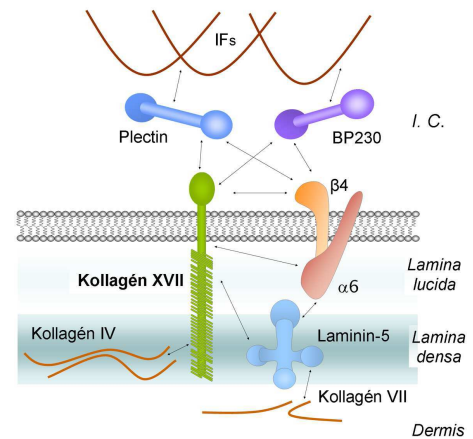


A kollagén XVII felülreguláció, malignus transzformáció és tumor-progresszió kapcsolata melanomákban

A malignus melanoma gyakorisága napjainkban emelkedik. A daganat gyógyszeres beavatkozásokra rezisztens, ezért az áttétes esetek túlélési esélyei nagyon kedvezőtlenek. A melanomák gyakran dysplastikus naevus-ok klonális populációiból alakulnak ki, így az átmeneti fenotípusú léziók diagnosztikája és kimenetele sokszor bizonytalan. A sejt-extracelluláris matrix interakciók fontos szerepet játszanak a normális sejt-funkciók fenntartásában, míg hibás működésük hozzájárul a malignus daganatok kialakulásához és progressziójához. Vizsgálatainkban a transzmembrán XVII-es típusú kollagén szerepét vizsgáltuk a melanomák kialakulásában és progressziójában, mivel elővizsgálataink alapján az csak malignus melanomákban volt kimutatható, benignus naevusokban nem.

A kollagén XVII fehérje összetett hámokban, így az epidermisben a hemidesmosomális adhíziós komplex (1. ábra) része, az intracelluláris aktin-kötő BP230 ill. plectin plakk-fehérjéket kapcsolja extracellulárisan a bazális membrán kollagén IV és laminin-5 fehérjeihez, mely utóbbi a dermális matrix VII-es típusú kollagénjéhez horgonyoz. A kollagén XVII ugyancsak kapcsolódik a hasonló funkciójú $\alpha 6 \beta 4$ integrin mindkét alegységéhez. A kollagén XVII fehérje bullosus pemphigoidban (BP) az autoimmunválasz célpontja, örökletes epidermolysis bullosa-ban pedig génmutáció révén expressziója és funkciója károsodik. Mindkét kórkép hólyagos bőrelváltozásokat okoz. Normális keratinocita érés során a 180 kDa molekulatömegű kollagén XVII-ből egy 120 kDa méretű extracelluláris szakasz (ektodomén) hasad le és a sejt kollagén XVII termelés megszűnése mellett terminálisan differenciálódik. Laphám carcinómában azonban a negatív „feedback” szabályozás károsodása miatt, a kollagén XVII fehérje jelenléte a sejt-differenciáció zavarára utal, így a daganatképződés markere. A kollagén XVII központi idegrendszeri neuronokban is kimutatható, azonban a hasonlóan neuroektodermális eredetű melanocytákban és daganataiban nem találtunk közölt adatot.



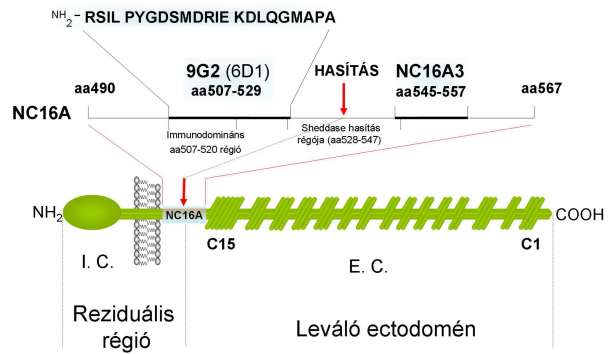
1. ábra. A hemidesmosomális adhíziós komplex molekuláris szerkezete

