

A malignus melanoma molekuláris diagnosztikája: molekuláris stádiummeghatározás, minimális reziduális betegség

Tímár József, Csuka Orsolya

Országos Onkológiai Intézet, Budapest

A nukleinsav-alapú molekuláris technikák a melanoma diagnosztikájában is alkalmazásra kerültek két területen, a stádiummeghatározás finomításában (molekuláris staging) és a minimális reziduális betegség kimutatásában. Több melanocita-specifikus gén expresszióját használják erre a célra, mint a tirozináz, a gp100, a Melan-A/MART-1 illetve a MIA (melanoma inhibitory activity). A nyirokszövettel szemben sem a perifériás vérben sem a csontvelőben nem kell számolni melanociták jelenlétével, így az ebből eredő „fals” pozitivitással sem. A tumorsejtek heterogenitása jelentősen befolyásolhatja a keringő daganatsejtek kimutatását, ami a tirozinázexpresszió alapján a leghatékonyabb. Több vizsgálat szerint a perifériás vérben kimutatható melanomasejtek mennyisége a daganat tömegével és progressziójával függ össze és jelzi a terápia hatékonyságát is. Ugyanakkor a módszer révén igen gyakran lehet ún. molekuláris recidívát találni klinikai recidíva nélkül is, ami arra utal, hogy a kisszámú melanomasejt periférián való jelenlétének kérdéses a jelentősége. Mindezek alapján a molekuláris diagnosztika még nem része a melanoma protokolloknak és további klinikai vizsgálatok szükségesek diagnosztikus szerepének pontos meghatározására. *Magyar Onkológia 47:63–66, 2003*

Nucleic acid based molecular techniques have been introduced into the diagnosis of malignant melanoma similarly to other cancers. They were applied for refinement of staging and to detect minimal residual disease. There are several good melanocyte-specific genetic markers such as tyrosinase, gp100, Melan-A/MART-1 and MIA. Unlike in the case of the lymph nodes, peripheral blood or bone marrow do not contain melanocytes excluding the possibility of fals positive reactions. Considering the pronounced heterogeneity of melanoma cells the most reliable molecular marker is the expression of tyrosinase. Several studies indicate that the quantity of circulating melanoma cells correlates with tumor burden and disease progression and reflects the effect of therapy. On the other hand, molecular techniques detect circulating melanoma cells much more frequently than the clinical manifestation of the disease progression (molecular recurrence), questioning the clinical significance of the detection of a small number of melanoma cells in the circulation. Based on these data molecular diagnostics is not part of the melanoma protocols yet and further studies are necessary to define its diagnostic role. *Tímár J, Csuka O. Molecular diagnostics of malignant melanoma: molecular staging, minimal residual disease. Hungarian Oncology 47:63–66, 2003*

Bevezetés

A metasztázis-képződés patomechanizmusa egyes lépéseinek megismerése és ezek klinikai, ill. diagnosztikai jelentőségének felismerése arra ösztökélte a kutatókat és a klinikusokat, hogy egyre érke-

nyebb módszereket dolgozzanak ki, amelyekkel a daganatsejtek jelenléte a szervezet különböző szöveteiben egyre nagyobb érzékenységgel válik kimutathatóvá. Ezen módszerek, melyek a hagyományos morfológiai vizsgálatoknál érzékenyebbek, az immuncito-, ill. hisztokémia, és a molekuláris, nukleinsav-alapú technikák (28). Ezek célja, hogy a nyirokutakon, ill. a vérpályán keresztül terjedő daganatsejteket azonosíthassuk, esetlegesen azok mennyiségét is meghatározassuk. Ezek a technikák arra is alkalmasak, hogy az áttét helyén lévő, más módszerrel ki nem mutatható daganatsejteket

Közlésre érkezett: 2003. január 10.
Elfogadva: 2003. március 1.

Levelezési cím: Dr. Tímár József, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9.
Telefon: 224-8786, Fax: 224-8706, E-mail: jtimar@oncol.hu

is azonosíthatjuk. A melanoma esetében a szentinel nyirokcsomó feldolgozásában számításba jövő módszereket Cserni (7) mutatta be ebben számban. Így ebben a tanulmányban a hematogén disszemináció igazolására alkalmas módszereket fogjuk összefoglalni.

