

# Az I-es típusú interferon lehetséges szerepe a bőrmelanóma genomikai progressziójában

VÍZKELETI LAURA<sup>1,3</sup>, LADÁNYI ANDREA<sup>4</sup>, PAPP ORSOLYA<sup>1</sup>, DOMA VIKTÓRIA<sup>2</sup>, KÁRPÁTI SAROLTA<sup>2</sup>, RÁSÓ ERZSÉBET<sup>1</sup>, BARBAI TAMÁS<sup>1</sup>, TÍMÁR JÓZSEF<sup>1</sup>

Semmelweis Egyetem, <sup>1</sup>Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet, <sup>2</sup>Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika, <sup>3</sup>Bioinformatika Tanszék, <sup>4</sup>Országos Onkológiai Intézet, Sebészeti és Molekuláris Patológiai Osztály, Nemzeti Tumorsebészeti Laboratórium, Budapest

Kutatásainkat az alábbi pályázatok támogatták: NKFIH ANN128524 (LA), K135540 (TJ), NKP-16-1-2018-004 (TJ), TKP21-EGA25 (TJ).

## Levelezési cím:

Dr. Tímár József, Semmelweis Egyetem, Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93., e-mail: jtimar@gmail.com

## Közlésre érkezett:

2023. április 13.

## Elfogadva:

2023. augusztus 18.

A bőrmelanóma genetikai progressziója kevésbé ismert, mivel nem állnak rendelkezésre viszcerális áttéteken alapuló nagy genetikai elemzések adatai. Ennek a hiánynak a pótlására építettünk fel egy autopsziás metasztázis-biobankot, amelyen genomikai vizsgálatainkat folytattuk. Az áttéti daganatokban fokozódott a genetikai instabilitás, ennek okai a HR (homológ rekombinációs) gének hibái voltak. A korábban feltételezett genetikai eltérések mellett feltűnő volt a *HGF/MET* rendszer együttes kópiaszám-emelkedése. Új megfigyelésünk volt a tüdőáttétekben a nagyszámú, döntően IFN- (interferon) regulált, immunsejt-specifikus gén amplifikációja. Az I-es típusú IFN szerepének tisztázására rezisztens sejtvonalat hoztunk létre, melynek segítségével meghatároztunk egy *in vitro* stabil 13 génes expressziós mintázatot, melyből 4 gén *in vivo* is stabilnak bizonyult kísérleti rendszerben. A mintázatot nemzetközi adatbázisokban validáltuk és kimutattuk, hogy egyes elemei szerepet játszhatnak az immunterápiás érzékenységekben. A metasztázis-biobank korábban IFN-kezelt eseteinek felhasználásával kimutattuk, hogy a betegek citokinkezelése megváltoztatja a progrediáló daganat genetikai sajátosságait, ami az agyi áttétekben a legkifejezettebb. Az IFN-rezisztencia-génmintázatunk elemeinek genetikai eltérései a korábban IFN-kezelésben nem részesült betegekben is megjelentek, ami arra utal, hogy nemcsak a terápiásan alkalmazott IFN-kezelés, hanem a daganatellenes immunválasz során felszabaduló endogén IFN is okozhat ilyen eltéréseket. *Magy Onkol* 67:215–221, 2023

**Kulcsszavak:** kután melanóma, metasztázis, genomika, I-es típusú interferon, rezisztencia

*We have followed the genomic progression of cutaneous melanoma in visceral metastases using genome-wide copy number analysis. We have detected an increased chromosomal instability due to the loss of several DNA repair genes. Furthermore, we found co-amplifications of *HGF* and *MET* genes in metastases. The most interesting finding was gene amplifications of several, mostly IFN-regulated immune cell genes in lung metastases. Next we have defined a type I IFN resistance gene expression signature (GES) using human cell lines, several elements of which were proved to be stable in vitro and in vivo as well. The components of this GES have been detected in TCGA as well as in publicly available datasets of immunotherapy-treated melanoma cases. In case of samples from previously IFN-treated melanoma cases we have identified treatment-specific genomic alterations (predominantly amplifications) which were most characteristic for brain metastases.*

Vízkeleti L, Ladányi A, Papp O, Doma V, Kárpáti S, Rásó E, Barbai T, Tímár J. Potential role of type I interferon in the genetic progression of melanoma. *Magy Onkol* 67:215–221, 2023

