

Príspevok k molekulovej biológii malígneho melanómu

A Contribution to the Molecular Biology of Malignant Melanoma

Burjanivová, T.¹, Malicherová, B.², Péčová, T.³, Fetisovová, Ž.³, Konderla, T.³, Adamicová, K.⁴

¹Ústav molekulovej biológie a genomiky, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Martin

²Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Martin

³Dermatovenerologická klinika, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Martin

⁴Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Martin

Autori prispeli k práci rovnakým podielom.

korešpondencia: tatiana.burjanivova@uniba.sk

Súhrn

Malígný melanóm je závažné onkologické ochorenie. Predpokladom na jeho vyliečenie je včasná diagnostika, ktorá výrazným spôsobom zvyšuje prežívanie pacientov, prežívanie však výrazne klesá, ak je choroba zachytená v neskoršom štádiu. Metastazujúci melanóm predstavuje jeden z najagresívnejších a najrýchlejšie progredujúcich nádorov historicky len s veľmi obmedzenými možnosťami efektívnej liečby. Avšak na základe výskumov z molekulovej biológie pribúdajú poznatky o mutáciách, ktoré sú prítomné v bunkách malígnych melanómov. Rozvoj týchto poznatkov v oblasti molekulovej biológie prináša vývoj moderných protinádorových liekov a nové možnosti pre pacientov s týmto závažným onkologickým ochorením.

Kľúčové slová: molekulová biológia, mutácia génov, malígný melanóm

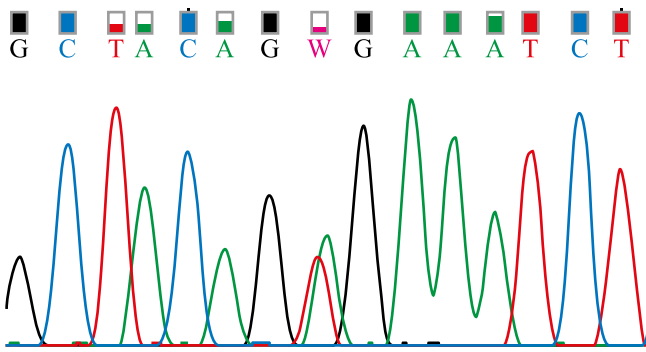
Abstract

The malignant melanoma is a serious oncological disease; the prerequisite for its cure is an early diagnostic which increases the patients' longevity in a marked manner. However, the longevity sharply decreases if the disease is intercepted in a later stage. Metastasizing melanoma represents one of the most aggressive and most rapidly progressing tumours; historically they have very limited possibilities of efficient treatment. Yet on the basis of researches in molecular biology there is an increase of knowledge of mutations which are present in the cells of malignant melanomas. The development of this knowledge in the field of molecular biology yields the development of modern antitumour medical drugs and new chances for the patients with this serious disease.

Key words: molecular biology, mutation of gene, melanoma malignum

Malígný melanóm je najčastejšou formou nádorového ochorenia v západných krajinách. Je to zhubný nádor kože vznikajúci z melanocytov – pigmentových buniek kože. Jeho incidencia neustále rastie. Toto ochorenie zahŕňa heterogénnu skupinu nádorov. K vzniku malígneho melanómu prispieva UV žiarenie [1], genetická predispozícia [2], fototyp [3], počet melanocytových névov [4], dĺžka telomér [5] a imunosupresia [6]. Poznatky o alteráciách v génoch, ktoré zohrávajú úlohu v patogenéze malígnych melanómov sa budú čoraz viac uplatňovať v personalizovanej medicíne. Lepšie pochopenie molekulovej biológie malígneho melanómu spolu s vývojom nových liekov je zásadné pre zlepšenie prognózy pacientov s týmto ochorením a výsledky genetických analýz môžu doplniť bioptické vyšetrenie.

V roku 2002 bol u pacientov s malígnym melanómom popísaný častý výskyt mutácie v géne *BRAF* [7]. Najčastejšou mutáciou je *BRAF V600E*, ktorá sa vyskytuje u približne 90 % mutovaných tumorov [8]. Táto mutácia má za následok asi 10-krát väčšiu aktivitu proteínu oproti nemutovanej forme. Aktivácia mutovaného proteínu *BRAF* je výsledkom konformačných zmien. Gén *BRAF* je členom signálnej dráhy mitogénom aktivovanej proteínovej kinázy (*MAPK*), zahŕňajúcej kaskádu *RAS-RAF-MEK-ERK* [7]. Cieľená biologická liečba *BRAF V600E* pomocou vemurafenibu a dabrafenibu je atraktívnou terapeutickou možnosťou u pacientov s malígnym melanómom [9, 10]. Efektivita a účinnosť *BRAF* inhibítorov bola preukázaná v štúdiách fázy II [11, 12, 13]. Po čase však u mnohých