Mikrometasztázis és annak molekuláris szintű detektálása

A mikrometasztázis fogalom jelentős változásokon ment keresztül az elmúlt évtizedekben (22, 24, 28). Mikrometasztázisnak eredetileg azt az áttéti szövetet neveztük, amelyet fénymikroszkóposan lehet csak kimutatni az adott szövetben. Az immunhisztokémia bevezetésével ez az érzékenység megnövekedett, hiszen lehet most már immunhisztokémiai mikrometasztázisokról beszélni, amelyeket csak immunhisztokémiai módszerekkel lehet kimutatni, klasszikus vagy fénymikroszkópos technikával nem. Ezek a módszerek alkalmasak arra, hogy a perifériás vérben és a csontvelőben egyes daganatsejteket azonosítsunk. A molekuláris diagnosztika bevezetésével a mikrometasztázis fogalma tovább változott, finomodott, hiszen előfordulhat az a szituáció, amikor a daganatsejteket csak a molekuláris diagnosztikus eszköz tudja kimutatni, és fénymikroszkópos vagy immunhisztokémiai módszer nem képes erre (21). A molekuláris diagnosztikai eszköztár kibővülésével azonban számos probléma is jelentkezett, hiszen ekkor már morfológiailag nem tudjuk azonosítani feltétlenül az adott reakcióhoz tartozó sejteket, ilyen esetben előfordulhat, hogy pl. a vérpályába bejutó nekrotikus sejtek adják a reakciót, tehát nem élő daganatsejtekről van szó, és így klinikailag félrevezető információkat hordozhat (11, 12, 28, 29). Ezt a problémát kiküszöbölheti az, amikor perifériás vér mellett, ill. azzal párhuzamosan a csontvelő vizsgálata is megtörténik, hiszen ott már nekrotikus levált tumorsejtekkel nem kell számolnunk, a nyirokcsomóban vagy a csontvelőben tumormarker meghatározáskor megjelenő pozitív reakció viabilis daganatsejt jelenlétére utal. Természetesen nem mindegy, hogy mikor történik a vizsgálat. A legtöbb szerző megegyezik abban, hogy a csontvelő, ill. a perifériás vér vizsgálatát sebészi beavatkozás előtt célszerű elvégezni, hiszen maga a sebészi beavatkozás átmeneti daganatsejt-felszabadulást eredményezhet a keringésbe (30).

A PCR-alapú mikrometasztázis-meghatározás metodikai háttere

Megfelelő PCR technika alkalmazásával a stádiumbeosztás finomodhat, másrészt pedig ki lehet szelektálni olyan betegcsoportokat, amelyek esetében terápiás aktivitás korábban szükséges, mint ezzel a technikával negatívnak bizonyuló betegek esetében. A technika, ha a minimális reziduális betegség kimutatására használjuk, akkor a terápiás kezelés hatékonyságának megítélésére is alkalmas lehet. Manapság az RT-PCR technikát használják legtöbbször molekuláris diagnosztikában, amely a tumorsejt-specifikus RNS kimutatására

