

MOLEKULÁRNÍ ZMĚNY OVLIVŇUJÍCÍ PROGRESI MALIGNÍHO MELANOMU

MOLECULAR CHANGES INFLUENCING PROGRESSION OF MALIGNANT MELANOMA

BRYCHTOVÁ S.¹, FIURÁŠKOVÁ M.¹, SEDLÁKOVÁ E.¹, TICHÝ M. jr.², EHRMANN J. jr.¹, BENEŠ M.³, BRYCHTA T.⁴

¹ Ústav patologie, Laboratoř molekulární patologie LF UP Olomouc

² Klinika chorob kožních a pohlavních LF a FN Olomouc

³ Onkologická klinika FN Olomouc

⁴ SPEA Olomouc, s.r.o.

Souhrn: Cílem práce bylo sledování exprese onkoproteinu Myc, PDGF a bFGF u souboru 42 bioptických vzorků, z nichž bylo 11 nodulárních melanomů (NM), 12 superficiálních melanomů (SSM), 9 dysplastických névů a 10 konvenčních pigmentových névů. Vyšetření bylo provedeno na tkáňových řezech metodou nepřímé imunohistochemie s použitím EnVision plus kitu. Zjistili jsme, že exprese Myc a PDGF byla signifikantně vyšší u nádorových buněk než u benigních melanocytů. Nebyla prokázána významně vyšší exprese bFGF. Tento protein však vykazoval rozdílnou intracelulární distribuci. Sledované antigeny jsme prokázali i ve stromálních elementech v okolí maligních lézí. Toto zjištění podporuje hypotézu o vzájemné kooperaci melanomových buněk a buněk nádorového stromatu při rozvoji onemocnění. Nelze vyloučit, že ovlivnění nádorového stromatu může být jednou z cest, jak terapeuticky ovlivnit progresi maligního melanomu.

Klíčová slova: maligní melanom, nádorové stroma, Myc onkoprotein, růstové faktory

Summary: The aim of this study was evaluation of Myc oncoprotein, PDGF and bFGF expression in the file of a total number of 42 bioptic specimens including 11 nodular melanomas (NM), 12 superficial spreading melanomas (SSM), 9 dysplastic naevi and 10 common naevi. Detection was performed on tissue sections by indirect immunohistochemistry using EVision visualization system. We found that Myc and PDGF expression was significantly higher in malignant cells in comparison to benign melanocytes. We did not prove higher bFGF expression. This protein however showed different intracellular distribution. The antigen above was also detected in the stromal elements in the neighborhood of malignant lesions. Our finding supports a hypothesis of mutual cooperation between melanoma cells and tumor stromal cells. We can not exclude that affecting tumor stroma might be one of the ways how to therapeutically influence malignant melanoma progression.

Key words: malignant melanoma, tumorous stroma, Myc oncoprotein, growth factors

Teoretický úvod

Maligní melanom (MM) je vysoce zhoubný novotvar s rapidně narůstající incidencí, který vychází z pigmentových buněk derivovaných z neurální lišty. Jeho prognóza je doposud založena hlavně na hodnocení velikosti tumoru, hloubce invaze, ulceraci a mitotické aktivitě. Dané parametry však zdaleka neumožňují přesnější predikci tohoto onemocnění. Stále platí, že MM je nádor vysoce nevyzpytatelný, schopen metastazovat kdykoli a kamkoli (Heenen a Laporte 2003). Z těchto důvodů je výzkum dalších prognostických faktorů vysoce aktuální.

Transformace normálních melanocytů je provázána četnými genetickými alteracemi, umožňujícími autonomní růst a nekontrolovanou proliferaci buněk, spojenou s poruchou regulace buněčného cyklu (Halaban 1999). Genetické a cytogenetické studie odhalily široké spektrum chromozomálních abnormalit a bodových mutací, vedoucích k inaktivaci nádorových supresorů pRb a jeho variant, p53, PTEN a CDKN2A/p16 (Koenig a 2002, Tsao et al. 2003). Rovněž jsou popisovány mutace a aberrantní exprese onkogenů ras (Kraehn et al., 1995), c-kit (Lassam a Bickford 1992) a dalších. Exprese některých onkogenů je závislá na faktorech zevního prostředí, z nichž k nejvýznamnějším patří UV záření. Doposud však žádná zjištěná genetická alterace nemůže být označena jako faktor jednoznačně podmiňující biologický potenciál tumoru nebo určující citlivost na terapii. Předpokládá se však, že molekulární analýza

genetických změn bude důležitým doplňkem histologického nálezu, který v budoucnosti pomůže objektivně posoudit význam jednotlivých genetických alterací.