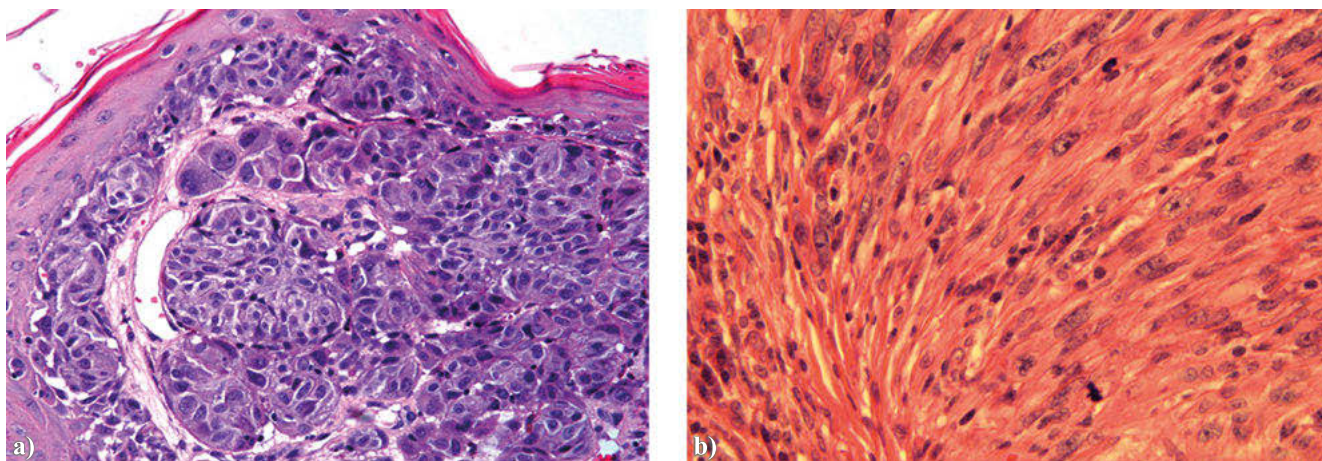


Obr. 1 • Príklad sekvenčného elektroforetogramu s mutáciou *BRAF V600E*

pacientov dochádza k vzniku rezistencie [14]. Melanómy s *BRAF* mutáciou sú lokalizované na miestach intermitentne vystavených slnečnému žiareniu a sú typické pre výskyt na trupe a končatinách. Melanómy, ktoré sa vyskytujú v oblastiach nevystavených slnečnému žiareniu sú bez *BRAF* mutácie a sú lokalizované na akračoch a na slizniciach. U malígneho melanómu uľahčujú tvorbu metastáz a narušovaním komponentov extracelulárnej matrix tkanivové metaloproteinázy MMP2 a MMP9 [15, 16]. Transkripčný faktor *NF- κ B* sa viaže na promótorogén MMP9 a zvyšuje jeho expresiu aktiváciou osteopontínu. Osteopontín je matricelulárny proteín, ktorý sa nachádza v nádorovom mikroprostredí a tak zohráva úlohu v progresii melanómu [17, 18]. Medzi ďalšie gény, ktoré sú často mutované u malígneho melanómu patria okrem spomínaného génu *BRAF* aj ďalšie gény ovplyvňujúce bunkovú proliferáciu, ako sú gény *NRAS* a *NF1*. U melanómov sú prítomné aj mutácie génov regulujúcich metabolizmus v bunke (gény *PTEN* a *c-KIT*), rezistenciu k apoptóze (gén *TP53*), kontrolu bunkového cyklu (gén *CDKN2A*) a kontrolu stability a dĺžky telomér (gén *TERT*) [19, 20]. Spomínané genomické alterácie vedú k aberantným aktiváciám dvoch signálnych dráh už horeuvedenej *RAS-RAF-MEK-ERK* signálnej kaskády a signálnej dráhy *PI3K/AKT* [21]. Členom *RAS-RAF-MEK-ERK* signálnej kaskády je gén *BRAF*. Ten bol detailne popísaný v úvode článku. Druhou najčastejšou aberáciou *RAS-RAF-MEK-ERK* signálnej kaskády u kožných melanómov je mutácia v géne *NRAS*. Gén *NRAS* je mutovaný u 15 – 30 % melanómov a väčšinou sa jedná o *missense* mutácie v kodónoch 12, 13 a 61, ktoré predstavujú 80 % všetkých *NRAS* mutácií [22]. Mutácie *NRAS* spôsobujú dlhšie zotrvanie *NRAS* proteínu v aktívnej forme s naviazaným GTP a následne abnormálnu aktiváciu *RAS-RAF-MEK-ERK/PI3K/AKT* signálnych dráh [23, 24]. Mutácie *BRAF* a *NRAS* sa navzájom vylučujú [25]. *NF1* je tumor supresor mutovaný v 10 – 15 % melanómov a je to tretí najčastejšie mutovaný gén u pacientov s malígnym melanómom [26, 27]. *NF1* proteín reguluje konverziu aktivovaného GTP-viazaného *RAS* na inaktívny GDP-viazaný proteín *RAS* [28]. Mutácia straty funkcie v géne *NF1* spôsobuje hyperaktiváciu *NRAS* proteínu a ná-