**Keywords:** cutaneous melanoma, visceral metastasis, genomics, type I interferon resistance

## BEVEZETÉS

A bőr melanómájának genetikája már jól ismert, azonosították a fő drivereket (*BRAF*, *NRAS*, *KIT*) a leggyakoribb szövettani típusokban, és hasonlóképpen a ritka formákét is [1]. Sajnos ezen ismeretek közül gyakorlatilag csak a *BRAF*-mutáció azonosítása vezetett többé-kevésbé hatékony célzott terápiák kidolgozásához, amelyek sikerességét elhalványították a később kidolgozott immunterápiák. A néhány tumoragnosztikus célzott terápiás indikáció közül az MSI- (mikroszatellita-instabilitás) alapú nem jön szóba, mert ez igen ritka melanómában, az *NTRK*- vagy *RET*- (vagy *ALK*-) fúziók is extrém ritkák, és elsősorban az ún. tripla-vad (*BRAF*, *RAS*, *KIT*) formákban lehet rájuk számítani [1]. A célzott terápiás próbálkozások sikertelenségének talán legfőbb oka az, hogy a melanóma genomikai térképét alapvetően a primer tumorok elemzéséből készítették el, és nincsen túl sok információ arról, hogyan változik ez a távoli áttétes betegség esetén az egyes célszervekben. Saját vizsgálataink kimutatták, hogy a *BRAF*- vagy *NRAS*-mutáns melanóma az áttétekben klonálisan kiszámíthatatlanul változik, így a *BRAF*-inhibitorok sikertelenségének egyik oka bizonyára ez [2]. Korábbi elemzésekben a melanómaáttétekben *EGFR4*- és *NMDAR2*-mutációkat, *MITF*- és *MET*-, *NEDD9*-, *CDK6*-, *BRIC5*- és *TEAD*-amplifikációkat, illetve *PTEN*- és *KISSR1*-szuppresszorvesztést találtak [3], de ezek a jelenségek minden bizonnyal csak a jéghegy csúcsait jelentik. Az elmúlt évtizedekben azonban a melanóma természetes progressziója fokozatosan változott annak következtében, hogy először a citokinterápia befolyásolta, majd újabban a célzott vagy legújabbban az immunterápia. Ezek a kezelések mintegy külső szelekciós nyomás alá helyezték a progrediáló daganatot, aminek nagy valószínűséggel lehettek genetikai következményei. Mindezek figyelembevételével szisztematikus, dominálónan autopsziás mintagyűjtéssel kialakítottuk a metasztatikus melanóma viszonylag nagy biobankját, ami lehetővé tette a fenti kérdések szisztematikus elemzését [2]. Miután a gyűjtött eseteink a célzott és az immunterápia előtti korszakból származtak, így ezek az esetek a természetes és a citokinterápia utáni progressziós folyamatokra vethetnek fényt.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

Szisztematikus gyűjtéssel hoztuk létre a metasztatikus melanóma 50 esetből álló biobankját, amely döntően FFPE (formalinfixált, paraffinba ágyazott) mintákon alapult, 139 áttéti mintát foglalva magába. Valamennyi eset a leggyakoribb SSM (felszínesen terjedő) és NM (noduláris) szövettani típusokba tartozott. A biobankba sikerült továbbá 10 olyan esetet (összesen 28 szervi áttéti mintával) is gyűjteni, amelyekből fagyasztott, nem fixált minták is rendelkezésre álltak. Ezek az esetek mind az „immunterápiás” korszakot megelőző időszakból származtak, és csak elvétve szerepeltek még benne *BRAF*-inhibitorral kezelt betegek [2]. Ez a fagyasztott mintás biobank később kiegészült még 7 olyan esettel, amelyek a molekuláris patológiai vizsgálatok során ún. tripla-vadnak minősültek, mert *BRAF*-, *RAS*- és *KIT* vad típusúak voltak.

A biobank létrehozásához (SE-TUKEB114/2012) és a genomikai elemzésekhez (SE-TUKEB191-4/2014, ETT-TUKEB14383) rendelkezünk etikai engedéllyel.

A mintákból DNS-t izoláltunk, meghatároztuk a T/N (tumor/normál) arányt, ami 75% feletti volt átlagosan. A genom-szintű kópiaszám-eltéréseket a minták minőségétől függően CytoScan HD vagy OncoScan FFPE array-hibridizációval vizsgáltuk [4]. A kapott nyers adatokat normalizálást és tisztítást követően Nexus copy number discovery 8.0 (Biodiscovery) és ChAS2.1 (Affymetrics) programokkal elemeztük [4]. Az újgenerációs szekvenálás során DNS-izolálás után könyvtárt készítettünk TruSeqDNA PCR-free HT könyvtár preparáló kittel (Illumina), majd a szekvenálás Illumina NovaSeq 6000 készülékén történt [5]. A bioinformatikai elemzés részletei megtalálhatók a releváns angol nyelvű közleményünkben [5].

Az IFN- $\alpha$ 2a-rezisztencia vizsgálatához *in vitro* IFN-kezelt emberi melanóma-sejtvonalat (HT168-M1) használtunk, amelyből kialakítottunk egy rezisztens vonalat (HT168-M1res). A rezisztenciát *in vivo* SCID egérbe történő oltással is igazoltuk [6]. Az IFN-rezisztenciára jellemző génexpressziós mintázatot a daganatsejtekből történő RNS-izolálás után Human Genome Survey Microarray 2.0 (Applied Biosystem) hibridizációval határoztuk meg, melyet AB1700 szkenneren elemeztük és az adatokat GeneSpring szoftverrel értékeltük ki [6].

