

A molekuláris biológiai módszerek dermatopatológiai vonatkozásai

The influence of molecular biology in the dermatopathology

NÉMETH ISTVÁN BALÁZS DR.¹, SZADAI LETÍCIA DR.¹, JÁNOSI ÁGNES DR.¹,
ÚJFALUDI ZSUZSANNA DR.², PANKOTAI TIBOR DR.², MARKÓ-VARGA GYÖRGY DR.⁴,
KEMÉNY LAJOS DR.¹, VARGA ERIKA DR.¹

SZTE, SZAOK, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika, Szeged¹

SZTE, SZAOK, Pathológiai Intézet, Szeged²

SZTE, SZAOK, Onkoterápiás Klinika, Szeged³

Clinical Protein Science and Imaging, Biomedical Centre, Department of Biomedical Engineering,
Lund University, Lund, Sweden⁴

ÖSSZEFOGLALÁS

A molekuláris biológiai vizsgálómódszerek fejlődése a rutin dermatopatológiai diagnosztikára is nagy hatást gyakorol, elsősorban a melanoma malignum esetében. A melanoma genetikájának megismerésével számos olyan patogenetikai út vonal került felderítésre, amely prognosztikus, vagy prediktív markerként a szövetekben is kimutathatóvá vált. A genetikai vizsgálómódszerek mellett a fehérje alapú nagy felbontású analízisek révén az OMIC stratégia a patológiai laborok kapuján kopogtat. A közlemény összefoglalja az elmúlt években vizsgált molekuláris markerek dermato-onkopatológiai vonatkozásait.

Kulcsszavak:

dermatopatológia – molekuláris patológia –
célzott terápia – immunterápia – OMIC

SUMMARY

The recent advantages of the molecular biologic methods have a deep influence on the routine dermatopathology, especially in case of melanoma. The molecular fingerprint of melanoma has resulted in the tissue validation of potential prognostic and predictive biomarkers. In addition to the DNA-, and RNA-based techniques, deep protein sequencing contributes to the OMIC strategy, affecting the dermatopathology labs. The paper summarizes the recent molecular biological aspects on diagnostic dermatopathology.

Key words:

dermatopathology – molecular pathology –
targeted therapy – immunotherapy – OMIC

A molekuláris biológiai módszerek fejlődésével természetesen megnyílik a lehetőség, hogy a DNS mutációs-, RNS alapú transzkriptomikai-, vagy a fehérje alapú proteomikai eredmények a rutin szövettani diagnosztikában is utat találjanak, hiszen ezek a vizsgálatok alapjai is döntően a kimetszett szövetek. A fenti vizsgálatok számos új eredményt hoznak, új aspektusokat nyitnak meg a még inkább személyre szabott kezelés irányában.

A szövettani diagnosztikában alapvetően három típusú biomarkert különböztetünk meg: 1. a kórisméhez szükséges *diagnosztikus*-, 2. a folyamat biológia viselkedését megbeccsülő *prognosztikus*-, és 3. a terápiára adott válaszkésztséget megítélő *prediktív* biomarkereket (1). Bár a molekuláris biológiai revolúció érinti a biológia minden ágát, a frontvonalban mégis leginkább az onkológiai diagnosztika áll. A fenti integrált molekuláris biológiai vizsgálómódszerek

együttesét OMIC stratégiának (*genomic*, *transcriptomic*, *proteomic*) nevezzük (2). Az stratégia egyik fő kihívása a nagy áttétképző potenciállal, magas mortalitással rendelkező melanoma malignum, amelyről jelenleg a legtöbb adattal rendelkezünk, és a kutatások frontvonalában áll. A mai szöveti alapú diagnosztikában alapvető jelentőségű, hogy az integrált patológiai platformmal nyert, lényegében kutatási adatokat minél hamarabb a betegek szolgálatába állítsuk a transzlációs medicina alapelvei szerint.

Standard bőrpatólógiai vizsgálat melanomában

A melanoma rutin patológiai diagnosztikájában még mindig a legfontosabb prognosztikus markereknek számítanak a Breslow féle abszolút tumorvastagság meg-

határozása és az őrszem nyirokcsomó érintettségének kimutatása. A jelenlegi patológiai stádium meghatározás az AJCC8 kritérium rendszer szerint történik (3). Az ulceráció meglehetősen fontos ún. „upstaging” faktor, emellett a dermális mitotikus aktivitás is önálló prognosztikus marker (4). Vékony melanómák esetében a kiterjedt (>75%) regressziót is érdemes figyelembe venni (5). A vasculáris inváziót, neurotropizmust, a dezmoplasztikus komponenst, a lymphoid védekező reakciót, mikroszatellitákat, meglévő nevust és reszekciós szélek érintettségét is szükséges a dermatopatológiai leletben szerepeltetni (4)

Molekuláris melanoma szubtypusok és szignalizációs utak megjelenése a diagnosztikában

Az elmúlt évek molekuláris biológiai eredményei alapján a melanómák már leírt szubtypusai új megvilágításba kerültek. Így az UV (ultraviola) érintettség alapján a superficiálisan terjedő melanoma (SSM) alacsony UV/CSD (cumulative sun damage); a lentigo maligna melanoma és a dezmoplasztikus melanoma magas UV/CSD kategóriába; a kék naevus típusú melanoma, a Spitz tumorok, ill. az akrális-mukozális melanómák a döntően nem UV-függő csoportokba sorolódtak (6, 7, 8). A melanoma molekuláris ujjlenyomatának feltérképezésével (9, 10) pedig ismertté váltak azok a jelátviteli útvonalak, amelyek fontos diagnosztikus, prognosztikus és prediktív szöveti markereket szolgáltathatnak (11, 12, 13).