Vizsgálataink

Antitestek jellemzése

A projekt indulásakor kollagén XVII specifikus antitest kereskedelmi forgalomban nem volt. Vizsgálatainkhoz együttműködésünkkel szintetikus oligopeptidekre előállított közel 300 antitest-klónból választottuk ki a 9G2 és 6D1 jelzésűeket, melyek ELISA módszerrel jól reagáltak mind a BSA-kapcsolt, mind a szabad szintetikus antigén szekvenciájukkal (2. ábra), western-blot módszerrel normál epidermis izolátumban a kollagén XVII fehérjének megfelelő 180 kDa jelet adták és paraffinos szövetben antigénfeltárást követően megbízható reakciót mutattak a bazális membrán mentén és a bazális keratinocytákban (1). Újabb adatbázisoknak megfelelően a 9G2 és 6D1 által felismert epitóp (NH₂-RSIL PYGDSMDRIE KDR LQGMAPA) elhelyezkedését az NC16A doménen aa542-564-ről aa507-529-re kellett módosítanunk (2). Alkalmazott klónjaink (9G2, 6D1) az elhasított fehérje sejthez kötött részét (reziduális domén) ismerik fel, a metalloproteázok („shedase”) által lehasított ectodomén kimutatását a Freiburg-i Egyetemről beszerzett NC16A-3 klónjelű antitesttel végeztük.

Antitestjeink karakterizálásának és laphámrákban megfigyelt fokozott expressziójának eredményeit közleményben is összefoglaltuk (2), melyben beszámolunk a közreműködésünkkel hazai fejlesztésben (3DHitech Kft., Budapest) kidolgozott szöveti multiblokk (TMA, „tissue microarray”) digitális metszetek software-es, validált kiértékeléséről is. A közleményben 61 laphám carcinoma, 15 basosquamosus carcinoma, 36 bazálsejtes carcinoma, 29 solaris keratosis, 14 seborrhoeás keratosis és 9 normál bőrminta feldolgozásával megállapítottuk, hogy a kollagén XVII expresszió a korai laphámrák kórjelzője, mely bazálsejtes rákokban és nem-daganatos bőrelváltozásokban nem jelentkezik.

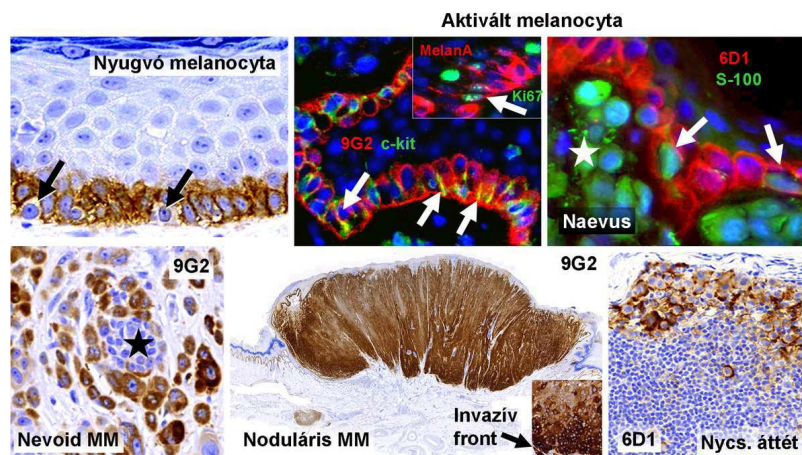


2. ábra. A kollagén XVII molekula, az NC16A régió szerepe és a reziduális (9G2) ill. leváló ectodomént (NC16A-3) felismerő klónok szekvencia specifitása