sledne zvýšenie aktivity *RAS-RAF-MEK-ERK/PI3K/AKT* signálnych kaskád [28]. Alterácie *NF1* génu sú typické pre melanómy vznikajúce následkom chronickej expozície slnečnému žiareniu a často sa vyskytujú spolu s mutáciami *BRAF* a *NRAS* [29, 30]. Mutácie génu *c-KIT* sú typické pre melanómy vyskytujúce sa na akračoch následkom intermitentného opaľovania a vyskytujú sa u 2 – 8 % malígnych melanómov [31]. *BRAF*, *NRAS*, *NF1* a *KIT* sú považované za tzv. *driver* mutácie. Sú to mutácie určujúce charakter transformácie a majúce významný podiel na agresivite a rezistencii tumoru. Tieto mutácie udeľujú bunkám rastovú výhodu a sú výsledkom pozitívnej selekcie počas evolúcie nádoru. Okrem týchto mutácií sú prítomné u melanómov aj iné mutácie. Mutácie v promótorovej oblasti génu *TERT* spôsobujú vysokú proliferatívnu aktivitu melanómových buniek a spolu s heterozygótnou mutáciou *CDKN2A* sú často detegované v *in situ* melanómoch. *CDKN2A* kóduje inhibitor cyklín-dependentnú kinázu 2A [32]. Produkt génu *PTEN* (z angl. *phosphatase and tensin homolog*), funguje ako tumor supresorový proteín. Mutácie génu *PTEN* sa vyskytujú u 10 – 30 % pacientov s malígnym melanómom [33]. V tomto géne boli okrem *missense* a *frameshift* mutácií nájdené aj epigenetické zmeny a aberantná génová expresia spôsobená microRNA (miRNA) [34]. Mutácie v géne *PTEN* sa nevyskytujú s mutáciami v géne *NRAS*, ale sú časté v koexistencii s mutáciami v géne *BRAF*. Toto zistenie je logické, že mutácie *PTEN* sú asociované s aktiváciou *PI3K/AKT* signálnej kaskády [35, 36]. Pre klinické využitie má význam zistenie, že mutácia génu *PTEN* spôsobuje rezistenciu na liečbu *BRAF* inhibítormi [37]. Ak je malígnym melanóm detegovaný včas, zvyšuje sa šanca na prežitie pacienta. Avšak metastazujúci melanóm predstavuje jeden z najagresívnejších a najrýchlejšie progredujúcich nádorov historicky len s veľmi obmedzenými možnosťami efektívnej liečby. Podstatnú úlohu pri metastázovaní nádorových buniek u pacientov s malígnym melanómom zohráva aktivácia Wnt signálnej dráhy, ktorá využíva k prenosu β -katenín, ktorý sa v bunke podieľa na tvorbe adherentných spojov medzi bunkami aj na proliferácii melanocytov. Táto signálna dráha zohráva funkciu aj v šírení metastáz [38]. Mutácie v *CTNNB1* géne, ktorý kóduje β -katenín sú prítomné u 2 – 4 % malígnych melanómov. Tieto mutácie stabilizujú β -katenín a zvyšujú transkripciu cieľových génov transkripčných faktorov rodiny TCF/LEF [39]. V posledných rokoch došlo v onkológii malígneho melanómu k veľkým úspechom v oblasti liečby vďaka novým poznatkom, ktoré priniesla molekulárna biológia. Na ich základe sa objavujú nové lieky atakujúce priamo malígne bunky a pritom sú šetrné k pacientom.

Napriek pokrokom v liečbe stále existuje množstvo pacientov, u ktorých nepriaznivý priebeh ochorenia nedokážeme zvrátiť. Identifikácia genetických zmien, ktoré zohrávajú úlohu v tumorigenéze malígneho melanómu má význam nielen na klasifikáciu tohto ochorenia, ale aj na identifikáciu potencionálnych terapeutických cieľov.



