 aminosav pozícióban – is egyre jelentősebb szerepet kapnak, többek között, mint jelátviteli „kerülő út” a mutáns BRAF fehérje inhibitorral szemben kialakult rezisztencia során. A két génmutáció jelenléte azonban kizárólagos egyedi sejt szinten, mivel mindkét onkogén a Ras/MAP-kináz jelátviteli lánc része, együttesen így nem fordulnak elő (3). Korábbi tanulmányok során már bizonyítást nyert az is, hogy bár a BRAF- vagy NRAS-mutációk a tumorfejlődés korai szakaszában már megjelennek, egyedüli jelenlétük nem elegendő a daganat kialakulásához.

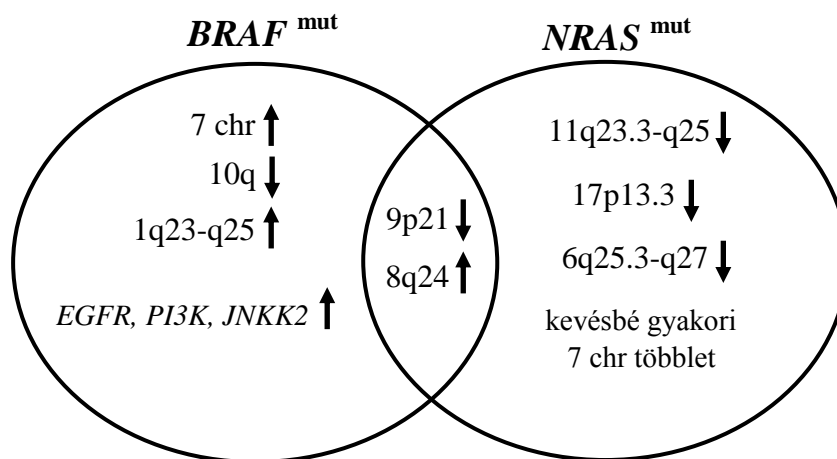
Vizsgálataink egyik fókuszpontja a BRAF- vagy NRAS-mutációt hordozó és dupla vad típusú primer melanomák génelterés-mintázatai közötti különbségek feltárása volt array komparatív genomhibridizációs (aCGH) technika segítségével (4). Eredményeink szerint a BRAF-mutációt hordozó daganatokban szignifikánsan magasabb a genomi kópiaszám-eltérések száma a dupla (BRAF és NRAS) vad típusú melanoma szövetekhez képest. Az aktiváló mutáció pedig elsősorban a 10q23-q26 régió vesztésével, valamint az 1q23-q25 lókuszt és a 7-es kromoszóma többletével társulnak. A leggyakoribb nagymértékű amplifikációt a 7q36.3 régióban figyeltük meg, ahol a PTPRN2 onkogén lokalizálódik (4). Ennek a génnek a szerepét kiterjedten vizsgálták más típusú daganatokban (pl. emlődaganatok), melyekben a géntermék inhibíciójával sikeresen tudták csökkenteni az áttétek számát. Ugyanakkor a 11q23-q25 szekvencia deléciója elsősorban az NRAS-mutációval mutat összefüggést (4). Az itt elhelyezkedő OPCML gén terméke a tirozinkináz-receptorok gátlásán keresztül fejt ki hatását. A másik gyakori, NRAS-mutációhoz kapcsolt eltérés a 17p13.3 kromoszómális régió deléciója, ahol a két nemrégiben azonosított tumorszuppresszor gén (HIC1 és OVCA1) deléciója mellett a lókuszt hemizigóta állapota sejtciklus-deregulációt vált ki és tumorigenezist indukál (4). A 6p22.3 (E2F3) többlete, valamint a 9p21 (CDKN2A) régió vesztése ugyanakkor gyakrabban fordul elő a BRAF- vagy NRAS-mutációt hordozó melanomákban a dupla vad típusúakkal szemben, mely utóbbiakat leginkább a 17-es (17q24-q25-amplifikáció) és a 4-es (4q23-q25-hiány) kromoszómák gyakori kópiaszám-eltérései jellemzik (4). A 9p21-es lókuszt familiáris melanomákban gyakori vesztését a sporadikus melanomák progressziója során munkacsoportunk már egy korábbi tanulmányában vizsgálta. A teljes lókuszt deléciója a vizsgált minták nagy százalékában (84%) jelent meg stádiumtól függetlenül és főként heterozigóciavesztés formájában (5). Vagyis a MAPK útvonal sérülése együtt a 9p21-es régió vesztésével fontos lehet a kedvezőtlen biológiai kimenetel létrejöttében.