Kollagén XVII benignus és malignus melanocytás léziókban

Archivált szövetsminták teljes metszetein vizsgáltuk a kollagén XVII expressziót, melyek 79 primer cutan melanóból (30 felszínesen terjedő, 29 noduláris, 4 orsósejtes, 9 acralis-lentigonosus és 7 lentigo maligna) ill. 82 naevusból (39 dysplasticus, 14 Spitz, 6 kék, 14 összetett és 8 dermális) készültek (3,4). Antigénfeltárást követő szimpla- és kettős immunhisztokémiai jelöléssel végzett reakciók teljes metszet digitalizálása és kiértékelése után megállapítottuk (**3. ábra**), hogy: 1) A kollagén XVII fehérje sem nyugvó melanocytákban, sem közönséges naevus sejtekben nem mutatható ki; 2) Aktivált, proliferáló melanocyták pl. noduláris melanoma, vagy naevus melletti epidermisben kollagén XVII pozitív, mind a reziduális domént felismerő 9G2 és 6D1 klónokkal, mind az ektodomén specifikus NC16A-3 klónnal; 3) Dysplasticus naevusok egyes atípusos fészkeiben és melanomákban csak a reziduális domént felismerő antitestek reagáltak a differenciált maradvány naevus sejtek negativitása mellett; 4) Mind a primer, mind az áttéti melanomák döntő többsége kollagén XVII pozitív volt, de ugyancsak kizárólag a reziduális doménre; 5) Melanomákban a kollagén XVII expressziója pozitív korrelációt mutat a daganat vertikális növekedésével, Breslow-féle tumor vastagsággal, a Clark-féle terjedéssel, és az invazív daganatfronttal. A fentiek alapján megállapítottuk, hogy a kollagén XVII kimutatása alkalmas a malignus és a benignus melanocytás léziók elkülönítésére, még átmeneti fenotípusú daganatokban is.

Archivált szövetsminták teljes metszetein vizsgáltuk a kollagén XVII expressziót, melyek 79 primer cutan melanóból (30 felszínesen terjedő, 29 noduláris, 4 orsósejtes, 9 acralis-lentigonosus és 7 lentigo maligna) ill. 82 naevusból (39 dysplasticus, 14 Spitz, 6 kék, 14 összetett és 8 dermális) készültek (3,4). Antigénfeltárást követő szimpla- és kettős immunhisztokémiai jelöléssel végzett reakciók teljes metszet digitalizálása és kiértékelése után megállapítottuk (**3. ábra**), hogy: 1) A kollagén XVII fehérje sem nyugvó melanocytákban, sem közönséges naevus sejtekben nem mutatható ki; 2) Aktivált, proliferáló melanocyták pl. noduláris melanoma, vagy naevus melletti epidermisben kollagén XVII pozitív, mind a reziduális domént felismerő 9G2 és 6D1 klónokkal, mind az ektodomén specifikus NC16A-3 klónnal; 3) Dysplasticus naevusok egyes atípusos fészkeiben és melanomákban csak a reziduális domént felismerő antitestek reagáltak a differenciált maradvány naevus sejtek negativitása mellett; 4) Mind a primer, mind az áttéti melanomák döntő többsége kollagén XVII pozitív volt, de ugyancsak kizárólag a reziduális doménre; 5) Melanomákban a kollagén XVII expressziója pozitív korrelációt mutat a daganat vertikális növekedésével, Breslow-féle tumor vastagsággal, a Clark-féle terjedéssel, és az invazív daganatfronttal. A fentiek alapján megállapítottuk, hogy a kollagén XVII kimutatása alkalmas a malignus és a benignus melanocytás léziók elkülönítésére, még átmeneti fenotípusú daganatokban is.