Obr. 2 • Malignný melanóm sa v biptickej praxi považoval za nádor s najpestrejším „mimikry“ medzi nádormi. Na obrázkoch možno vidieť diametrálne odlišnú morfológiu malígneho melanómu s epiteloidnými **a**) a s vretenobunkovými **b**) formáciami malígnych buniek. Morfológia podporuje súčasný názor, že ide nie o jeden nádor, ale o geneticky heterogénnu skupinu nádorov (HE, obr. 20x a 40x)

Literatúra

1. Secretan B, Straif K, Baan R, et al. WHO International agency for research on cancer monograph working group a review of human carcinogens - Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol.* 2009; 10, 1033-1034.
2. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC, et al. Familial melanoma: a meta-analysis and estimates of attributable fraction. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* Jan 2010; 19(1):65-73.
3. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC, et al. Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmented characteristics and freckling. *Int. J. Cancer* 2010; 127, 2430-2445.
4. Chang YM, Newton-Bishop JA, Bishop T, et al. A pooled analysis of melanocytic nevus phenotype and the risk of cutaneous melanoma at different latitudes. *Int. J. Cancer* 2009; 124, 420-428.
5. Han J, Prescott J, Guo Q, et al. A prospective study of telomere length and the risk of skin cancer. *J. Invest. Dermatol.* 2009; 129, 415-421.
6. Green AC, Olsen CM. Increased risk of melanoma in organ transplant recipients: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Acta Derm. Venereol* 2015; 95, 923-927.
7. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417, 949-954.
8. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011; 29:1239-1246.
9. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011; 364(26):2507-2516.
10. Ballantyne AD, Garnock-Jones KP. Dabrafenib: first global approval. *Drugs.* 2013; 73(12):1367-1376.
11. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363:809-819.
12. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364:2507-2516.
13. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366:707-714.
14. Wilson TR, Fridlyand J, Yan JY, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012; 487: 505-509.
15. Moro N, Mauch C, Zigrino P, et al. Metalloproteinases in melanoma. *Eur J Cell Biol* 2014; 93: 23-29.
16. Sandri S, Faiao, Flores F, Tiago M, et al. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP2 upregulation. *Pharmacol Res* 2016; 111: 523-533.
17. Lee KR, Lee JS, Kim YR, et al. Polysaccharide from *Inonotus obliquus* inhibits migration and invasion in B16 F10 cells by suppressing MMP2 and MMP9 via downregulation of NF- κ B signaling pathway. *Oncol Rep* 2014; 31: 2447-2453.

18. Guarneri C, Bevelacqua V, Polesel J, et al. NF- κ B inhibition is associated with OPN/MMP 9 downregulation in cutaneous melanoma. *Oncol Rep* 2017; 37: 737-746.
19. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in Melanoma. *Cell* 2012; 150:251-263.
20. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; 44: 1006-1014.
21. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: Rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2011; 2: 135-164.
22. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alternations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2135-2147.
23. Giehl K. Oncogenic RAS in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; 386: 193-205.
24. Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KS. NRAS mutant melanoma: Biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene* 2013; 32: 3009-3018.
25. Sensi M, Nicolini G, Petti C, et al. Mutually Exclusive NRASQ61R and BRAF V600E Mutations at the Single-Cell Level in the Same Human Melanoma. *Oncogene* Jun 2006; 25(24):3357-3364.
26. Messiaen L, Bronson RT, McMahon M, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov* 2013; 3: 338-349.
27. Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, et al. A genome scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov* 2013; 3: 350-362.
28. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res* 2014; 74: 2340-2350.
29. Pornputtpong N, Wu C, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun exposed melanomas. *Nat Genet* 2015; 47: 996-1002.
30. Gibney GT, Smalley KS. An unholy alliance: Cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance. *Cancer Discov* 2013; 3: 260-263.
31. Handolias D, Salemi R, Murray W, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23: 210-215.
32. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, et al. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med* 2015; 373: 1926-1936.
33. Wu H, Goel V, Haluska FG: PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003; 22: 3113-3122.
34. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, et al. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res* 2006; 66: 6546-6552.
35. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, et al. Robertson GP: Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 2881-2890.
36. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G et al. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 337-341.
37. Shi H, Hugo W, Kong X, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov* 2014; 4: 80-93.
38. Damsky WE, Curley DP, Santhanakrishnan M, et al. β catenin signaling controls metastasis in BRAF activated PTEN deficient melanomas. *Cancer Cell* 2011; 20: 741-754.
39. Rimm DL, Caca K, Hu G, et al. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of β catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999; 154: 325-329.