## EREDMÉNYEK

### A melanóma immunogén mimikri jelenségének kimutatása [4]

Melanóma-biobankunk felhasználásával kerestünk ún. metasztázisspecifikus genetikai eltéréseket (kópiaszám-eltéréseket), amelyhez 10 esetünk állt rendelkezésre. A vizsgálathoz a leggyakoribb távoli szervi áttéteket – mint agy-, máj- és tüdőáttéteket – használtuk fel. Kimutattuk, hogy a melanóma-áttétekben szignifikánsan gyakoribbak a kópiaszám-eltérések, és ennek oka az volt, hogy (elsősorban az agyi áttétekben) gyakoribbá váltak a DNS-hibajavító enzimek kópiaszámvesztései. A korábban melanómametasztázis-génként bemutatott gének közül az agyi áttétekben a *CDKN2A*-vesztés és a *TERT*-amplifikáció, a májáttétekben a *TWIST*-, *SNAI1/2*- és *S100A9*-amplifikációk, a tüdőáttétekben ezek mellett a *NEDD9*-, *TEAD*-, *ABL*- és a *HGF/MET* ko-amplifikációk fordultak elő (ez utóbbi az agyi áttétekben is). Ami ennél még érdekesebb volt, az az, hogy 19 olyan gén amplifikációját észleltük a melanómaáttétekben, amelyek jellemzően immunsejteken fejeződnek ki [1. táblázat]. Ez a sajátosság elsősorban a tüdőáttétekre volt jellemző, míg a máj- és agyi áttétekben alig fordult elő. Meglepő módon a 19 gén között nem szerepelt a *CD274* (PD-L1) és a *CTLA4* (*CD152*), de 7 olyan gén volt közöttük, amelyeket már leírtak daganatsejtekből (*CD36*, *CD40*, *CD70*, *CD84*, *CD172*, *IDO1/2*, *CD320*). Meglepő volt az a megfigyelés is, hogy a 19 gén többsége ún. IFN-regulált gén [11/19]. A gének között szerepeltek dendritikussejt- (*CD1a*, *CD209*, *CD320*), makrofág- (*CD36*, *CD40*, *CD172*), T-sejt-gének (*CD70*, *CD84*, *CD217/IL17R*, *CD247*) és egy gyulladássos sejtekre jellemző gén (*IDO1/2*). Meglepő volt,

1. TÁBLÁZAT. A kután melanóma áttéteiben amplifikált immunsejtgének

Áttét gén	Agy		Máj		Tüdő	
	kópia- szám	incidencia (%)	kópia- szám	incidencia (%)	kópia- szám	incidencia (%)
CD160	4	10				
CD40			5,5	22	6	22
CD83			5	11	4	22
CD172			5	11	4,5	22
CD1A-E					4,66	33
CD36					4,25	44
CD37					4	22
CD48					4,66	33
CD70					4	11
CD8					4,66	33
CD93					4,5	22
CD209					4	11
CD244					4,66	33
CD247					4,66	33
CD320					5	11
ID01					5	22
ID02					5	22
BCR					4	33
IL17R					4	22

BCR: B-sejt-receptor, IDO: indolamine-dioxigenáz, IL17R: IL-17-receptor

hogy B-sejt-gén alig volt érintett (*CD48*, *CD93*). A TCGA (The Cancer Genome Atlas) melanóma-adatbázisában egy gén kivételével (*CD172*) valamennyi úgynevezett immunsejtgént detektáltuk mRNS-szinten is.

### I-es típusú IFN-rezisztencia génexpressziós mintázat felfedezése emberi melanóma-sejtvonalakban (2. táblázat, 6)

Metasztatikus emberi melanóma-sejtvonal (HT168-M1) *in vitro* I-es típusú IFN- (*IFN- $\alpha$ 2a*) kezelésével egy rezisztens sejtvonalat (HT168-M1res) alakítottunk ki. A két sejtvonal mRNS-expressziójának összehasonlításával egy 91 génből álló expressziós mintázatot (GES) azonosítottunk, amely a rezisztens sejtvonalra volt jellemző. Miután ismételt kísérletben már csak 81 génből állt a mintázat, amiből 2 lncRNS (hosszú nem kódoló RNS) volt, végül egy 79 génes mintázattal dolgoztunk tovább. Érdekes módon ezen 79 génből csak 24 (30,4%) volt ún. IFN-regulált gén (IRG), melyek közül 14 fokozottan, míg 10 csökkenten expresszáldott. TaqMan teszttel ellenőriztük ezen génmintázat stabilitását *in vitro* és *in vivo* SCID egérbe történő oltással. *In vitro* egy 13 génes mintázat bizonyult stabilnak, amelyben már csak 4 gén volt IRG: *SOX4*, *UCP3*, *DEK*, *HSPA1B*. Többszörös *in vivo* oltásokkal egy 4 génes mintázat stabilizálódott, amelyben 2 IRG volt (*IFI27*, *CDCA4*) és 2 non-IRG (*CDKL3*, *AQP1*) (6).