A MAPK/ERK jelátviteli útvonalban a két leggyakrabban aktiválódott onkogén a BRAF és az NRAS, amelyekben több mutációs forráspontot azonosítottak, melyek relevánsak a terápiás eljárás kiválasztása során. Például csak a BRAFV600E-mutáns melanómás betegek számára előnyös a BRAF/mitogén által aktivált célzott terápiás protein kináz (MEK) gátlók alkalmazása, míg a BRAFK601E-positív melanoma csak részlegesen reagál az ilyen típusú kezelésre (14, 15). Nem csak terápiás, hanem diagnosztikai szempontból is fontos, hogy a melanotikus tumorokban a fentebb említett MAPK/ERK útvonal mutációi fordulnak elő leggyakrabban. A BRAF és NRAS génekben kialakuló mutációk kimutathatóak, jelen vannak jóindulatú és rosszindulatú elváltozásokban egyaránt. Ezek érintettsége előre vetítheti a melanoma kialakulását, hiszen abban kiemelt fontosságúak, de egy agresszív melanoma kialakulásához további mutációk megjelenése is szükséges. A PI3K/AKT szignalizációs útvonal résztvevői szintén gyakran szenvednek el mutációt melanotikus tumorokban, elsősorban az NRAS és az NF1 mutációi vannak hatással a tumor progressziójára. A PTEN inaktivációja is bekövetkezhet, amely megakadályozza az AKT direkt aktiválását. Hasonló tendencia figyelhető meg a RAC1 esetében is, valamint az AKT3, PREX2 és AKT1 mutációi is gyakoriak. Továbbá a MET, ALK, RET, NTRK1 és NTRK3 fehérjék mutációi szintén elősegítik a metasztatikus kialakulásának valószínűségét, például MET direkt módon serkenti az MMP2 expresszióját, amely nagyobb metasztatikus kockázatot

okoz és rosszabb túlélési prognózist eredményezhet (16). A CDKN2A inaktiválása a melanómák akár 90%-ában kialakul, elsősorban akkor, amikor a melanoma invazív válik. A p14ARF és a p16INK4A a CDKN2A által kódolt két izoforma, melyből a p14 közvetve részt vesz a p53 gátlásában, ami alap esetben gátolja a sejtciklus progresszióját. A p16 a ciklin-függő kináz inhibitor, és a CDK4-CDK6 gátlása révén részt vesz a sejtciklus progressziójában (12, 17). Ezek inaktivációja tehát elementáris hatással lehet a sejtciklus szabályozásának felborulására. A melanoma fejlődése szempontjából fontos még a TERT, telomeráz gén aktiváló mutációja, valamint a BAP1 DNS hibajavító faktor érintettsége (18, 19, 20).

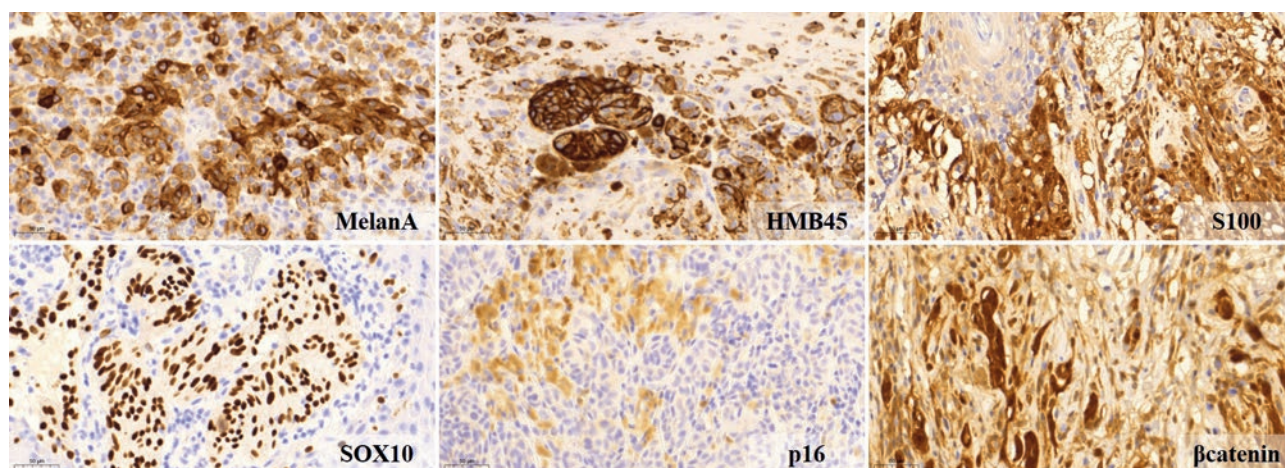
Az intermittáló (alacsony CSD) UV ártalom kiváltotta SSM-ben a MAPK jelátviteli útvonal fő eltérése a BRAF gén V600E jellegű aktiváló mutációja, a CDKN2A (p16) inaktiváló mutációjával, továbbá eltérés lehet az NRAS, TP53, PTEN, ill. TERT génekben is (13). A magas CSD kiváltotta melanómákban NRAS, NF1, CDKN2A, TP53 és TERT mutációk is lehetnek. A döntően nem UV-asszociált melanocyter tumorokban KIT, NRAS, GNA mutációk, továbbá főleg a Spitz tumorokban ALK, NTRK1-3, RAF és RAS fúziós eltérések, ill. BAP-1 inaktiváció alakulhat ki (13).