Kután primer melanomákon végzett aCGH-vizsgálataink a CCND1 onkogént kódoló 11q13-as régió gyakori kópiaszám-többletét is kimutatta. Ezért az onkogén szerepének részletes vizsgálatát is elvégeztük. A gén amplifikációja összefüggést mutatott a melanoma számos ismert klasszikus prognosztikai markerével és a kedvezőtlen klinikai kimenetelt eredményező klinikai paraméterrel, mint a primer melanomaszövet felszíni kifeléelyesedése vagy áttétképzése. Megfigyeltük, hogy a CCND1-génamplifikációt tartalmazó mintáknál a beteg 5 éves túlélési esélyei is rosszabbak, valamint eredményeink szerint a többszörös áttétképző (regionális és egy vagy több távoli szervi metasztázis) mintákban kifejezettebb az amplifikáció jelenléte (6). Mivel a napsugárzás ultraibolya-tartománya jól ismert exogén faktor a melanomák adott csoportjainak kialakulásában, ezért fontosnak tartottuk meghatározni a CCND1-eltérések szerepét annak függvényében is, hogy a testfelület különböző részein megjelenő melanomák milyen mértékben vannak napsugárzásnak kitéve. Megfigyelésünk szerint a CCND1-amplifikációval és fokozott mRNS-szinttel jellemezhető minták a testfelület azon részén jelentek meg, melyek krónikus napsugárzás által voltak exponálva. Fontos megjegyezni, hogy ezekben a mintákban csak ritkán fordultak elő a BRAF és/vagy NRAS onkogének mutációi. A CCND1 onkogén fokozott expresszióját fehérjeszinten is megfigyeltük a progresszió előrehaladásával, bár ez kevésbé volt kifejezett (6). A CCND1 onkogén ugyanakkor egy olyan amplifikációs klaszterben lokalizálódik, melyben öt potenciális onkogén hatása is jelentkezhethet. Vizsgálataink szerint a 13q14 amplifikációs klaszterben a CCND1 génnel együtt több kandidáns gén (TAOS1, FGF3, FGF4, FGF19 és EMS1) ko-amplifikációja is előfordul (3). Megfigyeltük, hogy ezeknek a géneknek az együttes amplifikációja elsősorban a rosszabb prognózist eredményező daganatokra jellemző. Ezek közül a gének közül a CCND1 és TAOS1 gének együttes emelkedett géndózisa a minták kb. 15%-ában mutatható ki. A kettős amplifikációt mutató minták döntő többségének a felszíne kifeléelyesedett volt. A TAOS1 gén a sejtciklus kontrollban és a sejtproliferáció szabályozásában játszik szerepet, és a CCND1-gyel kooperálva valószínűleg egy agresszívabb fenotípus kialakításához járul hozzá (3).

Mivel a gének, illetve az általuk kódolt fehérjék elsősorban más molekulákkal való interakciókon keresztül fejtik ki hatásukat, az eltéréseket a jelátviteli útvonalak szintjén is vizsgáltuk. A BRAF-mutációt hordozó daganatokban leggyakrabban az EGF/MAPK és JAK jelátviteli útvonalak közötti interakcióban részt vevő fehérjéket kódoló gének sérülnek, de hasonló mintázat figyelhető meg a MAPK-IGF és JAK-IGF útvonalak között is (4). Ezek közé a gének közé számos jól ismert (pl. EGFR, PI3K vagy JNKK2) és kevésbé ismert (pl. PEA15, ELK4 vagy SHC1) onkogén tartozik. Továbbá a BRAF-mutáció jelenléte egy sajátos

deléciós mintázattal is társul, melyek közül a PTEN, JNK1 és HVH-3 gének együttes deléciója szembetűnő. Ellentétben a PTEN tumorszuppresszor génnel, a JNK1 és HVH-3 gének melanoma progresszióban betöltött szerepéről viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre.

Annak ellenére, hogy az NRAS és BRAF onkogének mutációi egyazon jelátviteli útvonal konstans aktivációjában vesznek részt, a primer melanomák kialakulása és fejlődése során eltérő genetikai alterációkkal kooperálnak (1. ábra). Ez a melanoma progressziója során tapasztalt jelenség rendkívül figyelemre méltó, hiszen arra utalhat, hogy a BRAF- és NRAS-mutációk egyfajta vezérlő szerepet töltenek be az alternatív genetikai útvonalakat feltételező melanomagenézis során. Ezeknek az eltéréseknek a felismerése új, célzott terápiás célpontok azonosítására nyújt lehetőséget a mutációk hatásának gyengítését célzó kezelések mellett, mint a közelmúltban elfogadott mutáns BRAFV600E fehérje működését célzó molekuláris terápia (vemurafenib).