Nádorová progresie není jednoznačně definována pouze alterací onkogenů a nádorových supresorů v samotných nádorových buňkách, ale signifikantní význam mají i změny, ke kterým dochází ve stromálním mikroprostředí obklopujícím nádorové buňky a které souvisí s poruchami komunikace mezi tímto mikroprostředím a maligními buňkami (Hendrix et al. 2003, Mueller a Fusenig 2002). Bylo prokázáno, že dochází ke změnám fenotypu nově vytvořeného reaktivního stromatu, kde se mění složení a struktura extracelulární matrix, zvyšuje se počet zánětlivých elementů a zvyšuje se aktivita proteolytických enzymů (Borgono a Diamandis, 2004). K faktorům, které se nejvýznamněji uplatňují v remodelaci stromatu patří růstový faktor odvozený z destiček, fibroblastový růstový faktor a transformační růstový faktor beta (PDGF, FGF, TGFβ), skupina matrixových metaloproteáz (MMP) a jejich inhibitorů (TIMP) a rodina vaskulárních růstových faktorů (VEGF). Tyto faktory ovlivňují přežívání, proliferaci, migraci nádorových buněk a indukují angiogenezi. Interakce mezi nádorovými buňkami a stromatem jsou vzájemné (Fusenig, 2004). Jednak nádorové buňky samy regulují složení nádorového stromatu svou autokrinní a parakrinní produkcí růstových faktorů, jejich receptorů, regulačních molekul a remodelujících enzymů (Ramont et al. 2003) a jednak podobnou aktivitu mají rovněž buňky stro-

mální. Nejvýznamnější role je přisuzována fibroblastům, které vytvářejí prostředí podobné fetálnímu, dokáží aktivovat imortalizující onkogeny jako c-myc a produkovat růstové faktory (Gu et al. 2001). Rovněž zánětlivé buňky, zejména makrofágy, se považují za regulátory cytokinové rovnováhy, jejichž působky podporují šíření nádorových buněk (De Wever a Mareel 2003).

V naší studii jsme u souboru maligních i benigních melanocytárních kožních nádorů sledovali expresi Myc, PDGF a bFGF, tedy proteinů, které se významně uplatňují v remodelaci stromatu různých solidních nádorů.

Materiál a metody

Do studie bylo zařazeno 42 bioptických vzorků, z nichž bylo 11 nodulárních melanomů (NM), 12 superficiálních melanomů (SSM), 9 dysplastických névů a 10 benigních intradermálních i dermoepidermálních pigmentových névů. Pro detekci byly využity parafínové bloky archivované na Ústavu patologie LF UP a FN Olomouc. Tkáňové řezy o tloušťce 5 µm byly zpracovány nepřímou imunohistochemickou technikou, s použitím primárních protilátek uvedených v tabulce 1. Po odparafínování a zavodnění řezů následovalo demaskování antigenů v mikrovlnném generátoru 1x20 minut a zrušení endogenní peroxidázové aktivity. Poté byly řezy inkubovány přes noc s primární protilátkou. Po promytí následovala detekce byla prováděna pomocí EnVision plus (Dako Cytomation, Dánsko) po dobu 60 minut při pokojové teplotě a vizualizace s AEC (aminoetylkarbazolem). Hodnocení bylo provedeno semikvantitativně výpočtem H-skóre (procento pozitivních buněk násobené intenzitou zbarvení). Výsledky byly statisticky analyzovány Chi-kvadrát testem (p<0.05).