alkalmas. A technika azt feltételezi, hogy a daganatsejt (melanoma) továbbra is kifejez olyan jellegzetes markereket, amelyek elkülönítik a környezet normális sejtjeitől. Sajnos az élet ennél sokkal komplikáltabb szituációkat produkál. Egyrészt normális szövetekben is előfordulhat igen alacsony kópiaszámban egy-egy génnek az expressziója, melyet semmilyen más módszerrel, csak a nagyon érzékeny molekuláris módszerrel lehet kimutatni (16). Másrészt daganatsejtek nem feltétlenül expresszálják az ún. tumormarkereket: melanomák esetében a melanomaantigénekre ill. -markerekre gondolunk (8). Harmadrészt a tumorsejt-populáció metasztázisaiban is heterogén génextpressziót mutathat, nem feltétlenül marad meg egy-egy antigénnek az expressziója, ill. amely korábban nem volt jelen a primer daganatban, az megjelenhet a metasztázisban (9, 19). Fals pozitívítás leggyakoribb oka tehát az ún. illegitim transzkripció (16), bármely génnek minimális expressziós szintje a normális szövetben, pl. egy tumormarker expressziója is. Ezért nagy jelentősége lehet annak, hogy meghatározzuk, hogy az adott marker expressziója milyen mértékű. Erre a célra az RT-PCR technika nem alkalmas, csak az ún. kvantitatív PCR technika (25). Ez az eljárás azonban ma még nem része a rutin molekuláris diagnosztikának, és az infrastruktúra sem áll a legtöbb helyen rendelkezésre. Viszont az, hogy az RNS-alapú molekuláris diagnosztika egy daganatsejtet képes kimutatni 10^6 – 10^7 , ill. a DNS-alapú diagnosztika 10^7 – 10^8 normális sejt között, arra kell hogy ösztökélje a diagnosztikus szakembereket, hogy az ilyen eljárásokat bevezessék, ill. teszteljék, pl. a melanoma molekuláris stádiumbeosztásának finomítására. Egy másik probléma lehet, amelyet a szentinel nyirokcsomók esetében látunk, hogy a szövetben nem illegitim módon, hanem szabályosan olyan sejtek vannak jelen kis mennyiségben, amelyek nagyon a melanomasejtekhez hasonlóak markerüket tekintve, mint a melanociták jelenléte regionális nyirokcsomókban (4, 7, 9, 19). A vérpályában ilyen sejtek jelenlétére nem kell számítanunk, tehát a keringő melanomasejtek kimutatása esetén ilyen típusú fals pozitív reakció nem jön számításba, és miután a csontvelőben sem tudunk arról, hogy melanociták előfordulnának, a fals pozitívítás lehetősége minimális. Ugyanakkor egy másik zavaró tényező léphet fel, ez pedig az, hogy a csontvelő vagy perifériás vér mintájának nyerése során a bőrön áthatoló szúrásból kerül a minta a vizsgáló edénybe, és a bőrben melanociták normálisan jelen vannak, tehát ezen mintáknak a bőrrel való kontaminációja fals pozitívítás veszélyével jár (9, 19). Ennek kiküszöbölésére különböző technikákat javasolnak, amelyek a direkt vérnyerést, ill. direkt csontvelőnyerést célozzák, bőrrel való kontamináció kizárásával. Egy újabb hibaforrás az, hogy átíródó pszeudogének is vezethetnek molekuláris diagnosztikai fals pozitív eredményekhez. Ezen gének nem rendelkeznek intronszekvenciákkal, így az RT-PCR amplifikáció során a PCR-termék megkülönböztethetetlen az mRNS-ről kapott jeltől (28).

A malignus melanoma mikrometasztázisainak molekuláris diagnosztikája

A melanomasejtek molekuláris diagnosztikájához nem tudunk jelenleg még felhasználni olyan jellegzetes genetikai markert, amely minden egyéb sejttől elkülöníti daganatsejtünket, hiszen a melanomákban megváltozó gének olyanok, amelyek más daganatfélésekben is megváltozhatnak, sőt előfordulhatnak már a naevussejtekben. Ezért ún. sejtvonal-specifikus markerekre kell hagyatkoznunk, a melanociták differenciációs markereire (22). Ezek közül a legmegbízhatóbban expresszáldó marker a tirozináz enzim (1. ábra) (2), amely a legtöbb ún. amelanotikus melanomában is bizonyos szinten megtartja expresszióját (5, 10, 13, 15, 17, 26, 29). A rutin diagnosztikában használt egyéb markerek a Melan-A/MART-1 vagy a gp100 (9, 19), két nagyon hasznos specifikus marker, de expressziójuk a melanoma progressziója során elveszhet, ezért igen gyakran a keringő daganatsejtek negatívnak bizonyulhatnak (8). A keringő melanomasejtek vagy melanoma mikrometasztázisok kimutatására az RT-PCR módszert használták eddig, de az irodalomban már megjelentek azok a közlemények, amelyek megkísérelték kvantitatív meghatározásokkal nyomon követni a melanoma progresszióját, terápiájának hatékonyságát, ill. a minimális reziduális betegséget. Nagyon fontos, hogy a tirozináz enzim RT-PCR módszerrel egészséges egyének perifériás véréből vagy csontveléből nem mutatható ki. Irodalmi adatok igazolják, hogy amennyiben a melanomasejtek megőrzik tirozináz-aktivitásukat, ill. -expressziójukat, perifériás vérben a tirozináz mRNS kimutatása párhuzamba állítható a tumortömeggel, ill. a daganat progressziójával és a terápia hatékonyságával is (4, 6, 10, 13-15, 17, 20, 25-27). A tirozináz, ill. más melanomamarkerek mellett, mint a gp100 és a Melan-A/MART-1 markerek, egyre többet alkalmaznak a melanoma inhibitory activity (MIA) fehérje mRNS-ének kimutatását keringő melanomasejtek azonosítására. Ennek az antigénnek a specificitása nem túl nagy, mert keratinociták, fibroblasztok és limfociták is igen alacsony szinten kifejezhetik a gént. A korábban már említett markerek mellett a tumorasszociált antigének közül a MAGE-3 és -1 is kimutató és használható a keringő daganatsejtek kimutatására (a MAGE-3 a melanomák 80%-ában kifejeződik) (9, 19). A legszélesebb körben elterjedt tirozináz assay Smith és mtsai (25) primer szekvenciáját, ill. módszerét alkalmazza, amely ún. nested PCR reakció, amely gyakorlatilag kizárja a genomikus DNS amplifikálásának lehetőségét, azaz az ilyen okból bekövetkező fals pozitívítást. Nagyon fontos, hogy a vizsgálat során megfelelő kontroll normális gén is meghatározásra kerüljön, valamint hogy az adott marker gént meghatározott ismert szinten expresszáldó daganatsejt, ez esetben melanomasejt-populáció legyen a kontroll, amely mintegy minőségi és kvantitatív kontrollt is jelenthet a vizsgálatok során (9, 19). Az egyes vizsgálatok, ill. laboratóriumok közötti különbségek a keringő melanomasejtek detektálásában igen riasztóak; IV-es stádiumú melanomás betegek vizsgálá-