1. ábra. A BRAF- és NRAS-mutációs alcsoportokhoz tartozó leggyakoribb kópiaszám-eltérések. A felfelé mutató nyilak az adott kromoszomális régió vagy génkópiaszám növekedését/amplifikációját vagy csökkenését/delécióját jelzik (4).

A mutáns BRAF-molekulát célzó gyógyszeres kezelés egyik fő hátránya a korán (átlagosan 6 hónap) kialakuló rezisztencia. Ezért munkacsoportunk jelenleg folytat vizsgálatokat többek között a rezisztencia hátterében álló eltérések feltérképezésére. Saját eddigi és más kutatócsoportok eredményei által már ismert, hogy az egyik elkerülő mechanizmus a CRAF és NRAS molekulák érintettségén kívül az EGFR onkogén (7p12) expressziójának extrém fokozódása a korábban EGFR-negatív mintákban is. Egy korábbi tanulmányunkban már felfigyeltünk az EGFR kiemelkedő szerepére a primer melanoma progressziója során, ahol a gén kópiaszám többlete és fokozott génexpressziója legtöbbször rossz prognózissal társult (7).

A gének kópiaszám és mRNS-expressziós szintek között lineáris kapcsolat azonban nem minden esetben volt kimutatható. Ennek számos oka lehet, többek között az, hogy az EGFR-géntöbblet önmagában nem feltétlenül bír erős prognosztikai jelentőséggel. A fokozott genetikai instabilitásnak köszönhetően gyakran a teljes 7-es kromoszóma vagy a kromoszóma egy jelentős része sérül a progresszió során, melynek eredménye az lesz, hogy az EGFR génnel együtt amplifikálódó gének hatása is érvényesül. Eredményeink alapján az EGFR kópiaszám többlete prognosztikai markere lehet az áttétképzésnek és a terápia megválasztását is befolyásolhatja, de ugyanakkor fontos, hogy az extra gének kópiával rendelkező mintákban az mRNS- és/vagy fehérjeszintek is meghatározásra kerüljenek (7).

A 7-es kromoszóma eltéréseinek elemzése során a 7p12-es régió alterációi mellett a 7q31-es régió gyakori eltéréseit is megfigyeltük. Ez a DNS-szekvencia egy rendkívül „génsűrű” szakasz, melyen a FRA7G „törékeny pont” helyezkedik el. Eredményeink alapján ennek eltérései hozzájárulnak a melanomák kedvezőtlen klinikai kimeneteléhez (8). A fragilis DNS-régiók szerkezetükből kifolyólag instabilak és gyakori célpontjai a progresszió során bekövetkező kromoszomális töréseknek és átrendeződéseknek. Az ezeken a szekvenciákon elhelyezkedő gének eltérései mind deléció és/vagy amplifikáció, mind pedig normális kópiaszám melletti heterozigótaságvesztés (anyai vagy apai allél elvesztése) formájában gyakori eltérések. Munkacsoportunk ezért a FRA7G „törékeny pont” közvetlen közelében lokalizált gének, mint a multifunkciós CAV1 (membrán lipídutajok alapköve) és a tumorszuppresszor TES eltéréseit is vizsgálta. A TES, annak ellenére, hogy csökkent mRNS-szintje szignifikánsan jelenik meg a többszörös áttétképző mintákban, az általunk vizsgált minta kohortban nem mutatott jelentős prognosztikai szerepet. Eltérése feltehetőleg a fokozott kromoszomális/genom instabilitás mellékhatásának tekinthető. Ezzel szemben a CAV1 mRNS-szintje a tumor vastagságának növekedésével fokozódott, ez a kapcsolat fehérjeszinten is jelentkezett, ami a CAV1-eltérést mutató daganatsejtek invázióban betöltött lehetséges szerepére utalhat, így segítve elő az áttétképzést (8). Ezt támasztják alá a munkacsoportunk által jelenleg sejtvonal modellrendszeren végzett vizsgálatok is, melyek során a CAV1 fokozott expresszióját mind mRNS-, mind fehérjeszinten kimutattuk. A nagy felbontású genomarray (array CGH) vizsgálatok mellett génexpressziós csip elemzéseket is végeztünk. Génexpressziós vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a felszíni kifeléyesedéssel jellemezhető primer melanoma mintákban egy 987 génből álló downregulációs klaszter figyelhető meg. Ezeknek a géneknek mindössze 15%-a (150 gén) mutat valamilyen mértékű deléciót, melyek többsége a 6q és 10q kromoszómaszekvenciákon lokalizálódik, befolyásolva a sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatokat, valamint az apoptózis szabályozását is. További 11