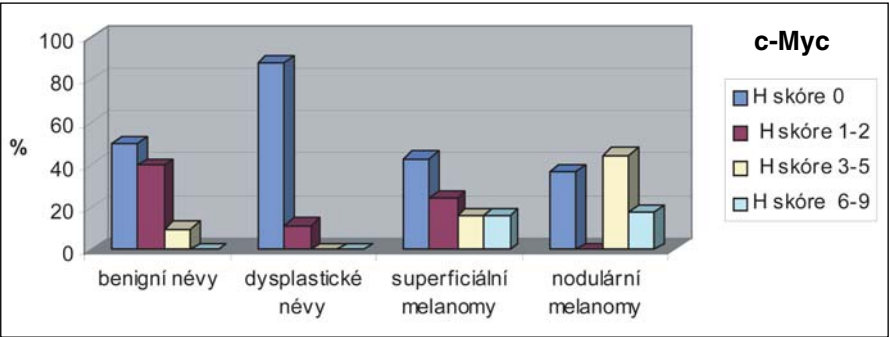
Výsledky

Onkoprotein Myc (Graf 1), vykazoval granulární perinukleární nebo difúzní cytoplasmatickou expresi (Obr 1). Vyšší přítomnot tohoto onkoproteinu byla zaznamenána v buňkách melanocytárního původu. Myc byl však rovněž disperzně přítomen ve stromálních fibroblatech a lymfocytech v okolí infiltrativně rostoucích tumorů. Statisticky významný rozdíl v expresi c-Myc byl zjištěn u skupiny NM a SSM ve srovnání s konvenčními benigními (p=0,033) a dysplastickými névy (p=0,026).

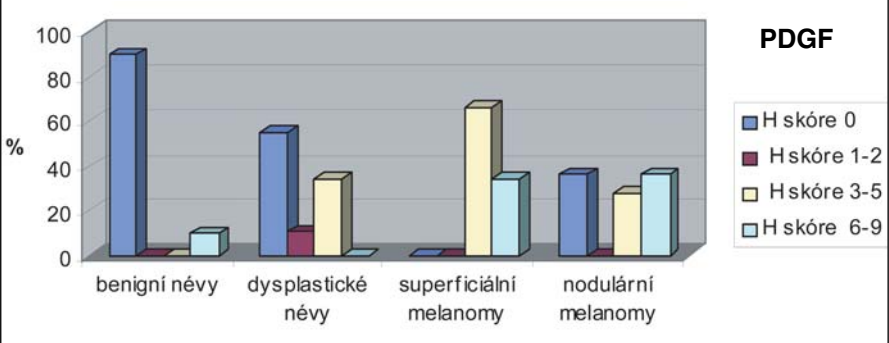
Tabulka 1.

protilátka	typ	klon/regi-strační č.	firma	ředění
PDGF	mouse	P-GF.44C	Novocastra Laboratories Ltd.,UK	1:100
FGF-2	rabbit	147	Santa Cruz Biotechnology,USA	1:100
c-Myc	mouse	9E11	Novocastra Laboratories Ltd.,UK	1:50

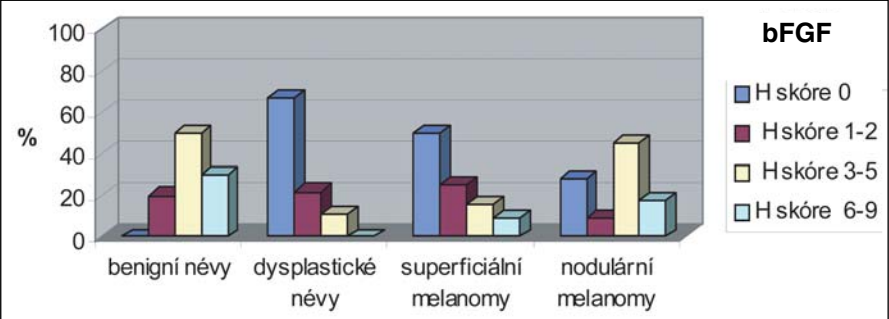
Graf 1: Srovnání exprese c-Myc mezi jednotlivými diagnózami.



Graf 2: Srovnání exprese PDGF mezi jednotlivými diagnózami.