### Az IFN-rezisztencia-mintázat ellenőrzése I-es típusú interferonnal kezelt melanómás betegek TCGA-adatbázisában (6)

A TCGA melanóma-adatbázisából kikerestük azon áttéti szöveteket tartalmazó eseteket, amelyek korábban IFN-kezelésben részesültek (n=33). Ebben az elemzésben a 79 génes IRG-mintázat 4 eleme, a *WFDC1*, *BCAN*, *SOX4* és *RPE65* bizonyult az IFN-kezelésre specifikusnak. A TCGA melanómás adatbázisában alig vannak olyan esetek, ahol az IFN-kezelésre adott válasz is szerepel. Ezen kicsiny betegcsoportban (n=8) az interferonra nem reagáló betegek daganatában az IFN-rezisztencia-mintázatunk 5 génjének (*HSPB7*, *MT2A*, *HSF1*, *WFDC1* és *TSPL52L1*) csökkent expresszióját észleltünk, míg a *DOCK11*, *DEK* és *SOX4* fokozottan fejeződött ki (6).

### Az IFN-rezisztencia-mintázat prediktív szerepének vizsgálata a melanóma immunellenőrzőpont-blokkoló terápiájának hatékonysága szempontjából (6)

Ezen vizsgálataink elméleti alapja az volt, hogy több közlemény is kapcsolatba hozta az IFN-rezisztenciát és az immunellenőrzőpont-blokkolókat hatékonyságát melanóma esetében, de itt elsősorban IFN-gamma jelpályára vonatkozó adatokat kaptak [7–9]. Nemzetközi transzkriptomikai adat-

**2. TÁBLÁZAT.** IFN-rezisztencia génexpressziós mintázata emberi melanóma-sejtvonalban, a TCGA adatbázisban, és kapcsolat az immunterápiás rezisztenciával (6)

IFNrez GES <i>in vitro</i> stabil		IFNrez GES <i>in vivo</i> stabil		IFNrez GES IFN-kezelt betegekben (TCGA)		Immunterápiarevizisztencia – IFNrez GES <i>in vitro</i> stabil	Immunterápiarevizisztencia – IFNrez GES <i>in vivo</i> stabil
PDE6A	foszfodiészteráz	IFI27	IFN- $\alpha$ -indukált protein			PDE6A	
EFHD1	EF-hand domain	CDCA4	sejtciklus-asz-szociált protein			EFHD1	CDCA4
BCORL1	BCL-6-korepresz-szor	CDKL3	ciklindependens kináz			BCORL1	
SSTR5	szomatosztatin-receptor	AQP1	akvaporin			SSTR5	AQP1
HOXD10	homeobox						
HSPA1B	hősokkprotein					HSPA1B	
DEK	DEK onkogén			DEK		DEK	
AKT2	AKT onkogén			HSBP7	hősokk-protein	AKT2	
SDC2	szindekán			MT2A	metallo-tionein	SDC2	
UCP3	uncoupling protein			HSF1	hősokk transzkripciósi faktor		
NPTXR	neuronális pentra-xin receptor			WFDC1	WAF-proteáz-inhibitor	NPTXR	
BCAN	brevikán			TPD52L1	tumor-protein	BCAN	
SOX4	transzkripciósi faktor			SOX4		SOX4	
				DOCK11	dedicator of citokinesis		

GES: génexpressziós mintázat, IFNrez: I-es típusú IFN rezisztencia, TCGA: The Cancer Genome Atlas

bázisokban keresve 6 adatbázist találtunk, amelyben 318 bőrmelanómás beteg immunellenőrzőpont-gátló terápiás adatai voltak: 196 beteg rezisztensnek, 122 beteg pedig válaszadóknak bizonyult a kezelési adatok elemzése alapján. Első lépésben *in silico* teszteltük a 24 génes IRG-mintázat prediktív szerepét, de ez negatívnak bizonyult. Ugyanakkor a nagy IRG-mintázat 55 génes nem-IRG részének prediktív szerepét igazolni lehetett az immunterápiában részesült betegek adatbázisán. A következőkben a korábban *in vitro* stabilnak bizonyult IRG-mintázatot teszteltük az immunterápiás melanóma-adatbázisban és a 13 génből 11 prediktív erejűnek bizonyult az immunterápiarevizisztencia szempontjából: többek között a *BCAN*, *SDC2*, *SOX4*, *EFHD1* és *DEK* fokozott, míg a *HSPA1*, *BCOR1* és *AKT2* csökkent expressziót mutatott a rezisztens esetekben. Az *in vivo* stabil 6 génes IRG-mintázatunk is prediktívnek bizonyult az immunterápiás rezisztencia szempontjából. Az egyes gének egyéni tesztelése során ennek a mintázatnak az *AQP1* és *CDC4* komponensei bizonyultak az immunterápiás rezisztencia prediktorainak (6).