(~1%) génnél a gének alulszabályozásának hátterében epigenetikai folyamatok, géncsendesítés áll (9). Az „alulszabályozott” génklaszter mellett 93 génre jelentős mRNS-expressziós szintbeli növekedést is megfigyeltünk. Ezek közül a legnagyobb változást az oszteopontin (OPN) mutatta, melyet fehérjeszinten is sikerült megerősíteni (9). A fehérje kifejeződését a vizsgált primer melanomák 90%-ában kimutattuk. Klinikai adatokkal történt korrelációs analízisünk szerint a fokozódó OPN-expressziós szintek kedvezőtlenül befolyásolják a betegség kimenetelét (10).

EPIGENETIKAI ELTÉRÉSEK MELANOMÁKBAN (DEBRECENI EGYETEM)

A genetikai eltéréseken kívül a daganatok kialakulásában és progressziójában igen fontos szerepet játszhatnak az epigenetikai változások, melyek közül a legjobban tanulmányozott és legstabilabb, öröklődő forma a DNS-metiláció. A gének promoter régióin gyakori ún. CpG-szigeteken előforduló hipermetiláció direkt módon akadályozhatja a génátírást, ezért jelenleg intenzív kutatások tárgya. A melanomák hipermetilációjának vizsgálata eddig mindössze kandidáns gén megközelítéssel vagy olyan globális, de indirekt módszerekkel történt, melyek során elsőként vizsgálták a teljes genom génexpresszióját, majd egy agresszív demetilációs kezelést követően újra elemezték a génexpressziós mintázatot, ezzel közvetve azonosították az eredeti állapotban hipermetilált géneket. Mivel a genom nagyobb részét analizáló korábbi metilációs tanulmányok a melanomák és a szomszédos normális szövetek vonatkozásában végeztek összehasonlító vizsgálatokat, munkacsoportunk arra a kérdésre kereste a választ, hogy a melanoma genom epigenetikai mintázata változik-e a daganatprogresszió különböző szakaszaiban.

Lokalizált DNS-metilációs eredményeink értékelése során részletesen tanulmányoztuk az ismert klinikai paramétereket (Breslow-vastagság, áttétképzés, ulceráció és szöveti altípus) jellemző metilációs mintázatot. Összesen 111 egyedi gént érintett az egyes csoportok között felismert eltérő metilációs mintázat. Eredményeink szerint a progresszió folyamatát leginkább a metiláció csökkenése jellemzi, DNS-hipermetilációra lényegesen kevesebb példát találtunk. Megállapítottuk, hogy a különböző klinikai paramétereket jellegzetesen egyedi metilációs mintázat jellemzi (11). Terápiás jelentősége miatt részletesen vizsgáltuk a BRAFV600E mutáció és a DNS-metiláció kapcsolatát. A mutációval asszociálódó megváltozott metilációjú gének többsége hipermetilálódott, és a sejt-kommunikációban, továbbá az extracelluláris mátrix receptor interakcióban játszott szerepet, ugyanakkor kevés átfedést mutatott a négy klinikai paraméterrel összefüggő, összesen 111 metilált génnel (ld. fentebb). A jelenség így a

mutáció egyedi vezérlő szerepét veti fel a DNS-metiláció szabályozásában, mely jelenleg további vizsgálatok tárgyát képezi (11). Vizsgáltuk továbbá a DNS-metiláció és a melanomás betegek 5 éves túlélése közötti kapcsolatot. A klinikai paraméterekre korrigálva egyetlen génnél, a KIT génnél láttunk példát arra, hogy a hipermetiláció csökkent túlélési eséllyel társul (11).