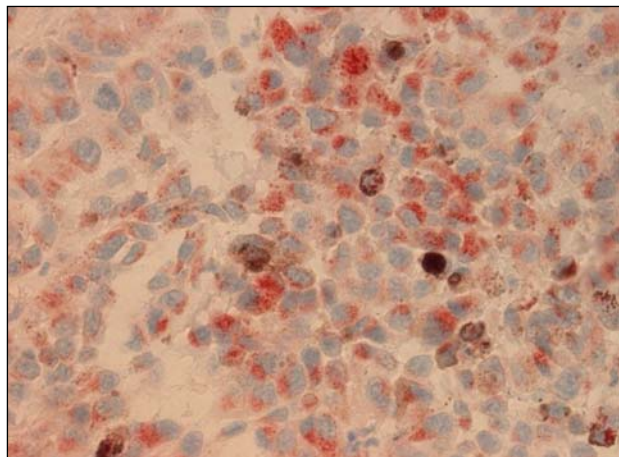
Graf 3: Srovnání exprese bFGF mezi jednotlivými diagnózami.



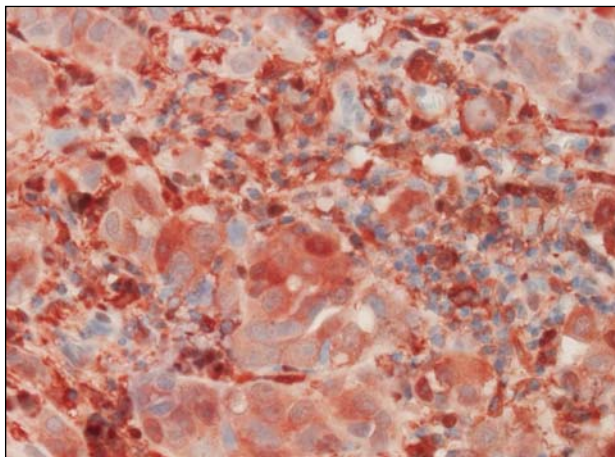
c-myc	H skóre 0	skóre 1–2	skóre 3–5	skóre 6–9
benigní névy	50	40	10	0
dysplastické névy	88	12	0	0
perficiální melanomy	43	25	16	16
nodulární melanomy	37	0	45	18

c-myc	H skóre 0	skóre 1–2	skóre 3–5	skóre 6–9
benigní névy	90	0	0	10
dysplastické névy	55	11	34	0
perficiální melanomy	0	0	66	34
nodulární melanomy	36	0	28	36

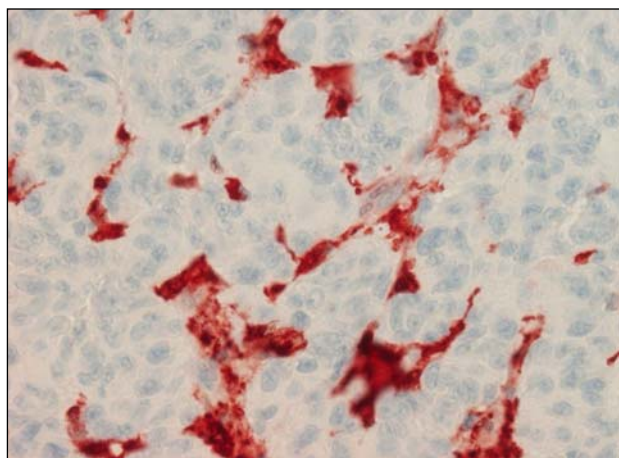
c-myc	H skóre 0	skóre 1–2	skóre 3–5	skóre 6–9
benigní névy	0	20	50	30
dysplastické névy	67	22	11	0
perficiální melanomy	50	25	16	9
nodulární melanomy	28	9	45	18