### Az I-es típusú IFN-kezelés genetikai ujjlenyomatának azonosítása melanómaáttétekben

A melanóma-biobankunkban 16 eset szerepelt, amelyeknek 28 szervei áttéte áll rendelkezésre genomikai elemzésekre. Ebben a biobankban 10 IFN-kezelt eset szerepelt, amelyeknek 17 áttétét lehet vizsgálni. Kontrollként 6 eset 11 áttétét vizsgáltuk. Genomszintű kópiaszám-eltéréseket elemeztünk az IFN-kezelt esetek agy-, máj- és tüdőáttéteiben. Fontos megjegyezni, hogy a betegek valamennyien az ún. immunterápiá előtti időszakból származtak, kemoterápia mellett néhány esetben BRAF-inhibitor-kezelést kaptak. A sokszoros szűrés és bioinformatikai elemzés után az IFN-kezelt betegek áttéteiben egy 17 génből álló géncsoportot azonosítottunk, amelyek esetében génamplifikáció következett be (3. táblázat). Ezen gének jelentős része (9/17, 52,9%) ún. IRG volt. Az elemzést tovább folytattuk az egyes szervei áttétekre lebontva. Meglepő módon a májáttétek esetében nem volt kópiaszám-eltérés az IFN-kezelt és nem kezelt csoport között és a tüdőáttétek esetében is csak 3 ilyen gént találtunk: amplifikáció az *FMN2* és *GREM2*

génekben, míg kópiaszámvesztés a *DSCAML1*-ben fordult elő. Ezzel szemben az agyi áttétek esetében az IFN-kezelt esetekben 24 olyan gént azonosítottunk, amelyek döntően amplifikációt mutattak (3. táblázat). Megjegyzendő, hogy ez a 24, agyi áttétekre specifikus gén eltér az ún. metasztázisspecifikus 17 géntől.

Az általunk azonosított 79 génes IRG-mintázat génjeit teszteltük az IFN-kezelt melanómák áttéti anyagán is kópiaszám-eltérésre, és azt találtuk, hogy ebből 43 gén volt érintett. Ugyanakkor kisebb meglepetés volt, hogy ezek közül csak 13 bizonyult az IFN-kezelésre specifikusnak, míg a nagy többség mindkét kohorszban előfordult. A 43 gén közül 9 olyan eltérést észleltünk, amelyek az előző elemzésekben immunterápia-prediktoroknak bizonyultak, azonban ezek közül csak 3 volt specifikus az IFN-kezelt betegek áttéteire (*BCORL1*, *DDX10* és *PTBP1*).

Amikor megvizsgáltuk az egyes IFN-kezelt eseteket, azt találtuk, hogy a kialakuló genetikai mintázatok szempontjából 3 csoportra oszthatók: az esetek döntő részében (5/10) az agyi áttétekre jellemző és a metasztázismintázat is jelen volt, 3 esetben ezen mintázatok teljesen hiányoztak, míg 2 esetben ezek csak részlegesen alakultak ki. Megvizsgáltuk, hogy mi a közös ezen esetekben, és azt találtuk, hogy az ún. IFN-rezisztens esetekben a genom-szintű kópiaszám-eltérések szignifikánsan ritkábbak, ún. kromoszómáisan stabilabbak. Ezzel szorosan összefüggésben, az IFN-re reagáló csoportban a DNS-hibajavító gének vesztése szignifikánsan gyakoribbnak bizonyult. Ugyanakkor az IFN-rezisztens alcsoportban az *ABCA4* és *ZEB2* gének kópiaszám-emelkedése, míg az *ADAM5* és *ADAM3A* kópiaszám-vesztése volt jellemző.

**Ún. driver onkogének azonosítása a tripla-vad (*BRAF*, *NRAS*, *KIT*) melanómában (5)**

Terápiás szempontból az ún. tripla-vad melanóma egy különleges csoport, ahol elsősorban immunterápiában lehet gondolkodni. Kihhasználva az újgenerációs szekvenálás adta lehetőségeket, kiválasztottunk egy 7 esetből álló klasszikus bőrmelanóma csoportot, ahol elemeztük az előforduló genetikai hibák típusát és gyakoriságát. Az esetek között volt 2 TMB-high, mindegyik mikroszatellitastabil volt és egyik esetében sem volt jelen a homológ rekombinációs génmintázat. Ebben a tumorcsoportban mindösszesen 38 olyan gént azonosítottunk, amely igazoltan vagy valószínűleg onkogén vagy onkoszuppresszor funkciójú lehet. Meglepő ugyanakkor, hogy ezen gének döntő többsége (22/38, 57,9%) IFN-regulált gén volt. Feltűnő volt, hogy az egyik leggyakrabban mutált gén ebben a csoportban a *MUC4* (4/7), amely a melanóma immunrezisztenciájában játszik szerepet. A második leggyakoribb génhibák a *MUC17* és a *CSMD1* eltérései voltak (3/7), míg a *CA125/MUC16* mutáció is ismételten előfordult. Mindezen gének a melanóma immunérzékenységének fontos tényezői és jelentőségük felértékelődhet ebben a viszonylag ritka genetikai alcsoportban.