Párhuzamos génkópiaszám-vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a metilációs mintázatot fenntartó enzimet (DNMT1) kódoló gént tartalmazó 19p13.2-es szakasz a vastagabb daganatokban (Breslow-vastagság >4 mm) delécióát szenved. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a DNMT1 gén deléciója hozzájárul a korábban említett transzpozon, továbbá génpromoter-régiókat érintő hipometilációs tendenciához. A Knudson-féle „two-hit” hipotézis értelmében a megváltozott génexpressziós mintázathoz egyszerre több szomatikus DNS-változás is szükséges. Promotermetilációs eredményeinket génkópiaszám-adatainkkal integrálva megállapítottuk, hogy a 6q23-as szakaszon lokalizálódó MYB és az EYA4 géneknél a két különböző szomatikus DNS-alteráció (deléció és DNS-hipermetiláció) a fent említett hipotézis értelmében együttesen alakítja ki a melanómák megváltozott génexpressziós fenotípusát. A 6q23-as szakasz delécióját FISH-vizsgálattal is megerősítettük (11).

A lokalizált hipermetiláció mellett máig alábecsült az ún. genomszintű hipometiláció jelensége, melyet sokáig a karcinogenezis passzív következményeként írtak le. Később azonban emlődaganatokban sikerült bizonyítani, hogy egy aktív és irányított folyamat, mely a tumorigenezis korai szakaszában is jelentkezhet, ezért további vizsgálatokra érdemes kandidáns diagnosztikai markerként értelmezhetjük. A genomszintű hipometiláció – kialakulásának okától függetlenül – hozzájárul a valamennyi daganattípust jellemző genetikai instabilitáshoz az ún. ismétlődő szekvenciák demetilációja által. Ezek az ismétlődő szekvenciák olyan mozgékony genetikai elemek, melyek az evolúció során épültek a humán genomba, ahol a teljes genetikai anyag több mint 40%-át képviselik. A humán genomban metiláltságuk révén maradhatnak védve a génátíródástól, metilációjuk megszűnése egyúttal aktivációjukat is jelenti, mely erős homológiájukat tekintve rekombinációs események sorozatát indítja el. Ez utóbbi további deléciókat és inszerciókat kialakítva jelentősen hozzájárul a kariotípusos instabilitáshoz. Vizsgálataink során a LINE1 transzpozonszekvencia promoterrégióján található 6 CpG pontmetilációját határoztuk meg Na-biszulfid piroszekvenálással. Eredményeink alapján az 5 éven belül áttétet képző melanómákat markáns transzpozonális demetiláció jellemezi. Ez a jelenség képezheti a jövőben egy LINE1 transzpozonmetilációt célzó diagnosztikai vagy predikciós teszt kidolgozását (12).

A GAZDASZERVEZET NEMÉNEK SZEREPE A MELANOMA PROGRESSZIÓJÁBAN (SEMMELWEIS EGYETEM, ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET)

Klinikailag ismert, hogy a női nem kedvező prognosztikai tényező malignus melanoma esetében, bár ennek alapjai nem ismertek. Korábban felmerült kísérleti modellekben, hogy a nemi hormonok befolyásolhatják a melanoma biológiai viselkedését, de a kísérleti adatok ellentmondásosak voltak. Humán melanoma májmetasztázis állatkísérleti modelljében (SCID egér) korábban már megfigyeltük, hogy az áttétképzés hatékonysága gyengébb a nőstény hordozókban (13). A kérdést tovább vizsgálva kiderült, hogy a jelenség csak a májáttétképzésre vonatkozik, más szervek esetében nem észlelhető. Felmerült az, hogy a melanomasejtek funkcionálisan aktív nemihormon-receptorral rendelkeznek. Vizsgálataink szerint emberi melanomákban az ösztrogén- és androgénreceptorok fehérjeszinten nem, vagy csak igen alacsony szinten expresszálódnak, így a sexhormonok nem hatnak közvetlenül a daganatsejtekre, ezért a gazdaszervezet egyes sejtjeire terelődött az antimetasztatikus aktivitás gyanúja. Vizsgálataink a máj Kupffer- és NK-sejtjeire irányultak, és igazoltuk, hogy kísérleti állatokban mindkettőnek van jelentős antimetasztatikus aktivitása, de csak az NK-sejtek szerepe függ a nemtől, ezek a sejtek aktívabbak a nőstényekben. Ezt a megfigyelést NK-sejt nélküli kísérleti állatokban is igazolni lehetett. Bár e megfigyeléseinknek nem lett nagyobb nemzetközi visszhangja, az immunonkológiai kezelési protokollok bevonulása a mindennapi klinikai gyakorlatba megváltoztathatja ezt a helyzetet. Feltételezhető, hogy a célzott immunstimulációs kezelések (anti-CTLA4 és anti-PD-1 antitestek) klinikai aktivitását a beteg neme befolyásolhatja. Hogy ez csak a májáttétképzésre vagy más szervi áttétekre is vonatkozik, további klinikai kutatások tárgya kell, hogy legyen (13). Munkacsoportunk e vizsgálatok során felfigyelt az emberi melanomasejtekben a glükokortikoidreceptor(ok) mRNS- és fehérjeszintű kifejeződésére. A GCR funkcionálisan aktívnak bizonyult, az emberi melanomasejtek érzékenyek bizonyultak dexametazonra, amelynek proliferációgátló, de főleg apoptózisindukáló hatása volt. A glükokortikoidok sokféle módon képesek befolyásolni a daganat és a gazdaszervezet kölcsönhatásait. Egyrészt ismert az immunszuppresszív hatásuk, amit főleg az autoimmun betegségekben aknáznak ki. Másrészt azonban számos daganatellenes terápiás protokoll része a szteroidkezelés. Felmerül, hogy melanoma esetében a dexametazonkezelés citosztatikus hatású lehetne, aminek jelentőségét nem lehet alábecsülni