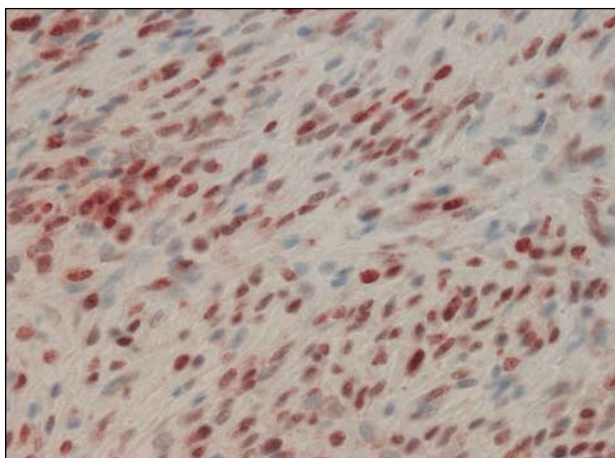
Obr. 1



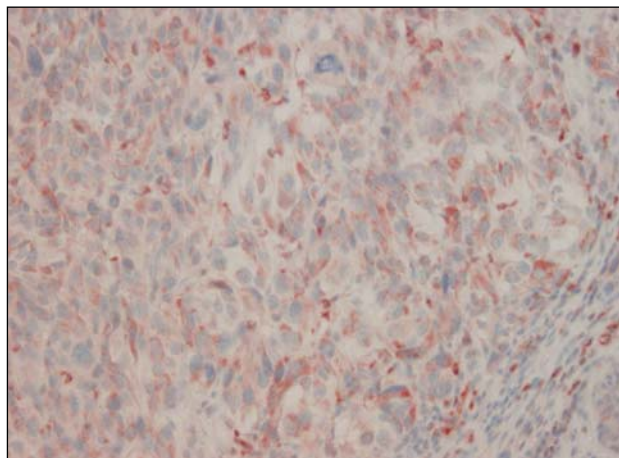
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5

Protein PDGF (Graf 2) byl lokalizován převážně v cytoplasmě buněk, i když jsme sporadicky zaznamenali i pozitivitu jadernou. Protein byl exprimován epidermálními a folikulárními keratinocyty, výrazně maligními melanocyty a dále buňkami stromatu. Jednalo se zejména o fibroblasty v okolí maligních lézí a místy rovněž o endotelie (Obr 2, 3). Zcela ojediněle byl protein exprimován melanocyty konvenčních névů. Statistická analýza potvrdila signifikantně vyšší expresi PDGF u maligních lézí ve srovnání s benigními ($p=0,0001$ pro SSM a $p=0,035$ pro NM).

Obr 1: Cytoplasmatická exprese onkoproteinu c-Myc v buňkách nodulárního melanomu, zvětšeno 400x.

Obr 2: Difúzní, silné zbarvení PDGF v nádorových buňkách nodulárního melanomu, zvětšeno 400x.

Obr 3: Silná pozitivita PDGF, zejména fibroblastů v nádorovém stromatu nodulárního melanomu, zvětšeno 400x.

Obr 4: Jaderná exprese bFGF v intradermálním pigmentovém névu, zvětšeno 400x.

Obr 5: Cytoplasmatická lokalizace bFGF v buňkách nodulárního melanomu, zvětšeno 200x.

Expresce bFGF (Graf 3) vykazovala rozdílnou lokalizaci v závislosti na povaze léze. Zatímco u melanocytů benigních lézí jsme pozorovali nukleární expresi (Obr. 4), u maligních melanocytů převažovala cytoplasmatická přítomnost tohoto proteinu (Obr. 5). Jaderná lokalizace byla přítomna i u „atypických melanocytů“ vyzářajících intradermálních pigmentových névů. Protein byl rovněž přítomen ve stromálních fibroblastech. Signifikantní rozdíly ve stupni expresce byly patrné mezi skupinami dysplastických névů a SSM ($p=0,039$), nebyly prokázány významné rozdíly mezi konvenčními névy a NM.

Diskuze

Zvýšená expresce růstových faktorů a onkoproteinu Myc u maligních melanomů a to nejen přímo v nádorových buňkách samotných, ale i v buňkách v bezprostředním sousedství maligních lézí, může svědčit pro vzájemnou komunikaci mezi oběma typy elementů. Tento fenomén nebyl pozorován pouze u pokročilejších stádií onemocnění, ale i u stádií s počínající invazí. Můžeme tedy předpokládat, že tato změna souvisí již s časnou fází malignizace.