**3. TÁBLÁZAT.** IFN-kezelésre specifikus genetikai eltérések melanómaáttétekben

Metasztázis	Agy	Máj	Tüdő
<b>Metasztázisspecifikus génmintázat</b>	FKBP5	FKBP5	FKBP5
	FLRT3	FLRT3	FLRT3
	MYOM2	MYOM2	MYOM2
	NAPB	NAPB	NAPB
	PRNP	PRNP	PRNP
	ARMC12	ARMC12	ARMC12
	NRSN2	NRSN2	NRSN2
	SGCZ	SGCZ	SGCZ
	ADAM18	ADAM18	ADAM18
	CSMD1	CSMD1	CSMD1
	CST11	CST11	CST11
	CSTL1	CSTL1	CSTL1
	KIZ	KIZ	KIZ
	MACROD2	MACROD2	MACROD2
	RALGAPA2	RALGAPA2	RALGAPA2
	SOX12	SOX12	SOX12
	XRN2	XRN2	XRN2
<b>Tüdőáttét-specifikus génmintázat</b>			GREM2
			FMN2
			DSCAML1
<b>Agyáttét-specifikus génmintázat</b>	AGPAT5		
	ANGPT2		
	CDK18		
	DEFB1		
	ELK4		
	NUAK2		
	LEMD1		
	SLC45A3		
	NUCKS1		
	SLC41A1		
	CNTN2		
	DEFA4		
	DEFA6		
	DEFA8P		
	DEFA9P		
	KLHDC8A		
	MCPH1		
	MFSD4A		
	NFASC		
	PM20D1		
	RAB29		
	RBBP5		
	TMEM81		
	XKR5		



**MEGBESZÉLÉS**

Az irodalomban a melanómára vonatkozó genetikai adatok döntő többsége a TCGA adatbázisban primer tumorokból vagy áttéti nyirokcsomókból származik, így a kísérleti rendszerekben megfigyelt genetikai eltérések, amelyek az áttéti szövetben kimutathatók, a klinikai mintákon nem nagyon ellenőrizhetőek le. Ezért volt annak jelentősége, hogy létrehoztunk egy bőrmelanóma-áttéti biobankot [2], ahol a genetikai progresszió folyamata tanulmányozható. Elemzésünkhöz nem a leggyakoribb kután vagy távoli nyirokcsomóáttéteket használtuk, hanem a gyakoribb szervi áttéteket, mint az agy, máj és tüdő. A genomszintű kópiaszám-eltérések elemzése a daganat kromoszomális instabilitásáról ad felvilágosítást. Megfigyeléseink szerint a melanóma genetikai progressziója során fokozódik a kromoszomális instabilitás és ez szervspecifikus módon nyilvánul meg, mert a legkifejezettebb a tüdőáttétekben, míg a legkevésbé az agyi áttétekben észlelhető. Ez a sajátosság élesen eltér az emlőrákokban megfigyelt progressziótól, ahol az agyi áttétekben a legkifejezettebb [10]. Azonban hasonlóan az emlőrákhoz, melanóma esetében is a fokozódó kromoszomális instabilitás hátterében (legalábbis részben) a HR gének inaktiválódása áll, amire már korábbi kutatások is találtak jeleket [11], de az SSB (egyszálú DNS-törés javító) génekre is kiterjedt (*APTX*, *FEN1*, *GTF2H5*, *DNA2*, *MUS81* és *TOP3A*). Érdekes, hogy a kópiaszám-eltérések nem az emlőrák jellegzetes HR-génjeit érintették.

Vizsgálataink másik új és meglepő eredménye az volt, hogy a fokozódó kromoszomális instabilitás és az ennek következtében fellépő génamplifikációk igen nagyszámú immunsejtgént érintettek [12], de ez a jelenség (is) szervspecifikusnak bizonyult, mert szinte kizárólag a melanóma tüdőáttéteit jellemezte. Ezt a jelenséget magunk ún. immunogén mimikri jelenségnek neveztük el [12]. Természetesen biológiai jelentősége az ilyen genetikai eltéréseknek csak akkor lehet, ha ezek a gének mRNS- és főleg fehérjeszinten is kifejeződnek. Kihasnálva a Human Melanoma Proteome adta lehetőségeket, ellenőriztük a 19 immunsejtgén kifejeződését emberi melanómamintákban, és a 19 gén közül 14 esetében pozitív eredményt kaptunk, csak a CD37, CD83, CD160, CD172 és CD244 nem expresszáldott [13, 14]. Az irodalomban számos immunsejtgén ektópiás expressziójáról van már adat, amelynek legismertebb példája a PD-L1 [15, 16], de a rendszerszintű mimikri jelenségére eddig nem volt példa. Az is igen érdekes, hogy ez a fajta genetikai szelekciós mechanizmus elsősorban a melanóma tüdőáttéteiben nyilvánul meg, eddig ismeretlen okokból. Arra nézve, hogy a jelenségnek mi lehet a klinikai jelentősége, csak feltételezéseink vannak, de minden bizonnyal az immunrezisztencia kialakulásában játszhat szerepet, ahogy ezt a gének némelyikéről már bebizonyították: *IDO*, *CD70*, *CD47* [12]. Továbbá, mivel a mimikri gének döntő többsége ún. IFN-regulált gén, felvetődik annak lehetősége, hogy kromoszomálisan instabil melanómákban a daganatellenes immunválaszban felszabaduló interferonok is szerepet játszhatnak.