táról a legkülönbözőbb adatok kerültek nyilvánosságra, ill. publikálásra, amelyek keringő sejtek teljes hiányától az esetek 100%-ának pozitívitásáig terjedtek, amelyek háttérben minden bizonyos metodikai eltérések állnak, azaz az RNS-izolálás és a cDNS-szintézis módszereiben rejlő eltérések (29). A közlemények finom analízise azt mutatta, hogy a Ficoll-Hypoque denzitásgrádiens-szeparálási módszer, melynek révén a perifériás vérben lévő sejtes elemeket szokták rutinszerűen izolálni, igen nagymértékben csökkenti a pozitív esetek számát, ezért mind Európában, mind az Egyesült Államokban minőségbiztosítási eljárásokra és metodikai egységesítésre fogadtak el ajánlásokat (24).

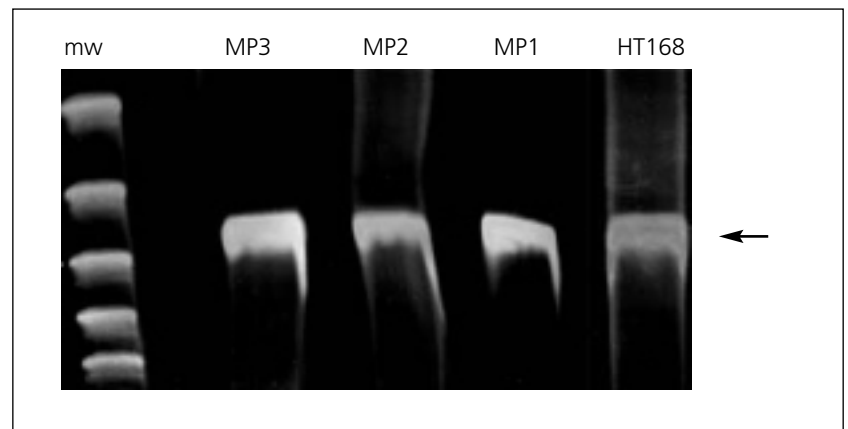
Mindenesetre a korrekt körülmények között lefolytatott vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a molekuláris diagnosztikus keringő daganatsejt-meghatározásnak klinikai jelentősége lehet. Nyirokcsomó-metasztázissal rendelkező betegek sebészi kezelése után perifériás vérben keringő melanomasejt-pozitivitás 4 és 6 hónapos utánkövetéses vizsgálatban rossz prognózis markere volt (30). Egy másik vizsgálatban II-es és III-as stádiumú melanomás betegek vérében keringő melanomasejtek tirozinázexpresszió alapján történő kimutatásával igazolni lehetett a pozitív esetek lerövidült betegségmentes túlélési időtartamát. Érdekes megfigyelés volt egy prospektív tanulmány során, hogy az előrehaladott melanomák IFN-a, ill. IL-2 terápiája után a metasztázisok reszekciójával vagy anélkül a keringésben tirozináz mRNS-t lehetett kimutatni a betegek többségében, a kezelés után még 5 éven át is, anélkül, hogy klinikailag recidíva lett volna kimutatható (14, 25). A kvantitatív vizsgálatok azt igazolták, hogy a detekciós szint a tirozináz gén esetében kevesebb, mint 100 humán melanomasejtnek felelhet meg.