ebben a kemorezisztens daganatban. Ezzel kapcsolatban fontos lehet, hogy in vitro a DTIC-kezelés antiproliferatív hatásait dexametazonnal fokozni lehetett (14).

EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX FEHÉRJÉK VAGY RECEPTORAIK PROGNOZTIKUS SZEREPE (SEMMELWEIS EGYETEM)

A transzmembrán kollagén XVII (cXVIIwt) a bőrhám fontos mátrixreceptora, amely a hámsejtekben van jelen. Kiderült, hogy bár nyugvó melanocitákban nincsen jelen ez a fehérje, proliferáló sejtekben megjelenik. Emberi melanomákban a cXVII gén mutációt szenved el, amely az ektodomént érinti. Emiatt diszplasztikus naevusokban és melanomákban csak a citoplazmatikus része van jelen a fehérjének, ami alkalmassá teszi felhasználását a mindennapi rutin patológiai diagnosztikában. Legalább ilyen fontos megfigyelés az is, hogy a citoplazmatikus cXVII szakasz elleni antitesttel emberi melanomákban in vitro apoptózis indukálható (15).

Néhány gént úgy ismerünk, mint az áttétképzés onkogénje (metasztázisgén), ezek közül elsőként azonosították ilyennek a CD44 proteoglikánt, amely kondroitin- és heparánszulfáttal (HS) glikanálódhat. A CD44-nek 10 variábilis exonja van, és a hasítási variabilitás eredményeként igen sokféle fehérjét kódolhat, amely mátrixreceptorként vagy segítő növekedési faktor receptorként szolgálhat. Korábbi vizsgálatainkban a HS variáns CD44v3 exon expresszióját észleltük emberi melanomában, és kimutattuk kedvezőtlen prognosztikus szerepét (16). Újgenerációs szekvenálás segítségével a teljes CD44-variabilitást elemeztük különféle daganatokban, közöttük emberi melanomában, és jellegzetes melanomahasítási mintázatot detektáltunk. In vivo spontán áttétképzési modellben megállapítható volt, hogy az áttétképző emberi melanomasejtekben jelentősen emelkedik a melanoma CD44-expressziója, amelyben a v3-tartalmú variánsok vannak jelen döntően. E megfigyeléseink arra utalnak, hogy melanoma esetében a CD44 HS-tartalmú hasítási variánsai metastázisképződést elősegítő szereppel rendelkeznek.

ÚJ MELANOMAKEZELÉSI LEHETŐSÉGEK PREKLINIKAI MODELLEKBEN (SEMMELWEIS EGYETEM, ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET)

Ismert a heparin daganatellenes hatása klinikai körülmények között, de ennek pontos mechanizmusa, az ezért felelős kémiai struktúra nem. 4–22 tagú, heparineredetű poliszacharidok biológiai hatásait teszteltük in vitro és in vivo emberi melanomasejteken. A

legtöbb fragmens jelentős antimigrációs hatásának bizonyult, míg csak egy, a dp18 rendelkezett antiproliferatív hatással is. Feltűnő volt, hogy az antimigrációs hatás a melanoma CD44v3 receptorán keresztül valósult meg. Ami talán még érdekesebb, hogy in vivo körülmények között a dp4 és dp18 heparinfragmensek antimetasztatikus hatásának bizonyultak kísérleti állatokban. Ezek a vizsgálatok arra utalnak, hogy a heparinszármazékoknak jelentős daganatellenes hatásai lehetnek emberi melanoma esetében (17).