Immunhisztokémiai vizsgálmódszerek

Rutin MelanA/HMB45/S100/SOX10/Ki67 marker szett és a kiegészítő szöveti markerek

A rutin dermatopatológiai diagnosztikában alapvető immunhisztokémiai markernek számít a MelanA, amely dignitástól függetlenül általában diffúz pozitivitást mutat a melanocyter tumorokban. A HMB45 marker jóindulatú elváltozásokban dermoepidermális junkció-közeli festődést hordoz, a mélyebb dermalis nevussejtek negativitása mellett. Melanomában a dermális területen is megjelenhet, azonban diffúz festődése észlelhető Spitz-, és kék nevus típusú léziókban. Az S100 marker általában diffúz festődést mutat a melanociter tumorokban, még akkor is, ha dedifferenciált, vagy dezmoplasztikus melanómában a többi marker (MelanA, HMB45) elveszett, azonban egyéb (makrofág, idegi eredetű) léziókban is expresszáldhat. Hasonlóan korai melanociter differenciációs nukleáris marker a SOX10 is, azonban ez sem specifikus; neurális eredetű tumorokban, sőt a verejtékmirigy duktusokban is expresszáldhat. A fenti marker-szett (MelanA/HMB45/S100/SOX10) alkalmazható kettős jelölés formájában is, továbbá a Ki67 proliferációs markerrel is kiegészíthető. Az 1. ábra a rutinban használt immunhisztokémiai markerek közül néhány példát szemléltet.

A molekuláris biológiai eredmények alapján több olyan géneltérés és derivát fehérje is szöveti validálásra került és beépült a rutin patológia kelléktárába. Így a p16 fehérje kiesett expressziója fontos dignitást meghatározó faktor a transzformált tumorban, de a BAP-1 kiesés Spitz tumorban, ill. malignizálódott kék naevusban is jelen lehet (21, 22). A PRAME fehérje 75%-os cutoff érték



1. ábra

Rutin paraffinos szöveten alkalmazható immunhisztokémiai festések (eredeti nagyítás 112x, skála: 50µm)

mellett differenciál nevus-melanoma relációban, emellett potenciális targetként vizsgálják immunterápiában (11, 23, 24, 25). A MITF nukleáris marker csökkent kifejeződése a melanoma dedifferenciációjára, így rosszabb prognózisra utal (11, 26). D2-40 és CD31 markerekkel az érinvázio látható, míg a Spitz tumorokban gyakran előforduló fúziós génelterések immunhisztokémiai is vizualizálhatók (NTRK, ROS1, ALK) (11, 21). A βcatenin fehérje nukleáris transzlokációja ún. mélyen penetráló, ill. kombinált anyajegyekben mutatható ki (27). A MAPK útvonal fő eltérése, a BRAFV600E mutáció immunhisztokémiai kimutatása jól reprodukálható protein szinten is (28), az NRAS Q61R esetében is van lehetőség a szöveti kimutatásra (11, 29). Acralis-mucosalis melanomák esetében a CKIT fehérje immunhisztokémiai is vizualizálható, kombinálva genetikai vizsgálattal (30). A forradalminak számító anti-PD-1 immunterápia jelentősen megváltoztatta a disszeminált melanomás betegek kezelhetőségét, azonban a PD-1 ligand immunhisztokémiai kimutatása variabilis prediktív információt melanomában (31), így ez ebben a tumortípusban egyelőre nem képezi a rutint. Ezzel szemben nem melanoma típusú (laphámkarzinómás) bőrrákos betegek esetében a PD-1 ligand expressziójának immunhisztokémiai kimutatása a patológiai rutin része.