Konklúzió

A molekuláris technikák bevezetése a rutin diagnosztikába napjainkban zajló, egyre gyorsuló folyamat. Az egyes módszerek elterjedésének azonban az szab gátat leginkább, hogy a (prospektív) vizsgálatok elvégzésétől legalább 5, de sok esetben még több évnél kell eltelnie, hogy a betegség lefolyásának kiértékelésével a bevezetendő módszer klinikai hasznát is megítélhessük. Ez a megállapítás érvényes a melanoma molekuláris diagnosztikájára

1. ábra.
Keringő melanomasejtek kimutatása a tirozináz gén expressziója alapján RT-PCR módszerrel.
Tirozináz = 207 bp, melanomás betegek mintái = MP1-MP3, kontroll = HT168 humán melanoma sejtvonal, mw = molekulásúly-marker.

Keringő daganatsejtek 327 betegünk vizsgálata alapján az esetek 46,7%-ban voltak kimutathatók.



és annak esetleges felhasználására, a finomabb stádiummeghatározásra (ultrastaging) vagy a terápia hatékonyságának nyomon követésére (24, 28). Ugyanakkor intő jelként kell tekinteni, hogy a malignus melanoma az egyik (ha nem a leginvaszívbabb) rosszindulatú daganat, melynek progressziója sok évi komplett klinikai remisszió után is felléphet, s talán erre utalhat a gyakori „molekuláris recidíva” (keringő melanomasejtek a keringésben) klinikai recidíva nélkül.

Az új ún. globális génexpressziós vizsgáló módszerek bizonyára hatással lesznek a melanoma molekuláris diagnosztikájára is (1, 18). Az eddigi vizsgálatok megerősítették, hogy a manapság használatos melanomaspecifikus gének expressziója alapján ez a daganatféleség egyértelműen elkülöníthető más daganatoktól. A legerősebb melanoma-diszkriminátor képességű gének ezen vizsgálatok szerint is a tirozináz, az S-100B, a gp100, a Melan-A/MART-1, a tirozinkötő fehérje-1 és -2 (dopachrome tautomerase), amelyeket a molekuláris diagnosztika eddig is használt (23, 28). Nagy segítség volna, ha sikerülne melanoma-specifikus DNS-markert vagy -markereket is találni, amelyek révén a detektálás érzékenysége és megbízhatósága tovább lenne fokozható. Mindenesetre az várható, hogy jelenleg zajló prospektív vizsgálatok hamarosan pontosan ki fogják jelölni a molekuláris diagnosztika helyét a malignus melanoma esetében (is).

Ezt a munkát az Oktatási Minisztérium (NKFP 1/48/2001) támogatta.