Az EGF- és az FGF-receptorok működéséhez elengedhetetlen a heparánszulfát-tartalmú segédreceptorok, mint a CD44 segítő szerepe. Normális melanocitákban, de melanomasejtekben is jelen van és működhet az EGF- és FGF-receptor. Ugyanakkor a melanomáknak három nagy molekuláris alcsoportját ismerjük, a BRAF-, NRAS-mutánsokat és a kettős vad genotípust. Kérdéses ugyanakkor, hogy a molekuláris altípusok befolyásolják-e a receptorok működését. Kísérleti rendszerekben kimutattuk, hogy mind az EGF, mind pedig az FGF2 stimulálja az emberi melanomasejteket, de a BRAF- vagy NRAS-mutációs státusz lecsökkenti ezt a reagálóképességet. Feltűnő volt, hogy az EGF és FGF2 elsősorban motilitási választ generált emberi melanomasejtekben, melynek fő jelpályája a MAPK útvonal volt. Ahogyan az várható volt, EGFR és FGFR tirozinkináz-inhibitorok csak a kettős vad státuszú daganatsejtekben hatottak, míg a mutánsok rezisztensnek bizonyultak. Ezek a megfigyelések ráirányítják a figyelmet a melanomák legkisebb, mintegy 20–30%-át adó molekuláris altípus lehetséges új célzott terápiájára (18).

A kannabinoidok esetleges orvosi alkalmazása ma in-tenzív kutatások tárgya. Miután a melanociták neuroektodermális eredetűek, felmerült, hogy daganataik, a melanomák, esetleg rendelkeznek endokannabinoid-receptorral. Vizsgálataink szerint különböző molekuláris alcsoportba tartozó emberi melanoma-sejtvonalakban expresszálódik a CNR1 gén és fehérjeterméke, a CB1-receptor, amelyet a sejtmembránban is ki lehet mutatni. A CB1-receptor funkcionálisan aktívnak bizonyult, és természetes vagy mesterséges ligandumai antiproliferatív, antimigrációs és proapoptotikus hatást váltottak ki in vitro emberi melanoma-sejtvonalakban. Ami ennél még biztatóbb, az az, hogy in vivo az egyik mesterséges ligandum, az ACEA, gátolni volt képes a melanoma májmetasztázis képző képességét. Ezek a kísérletes eredmények azokat a megfigyeléseket erősítik, hogy a kannabinoidoknak ismert fájdalomcsillapító hatásuk mellett specifikus daganatellenes hatásuk is lehet (19).

A RAS-mutáns daganatok ma a legnagyobb kihívást jelentik az onkológiában, mert a célzott terápiára rezisztensek: ez a helyzet az NRAS-mutáns melanoma esetében

is. Számos próbálkozás történt a Ras fehérje funkciójának blokkolására, de ezek nem bizonyultak sikeresnek. Az egyik ilyen elképzelés az volt, hogy a Ras fehérje membránhoz történő kihorgonyozódását biztosító farnezilációt blokkolják, azonban alternatív prenilációs mechanizmusok ezt megakadályozták. A klinikai gyakorlatban manapság kiterjedten használnak egy prenilációgátlót, az aminobiszfoszfonátot, amelynek biológiai hatásait elemeztük emberi melanoma-sejtvonalakban. Az aminobiszfoszfonát-kezelés elsősorban az NRAS-mutáns melanomasejtekben indukált apoptózist, és gátolta a klonogén túlélő képességet, míg a BRAF-mutáns vagy dupla vad sejtekre alig volt hatással. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy szemben más rendszerekkel, az NRAS-mutáns melanomasejtek érzékenyek a prenilációgátlással szemben, ami felveti annak a lehetőségét, hogy ezen az úton elindulva célzott terápiákat lehessen fejleszteni erre a molekuláris altípusra is (20).