BRAFV600E mutált fehérje immunhisztokémiai kimutatása

A fő szignalizációs utak kimutatására ma már jól alkalmazható immunhisztokémiai módszerrel rendelkezünk, így a mutált BRAFV600E fehérje vizualizálására alkalmazott VE-1 klón használata már a rutin diagnosztikában kopogtat (32). A melanoma malignumban található a legtöbb szomatikus mutáció az összes tumortípus közül és ezek kialakulásáért 90%-ban a MAPK (mitogén aktivált protein kináz) jelút aberráns aktivációja felel (33). A jelút egyik génjében a BR (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) missense mutációja 80-90%-ban a 600. kodonnál, a valin-glutamát aminosav cseréje történik (V600E), amely patogenetikai faktorként, terápiás

targetként és patológiai szempontból talán a legfontosabb prediktív markerként is szolgál. A klinikumban jelenleg a metasztatikus melanomás betegek target terápiájának megválasztása előtt PCR alapú BRAF mutáció meghatározást végzünk. A vizsgálatkor a DNS izolálás a paraffinba ágyazott tumor mintából történik. Jelenleg a „gold standard” technika a BRAF mutáció azonosítására a DNS alapú analízis, de feltörekvőben vannak más megközelítések is, mint a mutált Braf-kináz fehérje immunhisztokémiai validációja, amelynél a mutált fehérje expressziója rutin fénymikroszkóp használatával kerül meghatározásra. A vizsgálat során a mutált fehérje kimutatása az antigén-antitest kapcsolódáson alapszik egy jelölő anyag segítségével. A festődésnél pozitív és negatív kontrollok is használhatók (34). A BRAF V600E mutált fehérje esetében egy mutáció-specifikus, monoklonális antitestet (VE1 klón) alkalmazunk, amely a BRAFV600E epitópot detektálja ignorálva a vad típusú Braf fehérjét (35). A BRAF mutáció immunhisztokémiai vizsgálata formalin-fixált és paraffinba ágyazott mintákból történik. Ez a vizsgálati módszer már a vastagbélrák és pajzsmirigyrák esetében is alkalmazható (36). Az eljárás a PCR technikához képest költséghatékonyabb, könnyebben elérhető és alkalmas kisebb szövettani minta vagy alacsony tumortartalom vizsgálatára is (37). Számos tanulmány alátámasztotta, hogy a BRAF pozitívitas jobban detektálható, mint a DNS alapú technika, mert sok esetben a fehérje jobban konzerválódik, mint a DNS és ezért több információ nyerhető (38).

A szegedi Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika évek óta vizsgálja a két technika eredményeit és viszonyát. Ezek alapján a diffúz, erős immunhisztokémiai festődést adó esetek megfelelően prediktálják a BRAF-gátló terápiát, azonban fokálisan pozitív és kétes esetekben a genetikai mutáció kimutatása elengedhetetlen. Bár hazánkban a BRAFV600E immunhisztokémiai kimutatása még nem terjedt el, a BRAF-gátló terápia a mutált fehérjét célozza, így a mutált fehérje kimutatása sokkal betegágy-közeli módszernek tekinthető, mindazonáltal további gyakorlat szükséges széleskörű használatához.

DNS-, és RNS alapú vizsgálómódszerek

A klasszikus hisztopatológiai eljárások mellett a daganatok klasszifikációja során egyre nagyobb hangsúly kerül a tumorszövetek molekuláris elváltozásait azonosító eljárásokra. Egyrészt ezek a vizsgálatok ugyan költséges eljárások, ám az elmúlt pár évben bevezetett legújabb NGS (next-generation sequencing – újgenerációs szekvenálás alapú) technológiáknak köszönhetően áruk drasztikusan csökkent. Másrészt ezek a vizsgálatok képezik az alapját az egy-egy specifikus, a tumorokban gyakran érintett szignalizációs útvonalat célzó, személyre szabott terápiás javaslatoknak. Az újgenerációs szekvenálás során nyert adatok forradalmasították a melanomáról alkotott alapvető felfogásunkat, mivel a vizsgálatok során azonosításra kerültek a tumorigenezist elősegítő molekuláris szintű genetikai és genomikai elváltozások. A szekvenálásból származó eddigi eredmények alapján ismertté váltak azok a fő onkogének és tumor szupresszorok, amelyek „driverként” hatnak a melanoma mikroevolúciós fejlődésében, valamint az újabb, multi-omikai kutatások új megvilágításba helyezték a metasztázisok molekuláris evolúciós lépéseit is (9).

A melanoma vizsgálata során a tumorszövetből genomikai és transzkriptomikai vizsgálatok történnek. Habár jelenleg a genomikai vizsgálatok számítanak terápiás szempontból fontos diagnosztikai eljárásoknak, a kialakuló génextpressziós változásokat azonosító transzkriptomikai elemzések segítenek megérteni a tumorsejtek feltelezhető, kezelésre adott potenciális válaszreakcióit is, amelyek az áttét és a rezisztencia kialakulásának is fontos mozgatórugói. Mindemellett arra is választ adhatnak, hogy a tumor mikrokönyezete miként befolyásolhatja az esetleges metasztázis progressziót.