Protoonkogen c-Myc je aktivován u celé řady solidních lidských tumorů. K jeho hlavním účinkům patří stimulace proliferace buněk a inhibice jejich diferenciace. Prokázalo se také, že tento protein má i vlastní transformační potenciál. Předpokládá se, že vyšší exprese tohoto onkoproteinu v nádorových buňkách je asociována s pokročilejšími stádii onemocnění (Kraehn a kol. 2001). Myc může rovněž výrazně ovlivňovat proliferaci fibroblastů, a tak i složení nádorového stromatu (Gu a kol., 2001). Onkoprotein Myc je ve tkáních stabilizován pomocí FGF, což je provázáno zvýšenou proliferací aktivitu buněk (Lepiguiue a kol. 2004). Nádorové stroma pravděpodobně nemá na nádorové buňky jen podpůrný účinek, ale předpokládá se i jeho přímý transformační vliv. Onkogenní signály vycházející z nádorových myofibroblastů a potenciálně i z jiných buněk (například endotelu) stimulovaly progresi nenádorové buněčné populace v nádorovou. Tato progresie byla spojována se změnami genetické exprese a různými genetickými alteracemi (Tisty, 2001, Philips a kol., 2001). Naopak nádorové buňky přenesené do nealterovaného prostředí ztratily svůj maligní potenciál.

Protein bFGF je znám jako mitogen, který stimuluje lidské melanocyty a podporuje růst melanomových buněk (Scott a kol. 1991). Předpokládá se, že aberantní exprese tohoto faktoru patří k časným změnám melanocytárních lézí, které ovlivňují proliferaci a dediferenciaci buněk. Zvýšená exprese bFGF může být vyvolána expozicí ultrafialovým zářením (Berkling a kol. 2004). K poruše exprese bFGF dochází pravděpodobně z důvodů inaktivace některých nádorových supresorů (Halaban, 1993). Halaban se spolupracovníky (1988) označují bFGF jako jeden z hlavních faktorů ovlivňujících růst melanomu a popisují expresi bFGF pouze u maligních buněk. Tyto výsledky však nebyly plně potvrzeny dalšími autory, kteří expresi bFGF sice rovněž popsali v maligních melanocytech, ale konstatují, že vzhledem k jeho nálezu i v konvenčních benigních névech (Scott a kol. 1991) tento růstový faktor rozhodně nemůže být označen jako marker transformace melanocytů. V našem souboru jsme tento protein detegovali u lézí maligního melanomu, stejně jako v benigních, zejména vyzrávajících névech. Doposud nepopsaným fenoménem je také rozdílná intracelulární distribuce toho-

to proteinu. Zatímco u maligních melanocytů je protein lokalizován intracytopasmaticky, u névových lézí dominuje jeho jaderná lokalizace. Je možné, že právě rozdílná lokalizace proteinu může být klíčem k dalšímu pochopení, jak může bFGF ovlivňovat růst maligních lézí nebo stimulovat produkci vaziva a vyzrávání konvenčních pigmentových névů.

Výraznou mitogenní aktivitu spojenou se stimulací nádorů může mít i PDGF (Furuhashi a kol., 2004). Jeho zvýšená exprese není popisována pouze v buňkách primárních kožních melanomů, ale i v jeho metastázách (Barnhill a kol., 1996). Zajíímavým zjištěním je i skutečnost, že PDGF má i transformační a antiapoptotický potenciál (Heldin a Westermarck, 1999). Kromě nádorových buněk je faktor produkován i aktivovanými makrofágy a fibroblasty, endotelem a hladkou svalovinou cév a epidermálními keratinocyty. PDGF dále stimuluje rozvoj nádorového stromatu a novotvorbu krevních a lymfatických cév. PDGF rovněž indukuje desmoplazii a to působením na stromální fibroblasty, které se jeho účinkem diferencují v myofibroblasty. Myofibroblasty v nádorovém stromatu (nádorové myofibroblasty) produkují růstové faktory jako například VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), proteázy a skupinu MMP (matrixových metaloproteáz) (Mueller a Fusenig, 2002). Experimentálně bylo prokázáno, že melanomové buňky, které zvýšeně exprimovaly PDGF, indukovaly desmoplazii stromatu s četnými krevními cévami. Naopak, buňky melanomu bez exprese PDGF tvořily tumory chudě vaskularizované a nekrotizující, bez zmoženého pojivové tkáně (Tuxhorn a kol. 2001).

Závěrem můžeme shrnout, že sledované faktory Myc, bFGF a PDGF byly prokázány nejen v maligních buňkách samotných, ale i v okolních stromálních elementech. Toto zjištění podporuje hypotézu o vzájemné kooperaci melanomových buněk a buněk nádorového stromatu při rozvoji onemocnění. Ukazuje se, že stejně jako u jiných solidních nádorů, tak i u MM může být ovlivnění nádorového stromatu jednou z cest, jak terapeuticky potlačit jeho progresi.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 1A/8245-3/2004 a MSM 6198959216.