A CMET onkogén fehérje terméke, a c-met protein manapság válik egy lehetséges daganatellenes terápia célpontjává. Ismeretes, hogy melanociták migrációs képességét a c-met szabályozza/mediálja. Emberi melanoma-sejtvonalakban a CMET vad típusú, a korábban publikált tirozinkináz- vagy extracelluláris domén génhibák egyikét sem tartalmazták. Ennek ellenére ezekben a sejtvonalakban a c-met proteinkináz konstitutívan aktívnak bizonyult. A specifikus met-kináz-gátló SU11274 blokkolta a c-met protein autofoszforilációját, és antiproliferatív hatásának bizonyult, amit elsősorban apoptózisindukcióval lehetett magyarázni. Ezen túlmenően, a c-met gátlása a melanomasejtek in vitro migrációját is gátolta. A SU11274 aktívnak bizonyult in vivo humán melanoma kísérletes májáttétképzési modelljében, ahol mind a primer, mind pedig az áttéti daganatra hatott (21).

IRODALOM

1. Rásó E, Barbai T, Győrffy B, Tímár J. A malignus melanoma prognosztikus és prediktív markerei. *Magyar Onkológia* 57:79–83, 2013
2. Ladányi A. A tumort infiltráló immunsejtek prognosztikai értéke melanomában. *Magyar Onkológia* 57:85–95, 2013
3. Lázár V, Ecsedi S, Szöllősi AG, et al. Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma. *Mod Pathol* 22:1367–1378, 2009

4. Lázár V, Ecsedi S, Vízkeleti L, et al. Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization. *Melanoma Res* 22:202–214, 2012
5. Rákósy Z, Vízkeleti L, Ecsedi S, et al. Characterization of 9p21 copy number alterations in human melanoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 182:116–121, 2008
6. Vízkeleti L, Ecsedi S, Rákósy Z, et al. The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma. *Tumor Biol* 33:2189–2199, 2012
7. Rákósy Z, Vízkeleti L, Ecsedi S, et al. EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 121:1729–1737, 2007
8. Vízkeleti L, Ecsedi S, Rákósy Z, et al. Prognostic relevance of the expressions of CAV1 and TES genes on 7q31 in melanoma. *Front Biosci (Elite Ed)* 4:1802–1812, 2012
9. Rákósy Z, Ecsedi S, Tóth R, et al. Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration. *Plos One* 8:e54958, 2013
10. Kiss T, Ecsedi S, Vízkeleti L, et al. The role of osteopontin expression in melanoma progression. *Tumour Biol* 36:7841–7847, 2015
11. Ecsedi S, Hernandez-Vargas H, Lima SC, et al. DNA methylation characteristics of primary melanomas with distinct biological behaviour. *PlosOne* 9: e96612, 2014
12. Ecsedi S, Hernandez-Vargas H, Lima SC, et al. Transposable hypomethylation is associated with metastatic capacity of primary melanomas. *Int J Clin Exp Pathol* 6:2943–2948, 2013
13. Dobos J, Mohos A, Tóvári J, et al. Sex-dependent liver colonization of human melanoma in SCID mice – role of host defense mechanisms. *Clin Exp Metastasis* 30:497–506, 2013
14. Dobos J, Kenessey I, Tímár J, Ladányi A. Glucocorticoid receptor expression and antiproliferative effect of dexamethasone on human melanoma cells. *Pathol Oncol Res* 17:729–734, 2011
15. Krenacs T, Kiszner G, Stelkovic E, et al. Collagen XVII is expressed in malignant but not in benign melanocytic tumors and it can mediate antibody induced melanoma apoptosis. *Histochem Cell Biol* 138:653–667, 2012
16. Raso-Barnett L, Banky B, Barbai T, et al. Demonstration of a melanoma-specific CD44 alternative splicing pattern that remains qualitatively stable, but shows quantitative changes during tumour progression. *PloS One* 8:e53883, 2013

17. Kenessey I, Simon E, Futosi K, et al. Antimigratory and antimetastatic effect of heparin-derived 4-18 unit oligosaccharides in a preclinical human melanoma metastasis model. *Thromb Haemost* 102:1265–1273, 2009
18. Garay T, Molnar E, Juhasz E, et al. Sensitivity of melanoma cells to EGFR and FGFR activation but not inhibition is influenced by oncogenic BRAF and NRAS mutations. *Pathol Oncol Res* 21:957-968, 2015
19. Kenessey I, Bánki B, Márk Á, et al. Revisiting CB1 receptor as drug target in human melanoma. *Pathol Oncol Res* 18:857–866, 2012
20. Garay T, Kenessey I, Molnár E, et al. Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in BRAF mutant/PTEN wild-type melanoma cells. *PloS One* 10:e0117021, 2015
21. Kenessey I, Keszthelyi M, Krámer Z, et al. Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr Cancer Drug Targets* 10:332–342, 2010