A jelenleg alkalmazott újgenerációs szekvenálási eljárások képviselik a csúcstechnológiát, illetve ezek képezik az alapját a világon jelenleg bevezetésre kerülő molekuláris tumordiagnosztikai platformoknak is. Mindazonáltal számos esetben nem nyújtanak kielégítő választ. A tumor szövetekre általánosan jellemző, hogy bennük, a sejten belül olyan makromolekuláris változások mennek végbe, amelyeket bár a DNS-ben bekövetkező változások eredményeznek, de nem azokban a már jellemzett „driver” génekben következnek be, amelyekre a DNS detekciós eljárások fókuszálnak. Viszont ezek a mutációk olyan transzkripciós és epigenetikai változásokat eredményeznek, amelyek a sejtekben található transzkripciós mintázat változásának nyomon követhetők kimutathatók. Ennek köszönhetően a jelenlegi fejlesztések új célpontjai a transzkriptóm alapú diagnosztikai eljárások, melyek a DNS diagnosztika mellett egyre hangsúlyosabbá fognak válni. A vizsgálatok kiterjesztésének létjogosultságát adja, hogy az RNS alapú eljárások közvetlenül alkalmasak a tumorokban bekövetkező genetikai változások által kifejtett másodlagos hatások kimutatására, illetve a terápia során a daganat válaszreakcióinak közvetlen követését is lehetővé teszik.

Szintén diagnosztikai célokra felhasználható, viszont még fejlesztési fázisban levő eljárások közé sorolhatók

a minimál invazív, folyadék biopsziás minták vizsgálatai (39). Ezek olyan NGS-alapú diagnosztikai eljárások, melyeket a daganatok vér- és szövetszövetmintákból történő kimutatására, valamint a tumorsejtek molekuláris információinak azonosítására használunk fel. Mivel a szabadon keringő tumor DNS mellett a vérszérumban megtalálható a tumorsejtek által kibocsátott RNS molekulák is, ezek vizsgálata szintén alkalmazható a szérumbiopszián alapuló molekuláris diagnosztikai eljárásokban. A molekuláris szérumbiopsziát alkalmazható a tumorszöveten végzett DNS vizsgálatból származó eredmények pontosítására, valamint ezek az eljárások önálló diagnosztikus értékkel is rendelkezhetnek. Egy olyan páciens esetében, ahol a tumormintából történő biopsziás mintavétel nehézkes vagy nem kivitelezhető, a folyadék biopsziás eljárások diagnosztikus értékkel rendelkező vizsgálatként értékelhetőek. Fontos megjegyezni, hogy ilyen vizsgálatok esetében a bioinformatikai elemzés kiemelt fontosságú, mivel a vizsgált DNS és ebből a mutációt hordozó DNS mennyisége 1% alatti, amely sok esetben a detekciós küszöb alatti értéket jelenti. A folyadék biopsziás vizsgálatok közé tartoznak még a szérumbiopsziából, a tumorsejtek által kibocsátott exoszómák (30-150nm átmérőjű vezikulumok) mikroRNS tartalmának elemzését célzó eljárások.

Proteomikai vizsgálómódszerek

A proteomika a sejtekben zajló folyamatok építőköveivel, a fehérjék analízisével foglalkozik. A nagyfelbontású ún. mélyszekvenáló proteomikai vizsgálat tömegspektrométer segítségével történik. Először gyorsfagyasztott szöveteken alkalmazták és fejlesztették, ezért a proteomikai fejlődés előfeltétele a megfelelő -20-80°C-os biobanki kapacitás volt. Manapság már a rutin patológiai archivált tárolókban paraffinba ágyazott szövetek is alkalmasak proteomikai szekvenálásra (40). A deparaffinizált mintából kivont fehérjék szerkezetét stabilizáló diszulfid hidak felbontása után tripszin emésztés, és magas felbontású tömegspektrométerrel kompatibilis peptidok szekvenálása történik (41). A tömegspektrométerbe került peptidok ionizáción mennek keresztül, majd elektromágneses térben szétválnak a tömegük alapján, ugyanis a töltésük megegyezik. A bonyolult, több napos processzáls során több ezer, akár mintánként tízezer fehérje kinyerésével, dúsítási-, és statisztikai analízissel csökkent vagy fokozott aktivitású jelutak azonosíthatók, továbbá a poszttranszlációs (foszforilációs, acetilációs) módosítások is kimutathatók, amelyek a jelutak funkciójáról is pontosabb információkat szolgáltatnak. A proteomikai szekvenáló eljárások alapvetően abban különböznek a DNS/RNS-alapú vizsgálómódszerektől, hogy előbbi esetében a PCR-hez hasonló fehérjedúsításra nincs lehetőség, így a megfelelő referenciaproteinek megléte alapvető jelentőségű a relatív proteín expresszió meghatározásához.