A melanóma kemo- és sugárterápiás rezisztenciája miatt a citokinterápia (amelynek egyik komponense mindig az I-es típusú IFN volt) sokáig szinte az egyetlen kváziadjuváns lehetőség volt, igen alacsony hatékonysággal. Ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy a bőr melanómája jellemzően genetikailag IFN-rezisztens [17]. Kísérleti adatok is arra utaltak, hogy pl. a *BRAF*-mutáns melanóma progressziójában az I-es típusú IFN jelpályája fontos szerepet játszik [18]. Bár korábbi irodalmi adatok jeleztek jellegzetes genetikai konstellációkat az IFN-rezisztenciával kapcsolatban, ennek nem lett később klinikai relevanciája. A jelenség új értelmezést nyert azzal, hogy kiderült, hogy a melanóma különféle immunterápiáinak (anti-PD-1 vagy anti-CTLA-4) hatékonyságát nagyban befolyásolják az IFN-jelpálya sajátosságai [7–9]. Az általunk kialakított, I-es típusú interferonnal szemben rezisztens emberi melanóma-sejtvonal különleges lehetőséget nyújtott a jelenség megismeréséhez. Bár kezdetben egy 79 génes rezisztenciamintázatot detektáltunk, hamar kiderült, hogy ennek csak egy kisebb része (13 gén eltérő expressziója) maradt tartós *in vitro* és ezekből csak 4 maradt meg tartósan *in vivo* SCID egérben (*IFI27*, *CDCA4*, *CDKL3* és *AQP1*). Sajnos IFN-kezelt melanómás adatbázis, ahol a klinikai válaszra vonatkozó adatok is elérhetőek, alig áll rendelkezésre, de a TCGA-ban kutatva azt találtuk, hogy a nagy IFN-rezisztencia-mintázatunk 13 génje mutatott eltérő expressziót, és ezek közül 2 (*DEK* és *SOX4*) olyan volt, amelyek a kísérleti rendszerben stabilnak bizonyultak. Az IFN-rezisztencia génextpressziós jellemzőinek tesztelését a melanóma immunterápiájára adott válasz és ennek genetikai sajátosságainak elemzésével folytattuk. A nemzetközi melanóma-génextpressziós adatbázisokból egy meglehetősen nagy beteganyagot lehetett kigyűjteni, ahol az RNS-szintű, genomszintű expressziós adatok rendelkezésre álltak. Ennek elemzése azt mutatta, hogy az immunellenőrzőpont-gátló terápiákkal szembeni rezisztenciában kimutatható az általunk leírt IFN-rezisztencia-mintázat jelenléte: az *in vitro* stabil mintázat 11 eleme és az *in vivo* stabil mintázat 2 eleme. A TCGA IFN-kezelt eseteivel összehasonlítva az is megállapítható, hogy a klinikai IFN-rezisztencia-mintázat 2 eleme átfed az immunterápia-rezisztencia mintázatával (*DEK* és *SOX4*). Ezek az adataink tovább erősítik azon meggyőződésünket, hogy összefüggés lehet a bőrmelanóma kezelése során alkalmazott IFN-terápia, a későbbi daganatos progresszió és a későbbi immunterápiás válasz között.

A kérdés további elemzését olyan bőrmelanómás betegcsoporton folytattuk, ahol a betegek egy része I-es típusú IFN-kezelést kapott, másik részük nem, ezek után következett be a progresszió, és a zsigeri áttétekből rendelkezésre állt jelentős számú minta. Megállapítható volt, hogy genetikai szinten azonosítható a korábbi IFN-kezelés hatása: mintegy 17 gén esetében következett be az áttétekben kópiaszám-változás. Ugyanakkor az is kimutatható volt, hogy ez csak a kromoszomálisan fokozottan instabil eseteket jellemezte. Az is érdekes megfigyelés, hogy az

agyi áttétek esetében kialakuló genetikai eltérések sokkal többretegűek és további 24 gént érintenek, jelezve azt, hogy valamilyen eddig ismeretlen okból az agyi áttétek különösen hajlamosak IFN-kezelésre specifikus genetikai eltérések kialakulására. Ezen a beteganyagon teszteltük azt is, hogy a kialakuló genetikai eltérések mennyiben érintik az általunk leírt IFN-rezisztencia-mintázat génjeit. Meglepő volt, hogy a 79 génünk közül 43 volt érintett az IFN-kezelt beteganyag áttéteiben, de ezek közül csak 13 volt kezelésspecifikus, mert a nem kezelt melanómás áttétekben is észleltünk 30 ilyen gént. A jelenség magyarázatára adódik az a lehetőség, hogy az IFN-rezisztencia és annak genetikai következményei nemcsak az exogén (terápiásan alkalmazott) IFN hatására, hanem a daganatos progresszió során fellépő daganatellenes immunválaszban felszabaduló endogén IFN hatására