Literatura:

- Heenen M, Laporte M. Molecular markers associated to prognosis of melanoma. *Ann Dermatol Venerol*. 2003 Nov;130(11):1025-31
- Halaban R. Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18(3):333-43
- Koenig A, Bianco SR, Fosmire S, Wojcieszyn J, Modiano JF. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Vet Pathol*. 2002 Jul;39(4):458-72.
- Tsao H, Mihm MC Jr, Sheehan C. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Nov;49(5):865-72.
- Kraehn GM, Utikal J, Udart M, Greulich KM, Bezold G, Kaskel P, Leiter U, Peter RU. Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases. *Br J Cancer*. 2001 Jan 5;84(1):72-9.
- Lassam N, Bickford S. Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene*. 1992 Jan;7(1):51-6.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Kirschmann DA, Quaranta V, Seftor RE. Remodeling of the microenvironment by aggressive melanoma tumor cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;995:151-61.
- Borgono A.A., Diamandis E.P. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature rev Cancer*. 4,11,2004. 876-890.
- Fusenig N.E. Friends or foes- bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature rev Cancer*. 4,11,2004. 839-847.
- Ramont L, Pasco S, Hornebeck W, Maquart FX, Monboisse JC. Transforming growth factor-beta1 inhibits tumor growth in a mouse melanoma model by down-regulating the plasminogen activation system. *Exp Cell Res*. 2003 Nov 15;291(1):1-10.
- Gu X, Fu X, Yang Y, Sun T, Jiang L. Expression characteristics of c-fos, c-myc and bFGF in early burn tissue. *Chin Med J (Engl)*. 2001 Sep;114(9):925-8.
- De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*. 2003 Jul;200(4):429-47.
- Kraehn GM, Scharlt M, Peter RU. Human malignant melanoma. A genetic disease? *Cancer*. 1995 Mar 15;75(6):1228-37.
- Lepique AP, Moraes MS, Rocha KM, Eichler CB, Hajj GN, Schwindt TT, Armelin HA. c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and

- destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol*. 2004 Dec;33(3):623-38.
- Tisty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin. Cancerbiol*. 2001, 11,97-104.
- Phillips JL, Hayward SW, Wang Y, Vasselli J, Pavlovich C, Padilla-Nash H, Pezullo JR, Ghadimi BM, Grossfeld GD, Rivera A, Linehan WM, Cunha GR, Ried T. The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis. *Cancer Res*. 2001 Nov 15;61(22):8143-9.
- Berkling C, Takemoto R, Satyamoorthy K, Shirakawa T, Eskandarpour M, Hansson J, VanBelle PA, Elder DE, Herlyn M. Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B. *Cancer Res*. 2004 Feb 1;64(3):807-11.
- Halaban R. Molecular correlates in the progression of normal melanocytes to melanomas. *Semin Cancer Biol*. 1993 Jun;4(3):171-81.
- Scott G, Stoler M, Sarkar S, Halaban R. Localization of basic fibroblast growth factor mRNA in melanocytic lesions by in situ hybridization. *J Invest Dermatol*. 1991 Mar;96(3):318-22.
- Halaban R, Kwon BS, Ghosh S, Delli Bovi P, Baird A. bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res*. 1988 Sep;3(2):177-86.
- Furuhashi M, Sjoblom T, Abramsson A, Ellingsen J, Micke P, Li H, Bergsten-Folestad E, Eriksson U, Heuchel R, Betsholtz C, Heldin CH, Ostman A. Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. *Cancer Res*. 2004 Apr 15;64(8):2725-33.
- Barnhill RL, Xiao M, Graves D, Antoniadis HN. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B and the PDGF-alpha receptor, but not the PDGF-beta receptor, in human malignant melanoma in vivo. *Br J Dermatol*. 1996 Dec;135(6):898-904.
- Heldin CH, Westermarck B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1283-316.
- Mueller MM, Fusenig NE. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation*. 2002 Dec;70(9-10):486-97.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*. 2001 Dec;166(6):2472-83.