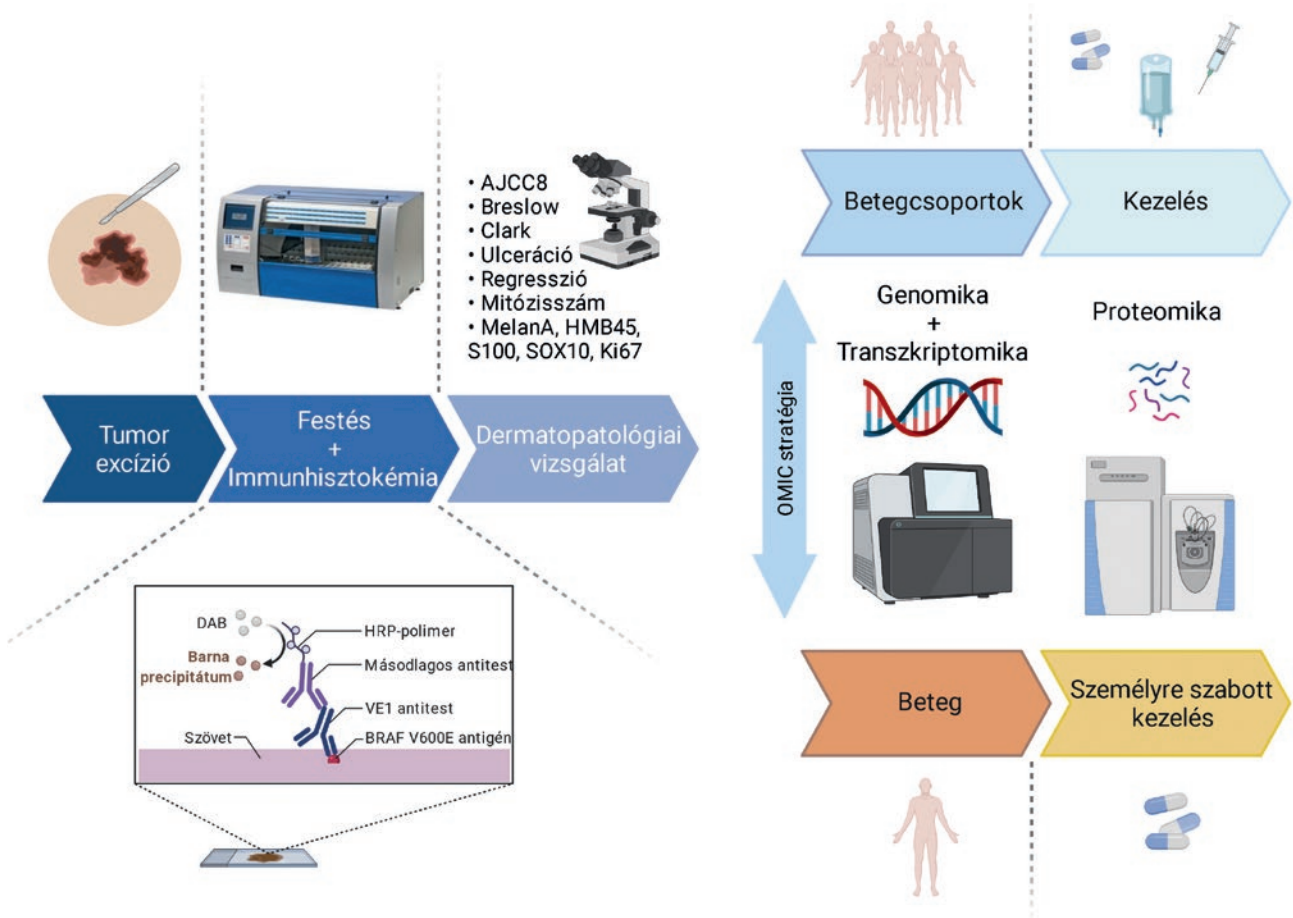
A mély proteín szekvenálással számos lehetséges diagnosztikus-, prognosztikus-, és prediktív biomarker nyerhető, amelyek szöveti vissza-validálására a patológiai labo-

ratóriumban van lehetőség. Klinikánk nemzetközi kooperációban végzett kutatásából kiderült, hogy az in-tartumorális heterogenitást is mutató melanómákban a magasabb BRAFV600E protein expressziójú esetek ag-gresszívabb biológiai viselkedést mutattak (2, 42). A kuta-tás keretében a mintegy 500 melanoma proteomikai ana-lízise a nagyfokú inter- és intratumorális heterogenitás szerepére hívta fel a figyelmet a diagnosztikus és terápiás kihívások háttérében. Paraffinos archivált mintáinkban vizsgálva bizonyos fehérjék (TRAF6, CDK2, CAMK4) koncentrációja összefüggést mutatott a betegség-mentes túléléssel, valamint a target-, és az immunterápiára adott válaszkészség szempontjából is több, tovább vizsgálán-dó jelátviteli utat azonosítottunk (40). Az immunterá-piára progrediáló betegek paraffinos tumor mintáiban a VEGF-A jelút, a NOS3 fehérje és az RNS splicing jelút felül expresszáldott, míg a jó terápiás választ adók köré-ben a strómális szignál és a sejt immunválasz fehérjéi-nek koncentrációja bizonyult emelkedettebbnek a tumor-ban. Target terápia esetében a MAPK jelút és az mTOR kaszkád kifejeződésénél láttunk rezisztenciát, míg regre-diáló tumoroknál szintén a strómális szignál fehérjéi vol-tak kifejezettebbek (40).