Irodalom

- Bertucci F, Houlgatte R, Nguyen C, et al. Gene expression profiling of cancer by use of DNA arrays: how far from the clinic? *Lancet Oncol* 2:674-682, 2001
- Bieglik SC, Ghossein RA, Bhattacharya S, Coi DG. Detection of tyrosinase mRNA by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in melanoma sentinel nodes. *Ann Surg Oncol* 6:232-240, 1999
- Bishop JAN. Molecular pathology of melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 16:141-154, 1997
- Blaeta HJ, Paul T, Sotlar K, et al. Detection of melanoma cells in sentinel lymph nodes, bone marrow and peripheral blood by a reverse transcription-polymerase chain reaction assay in patients with primary cutaneous melanoma: association with Breslow's tumour thickness. *Br J Dermatol* 145:195-202, 2001
- Brossart P, Schmier J-W, Krüger S, et al. A polymerase chain reaction-based semiquantitative assessment of malignant melanoma cells in peripheral blood. *Cancer Res* 55:4065-4068, 1995
- Carrillo E, Prados J, Melguizo C, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction detection of circulating tumor cells in patients with melanoma: correlation with clinical stage, tumor thickness and histological type. *Pathol Int* 52:294-299, 2002
- Cserni G. Melanoma malignus betegségei sentinel nyirokcsomóinak patológiai vizsgálata. *Magyar Onkológia* 47:51-57, 2003
- Curry BJ, Myers K, Hershey P. MART-1 is expressed less frequently on circulating melanoma cells in patients who develop distant compared with locoregional metastases. *J Clin Oncol* 17:2562-2571, 1999
- Davids V, Kidson SH, Hanekom GS. Accurate molecular detection of melanoma nodal metastases: an assessment of multimarker assay specificity, sensitivity, and detection rate. *Mol Pathol* 56:43-51, 2003
- Farthman B, Eberle J, Krasagakis K, et al. RT PCR for tyrosinase mRNA positive cells in peripheral blood: evaluation strategy and correlation with known prognostic markers in 123 melanoma patients. *J Invest Dermatol* 110:263-267, 1998
- Fodstad O, Faye R, Hoiford HK, et al. Immunobead-based detection and characterization of circulating tumor cells in melanoma patients. *Recent Results Cancer Res* 158:40-50, 2001
- Georgieva J, Milling A, Orfanos CE, Geilen CC. Magnetic bead RT-PCR: establishment of a new method for detecting circulating melanoma cells. *Melanoma Res* 12:309-317, 2002
- Ghossein RA, Coit D, Brennan M, et al. Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4:419-428, 1998
- Gogas H, Kefala G, Bafaloukos D, et al. Prognostic significance of the sequential detection of circulating melanoma cells by RT-PCR in high-risk melanoma patients receiving adjuvant interferon. *Br J Cancer* 87:181-186, 2002
- Hoon DSB, Wang Y, Dale PS, et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay. *J Clin Oncol* 13:2109-2116, 1995
- Kaplan JC, Kahn A, Chelly J. Illegitimate transcription: its use in the study of inherited disease. *Hum Mutat* 1:357-360, 1992
- Kunter U, Buer J, Probst M. Peripheral blood tyrosinase messenger RNA detection and survival in malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 88:590-594, 1996
- Ladanyi M, Chan WC, Triche TJ, Gerald, WL. Expression profiling of human tumors: the end of surgical pathology? *J Mol Diagnostics* 3:92-97, 2001
- Max N, Keilholz U. Minimal residual disease in melanoma. *Semin Surg Oncol* 20:319-328, 2001
- Mellado B, Gutierrez L, Castel T, et al. Prognostic significance of the detection of circulating malignant cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in long-term clinically disease-free melanoma patients. *Clin Cancer Res* 5:1843-1848, 1999
- Neumaier M, Gerhard M, Wagener C. Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes. *Gene* 159:43-47, 1995
- Papa R. Bone marrow metastases. A review. *Cancer* 74:2403-2413, 1994
- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24:227-235, 2000
- Ruiter DJ, Spatz A, van den Oord JJ, Cook MG. Microstaging in cutaneous melanoma. *J Pathol* 195:525-529, 2001
- Schmidt H, Sorensen BS, von der Maase H, et al. Quantitative RT-PCR assessment of melanoma cells in peripheral blood during immunotherapy for metastatic melanoma. *Melanoma Res* 12:585-592, 2002
- Strohal R, Mosser R, Kittler H, et al. MART-1/Melan-A and tyrosinase transcripts in peripheral blood of melanoma patients: PCR analyses and follow-up testing in relation to clinical state and disease progression. *Melanoma Res* 11:543-548, 2001
- Takeuchi H, Kuo C, Morton DL, et al. Expression of differentiation melanoma-associated antigen genes is associated with favorable disease outcome in advanced-stage melanomas. *Cancer Res* 63:441-448, 2003
- Tímár J, Csuka O, Orosz Zs, et al. Molecular pathology of tumor metastasis. II. Molecular staging and differential diagnosis. *Pathol Oncol Res* 8:204-219, 2002
- Tsao H, Nadiminti U, Sober AJ, Bigby M. A meta-analysis of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA as a marker for circulating tumor cells in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol* 137:325-330, 2001
- Warr RP, Zebede Z, Kenealy J, et al. Detection of melanoma seeding during surgical procedures - an RT-PCR based model. *Eur J Surg Oncol* 28:832-837, 2002