is kialakulhatnak, ahogy ezt korábban megfigyelték (19). Amikor teszteltük, hogy ezen genetikai változásoknak lehet-e szerepük az immunterápiás érzékenységben, azt láttuk, hogy a rezisztenciamintázatunk 9 eleme is érintett volt, melyek döntő többsége (6/9) nem bizonyult IFN-kezelésre specifikus eltérésnek. Ez a megfigyelés is arra utal, hogy az exogén/terápiás és endogén IFN részben hasonló genetikai következményekhez vezet a melanóma progressziója során. Mindenesetre vizsgálataink eredményeiből azt a tanulságot levonhatjuk, hogy a korábban alkalmazott citokinkezelés megváltoztatja a melanóma genetikai progresszióját és az áttéti betegség genetikai jellemzőit, aminek egyelőre ismeretlen következményei lehetnek a betegség későbbi kezelésére (immunterápia, célzott terápia) nézve. A kérdés megválaszolására további klinikai kutatások szükségesek.

## IRODALOM

1. Tímár J, Ladányi A. Molecular pathology of skin melanoma: epidemiology, differential diagnostics, prognosis and therapy prediction. *Int J Mol Sci* 23:5384, 2022
2. Doma V, Kárpáthy S, Rásó E, et al. Dynamic and unpredictable changes in mutant allele fractions of BRAF and NRAS during visceral progression of cutaneous malignant melanoma. *BMC Cancer* 19:786, 2019
3. Tímár J, Vízkeleti L, Doma V, et al. Genetic progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 35:93–107, 2016
4. Papp O, Doma V, Gil J, et al. Organ specific copy number variations in visceral metastases of human melanoma. *Cancers* 13:5984, 2021
5. Pipek O, Vízkeleti L, Doma V, et al. The driverless triple-wild type (BRAF, RAS, KIT) cutaneous melanoma: whole genome sequencing discoveries. *Cancers* 15:1712, 2023
6. Ladányi A, Rásó E, Barbai T, et al. Identification of a tumor cell associated type I IFN resistance gene expression signature of human melanoma, the components of which have a predictive potential for immunotherapy. *Int J Mol Sci* 23:2704, 2022
7. Grasso CS, Tzol J, Onyschenko M, et al. Conserved interferon- $\gamma$  signaling drives clinical response to immune checkpoint blockade therapy in melanoma. *Cancer Cell* 38:500–515, 2020
8. Hargadon K, Györfy B, McGee TJ. Genomic and transcriptional changes in IFN $\gamma$  pathway genes are putative biomarkers of response to ipilimumab immunotherapy in melanoma patients. *Exp Rev Clin Immunol* 16:1099–1103, 2020
9. Rozeman EA, Hoefsmit EP, Reijers ILM, et al. Survival and biomarker analysis from the OpaCIN-neo and OpaCIN neoadjuvant immunotherapy trials in stage III melanoma. *Nat Med* 27:256–263, 2021
10. Dióssy M, Reiniger L, Sztupinszki Z, et al. Breast cancer brain metastases show increased levels of genomic aberration-based homologous recombination deficiency scores relative to their corresponding primary tumors. *Ann Oncol* 29:1948–1954, 2018
11. Kim KB, Soroceanu L, de Semir D, et al. Prevalence of homologous recombination pathway gene mutations in melanoma. *J Invest Dermatol* 141:2028–2036, 2021
12. Tímár J, Honn KV, Hendrix MJC, et al. Newly identified form of phenotypic plasticity of cancer: immunogenic mimicry. *Cancer Metastasis Rev* 42:323–334, 2023
13. Betancourt LH, Gil J, Sanchez A, et al. The human melanoma proteome atlas – complementing the melanoma transcriptome. *Clin Transl Med* 11:e451, 2021
14. Betancourt LH, Gil J, Kim Y, et al. The human melanoma proteome atlas – defining the molecular pathology. *Clin Transl Med* 11:e473, 2021
15. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27:450–461, 2015
16. Zarour HM. Reversing T-cell dysfunction and exhaustion in cancer. *Clin Cancer Res* 22:1856–1864, 2016
17. Di Trollo R, Simeone E, Di Lorenzo G, et al. The use of interferon in melanoma patients. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:203–212, 2015
18. Katlinskaya YV, Katlinsky KV, Yu Q, et al. Suppression of type I IFN signaling overcomes oncogene-induced senescence and mediates melanoma development and progression. *Cell Rep* 15:171–180, 2016
19. Hoekstra ME, Bornes L, Dijkraaf FE, et al. Long-distance modulation of bystander tumor cells by CD8+ T-cell-secreted IFN $\gamma$ . *Nat Cancer* 1:291–301, 2020