OMIC intergált platform hatása a dermatopatológiára és a személyre szabott kezelésre

Az OMIC stratégiát számos klinikai kihívás hívta élet-re. Mai tudásunk alapján a melanoma diagnózisának pil-lanatában lényegében megíjósolhatatlan a tumormentes látencia, az áttétek manifesztációja vagy progressziója. A melanoma klinikai gyakorlatában szereplő prognosztikai markerek, mint például a primer tumor vastagsága, ulcerációja, AJCC8 szerinti stádiuma csupán betegcsoport-ok elkülönítését teszi lehetővé, egyénre szabott informá-ciót nem szolgáltat (43). A BRAFV600E mutáció megléte alapján BRAFV600E-gátló adható a betegnek, azonban gyakori a rezisztencia, így a relapszus kialakulása (44). Az immunterápia (anti-CTLA4, anti-PD-1) kapcsán egyelő-re nincs a rutin diagnosztikában használt biomarker, és a már disszeminálódott melanomás betegek közel fele erre a szisztémás kezelésre sem reagál (44).

A fenti vizsgálómódszerek kombinálásával (rutin pato-lógiai diagnosztika, DNS-, és RNS alapú vizsgálatok, protein szekvenálás – 2. ábra) olyan komplex informá-ciók, új prognosztikus és prediktív szöveti markerek kere-



2. ábra

reprezentálja a jelen (ábra bal oldala), és a jövőbeli (ábra jobb oldala), molekuláris biológiai rétegekkel kiegészült szöveti alapú diagnosztikát, a személyre szabott kezelés céljából

sése, azonosítása válik lehetővé, amely terápiás célpontként is használható, továbbá egyénre szabott információt kaphatunk a terápiás stratégia egyéni meghatározásához. A napjainkban használatos NGS alapú diagnosztika során a melanoma kialakulásában kulcsfontosságú onkogénekben és tumorszuppresszorokban bekövetkező változások határozhatók meg, a proteomikai „rétegben” pedig ennek fehérje ujjlenyomata és annak posztranszlációs módosításai teszik komplexé a funkciót. A hatékony terápiás protokoll kialakításának első lépése annak meghatározása, hogy melyek azok a célpontok, amelyek célzott kezelése a melanomás beteg esetében a legtöbb haszonnal jár. Jövőbeni kutatásainkkal célunk integrálni a NGS- és fehérje expressziós mintázat vizsgálatát már a primer melanoma szövettani diagnózisának felállításakor, ezzel egy fontos lépést téve a transzlációs medicina és az egyénre szabott gyógyítás irányába.

IRODALOM

1. Foth M, Jasper Wouters J, Chaumont C és mtsai.: Prognostic and predictive biomarkers in melanoma: an update Expert Rev Mol Diagn. (2016) 16(2), 223–37.
2. Betancourt LH, Gil J, Sanchez A és mtsai.: The Human Melanoma Proteome Atlas—Complementing the melanoma transcriptome. Clin Transl Med. (2021) 11(7), e451.
3. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR és mtsai.: Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. (2017) 67(6), 472–492.
4. Scolyer RA, Rawson RV, Gershenwald JE és mtsai.: Melanoma pathology reporting and staging. Mod Pathol. (2020) 33, 15–24.
5. Kocsis A, Karsko L, Kurgyis Zs és mtsai.: Is it Necessary to Perform Sentinel Lymph Node Biopsy in Thin Melanoma? A Retrospective Single Center Analysis. Pathol Oncol Res. (2020) 26, 1861–1868.
6. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC.: The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. Pigment Cell Melanoma Res. (2011) 24(5), 879–897.
7. Bastian BC.: The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. Ann Rev Pathol. (2014) 9, 239–71.
8. Shain HA, Joseph NM, Yu R és mtsai.: Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Incremental Disruption of Key Signaling Pathways during Melanoma Evolution. Cancer Cell. (2018) 34(1), 45–55.e4.
9. Cancer Genome Atlas N.: Genomic classification of cutaneous melanoma. Cell. (2015) 161(7), 1681–96.
10. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N és mtsai.: Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. Nature. (2017) 545(7653), 175–180.
11. Torres-Cabala C, Li-Ning-Tapia E, Hwu WJ.: Pathology-based Biomarkers Useful for Clinical Decisions in Melanoma. Arch Med Res. (2020) 51, 827–838.
12. Ostrowski SM, Fisher DE.: Biology of Melanoma. Hematol Oncol Clin N Am. (2021) 35, 29–56.
13. Teixido C, Castillo P, Martinez-Vila C és mtsai.: Molecular Markers and Targets in Melanoma. Cells. (2021) 10, 2320.
14. Pandiani C., Béranger GE, Leclerc J és mtsai.: Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities. Genes Dev. (2017) 31, 724–743.
15. Davies H, Bignell GR, Cox C és mtsai.: Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. (2002) 417, 949–954.
16. Elder DE, Bastian BC, Cree IA és mtsai.: The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. Arch Pathol Lab Med. (2020) 144, 500–522.
17. Turner N, Ware O, Bosenberg M.: Genetics of metastasis: Melanoma and other cancers. Clin Exp Metastasis. (2018) 35, 379–391.
18. Bell RJA, Rube HT, Kreig A és mtsai.: The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. Science. (2015) 348, 1036–1039.
19. Shain AH, Bagger MM, Yu R és mtsai.: The genetic evolution of metastatic uveal melanoma. Nat Genet. (2019) 51, 1123–1130.
20. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G és mtsai.: Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. Nature. (2009) 457, 599–602.
21. Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L és mtsai.: Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. Pathology. (2016) 48(2), 113–31.
22. Zembowicz A.: Blue Nevi and Related Tumors. Clin Lab Med. (2017) 37(3), 401–415.
23. Lezcano C, Jungbluth AA, Nehal KS és mtsai.: PRAME expression in melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. (2018) 42, 1456–1465.
24. Lezcano C, Jungbluth AA, Busam KJ.: Comparison of immunohistochemistry for PRAME with cytogenetic test results in the evaluation of challenging melanocytic tumors. Am J Surg Pathol. (2020) 44, 893–900.
25. Xu Y, Zou R, Wang J és mtsai.: The role of the cancer testis antigen PRAME in tumorigenesis and immunotherapy in human cancer. Cell Prolif. (2020) 53, e12770.
26. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR és mtsai.: Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. Cell. (2002) 109(6), 707–18.
27. Yeh I, Lang UE, Durieux E és mtsai.: Combined activation of MAP kinase pathway and β -catenin signaling cause deep penetrating nevi. (2017) Nat Commun. 8, 644.
28. Busam KJ, Hedvat C, Pulitzer M és mtsai.: Immunohistochemical analysis of BRAF(V600E) expression of primary and metastatic melanoma and comparison with mutation status and melanocyte differentiation antigens of metastatic lesions. Am J Surg Pathol. (2013) 37, 413–420.
29. Ilie M, Long-Mira E, Funck-Brentano E és mtsai.: Immunohistochemistry as a potential tool for routine detection of the NRAS Q61R mutation in patients with metastatic melanoma. J Am Acad Dermatol. (2015) 72, 786–793.
30. Torres-Cabala CA, Wang WL, Trent J és mtsai.: Correlation between KIT expression and KIT mutation in melanoma: a study of 173 cases with emphasis on the acral-lentiginous/mucosal type. Mod Pathol. (2009) 22, 1446–1456.
31. Koelzer VH, Gisler A, Hanhart JC és mtsai.: Digital image analysis improves precision of PD-L1 scoring in cutaneous melanoma. Histopathology. (2018) 73, 397–406.
32. Pearlstein MV, Zedek DC, Ollila DW és mtsai.: Validation of the VE1 Immunostain for the BRAF V600E Mutation in Melanoma. J Cutan Pathol. (2014) 41(9), 724–732.
33. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R és mtsai.: Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). Int J Oncol. (2018) 1071–1080.
34. Dávid Csaba.: Általános festési és immunhisztokémiai módszerek. Makromolekulák azonosítása szövettani metszeteken c. előadás. Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet (2020.09.01.)
35. Capper D, Preusser M, Habel A és mtsai.: Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. Acta Neuropathol. (2011) 122, 11–9.

36. *Gremel G, Grannas K, Sutton LA és mtsai.*: In situ Protein detection for Companion Diagnostics. *Front Oncol.* (2013) 3, 271.
37. *Capper D, Preusser M, Schittenhelm J és mtsai.*: Characterization of immunohistochemical staining patterns of an antibody specific for BRAF V600E protein in primary and metastatic brain tumors. *Clin Neuropathology* (2011) 105, 219-224.
38. *Kuan SF, Navina S, Cressman KL és mtsai.*: Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. *Hum Pathol.* (2014) 45, 464-472.
39. *Boyer M, Cayrefourcq L, Dereure O és mtsai.*: Clinical Relevance of Liquid Biopsy in Melanoma and Merkel Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* (2020) 12(4), 960.
40. *Szadai L, Velasquez E, Szeitz B és mtsai.*: Deep Proteomic Analysis on Biobanked Paraffine-Archived Melanoma with Prognostic/Predictive Biomarker Read-Out. *Cancers (Basel).* (2021) 13(23), 6105.
41. *Cramer R.*: MALDI MS. *Methods Mol Biol.* (2009) 564, 85–103.
42. *Betancourt LH, Gil J, Kim Y és mtsai.*: The human melanoma proteome atlas—Defining the molecular pathology. *Clin Transl Med.* (2021) 11(7), e473.
43. *Keung EZ, Gershenwald JE.*: The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. Vol. 18, *Expert Review of Anticancer Therapy.* Taylor and Francis Ltd. (2018) 775–84.
44. *Swetter SM, Thompson JA, Albertini MR és mtsai.*: Melanoma: Cutaneous, Version 2.2021 Featured Updates to the NCCN Guidelines. Vol. 19, *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* Harborside Press. (2021) 364–76.

Érkezett: 2022.05.04.

Közlésre elfogadva: 2022.05.09.