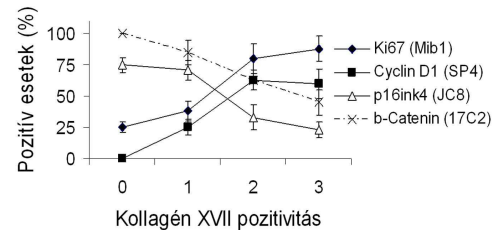
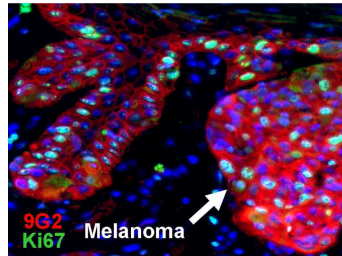
3. ábra. A kollagén XVII fehérje hiányzik nyugvó melanocytákból és naevus sejtekből (csillagok), de a reziduális régióra specifikus 9G2 és 6D1 antitestekkel kimutatható aktivált melanocytákban (kollagén XVII és Melan A, c-kit, vagy S100 kettős pozitív sejtek), valamint primer és áttéti melanomákban. A bazális kertatinocyták szintén pozitívak.

Kollagén XVII fehérjét kifejező melanoma sejtek funkcionális immunfenotípusa

A kollagén XVII pozitív daganatsejtek funkcionális jellemzéséhez a fenti esetekből készült 280 mintás (4x70 minta) TMA metszetsorozaton vizsgáltuk a sejtciklus-szabályozás és sejtadhézió olyan markereit is, melyek szerepe a melanoma progresszióban irodalmi adatok alapján feltételezhető (5).

Immufestett digitális metszetek analízisével megállapítottuk, hogy a kollagén XVII-et expresszáló melanomasejtek gyakran mutattak sejtmagi Ki67 és ciklin D1 pozitívítást, ill. csökkent, a cytoplazmába delokalizálódó, vagy hiányzó sejtmagi p16^{ink4} és sejtmembránhoz kötött β-Catenin reakciót. A melanomák kollagén XVII pozitívításának mértéke statisztikailag is jól korrelált (**p<0.005) a sejtciklus szabályozás pozitív regulátorainak (Ki67, cyclin D1) kifejeződésével, ill. a replikáció gátló p16^{ink4} fehérje elvesztésével (4. ábra).

A β-Catenin delokalizációja, ill. elvesztése ugyancsak párhuzamot mutatott a melanomák kollagén XVII pozitívításával, azonban az összefüggés nem volt szignifikáns. A kollagén XVII természetes ligandjai, a laminin-5 és kollagén IV egyike sem volt kimutatható a vizsgált melanomák döntő többségében.

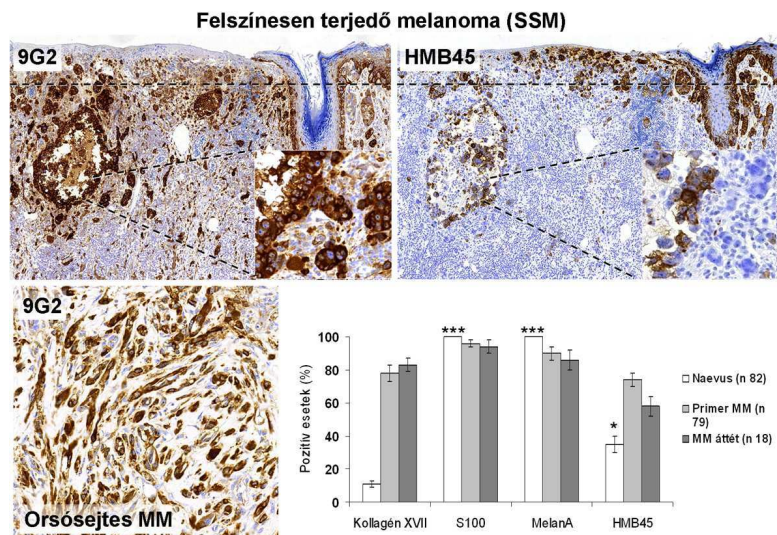


4. ábra. A kollagén XVII (9G2) pozitív melanoma sejtek erőteljes proliferációs (Ki67) aktivitása (baloldal) és a vizsgált melanoma progressziós marker fehérjék kifejeződése a kollagén XVII pozitívítás függvényében (jobboldal).

Kollagén XVII és tradicionális melanoma markerek összehasonlítása

A TMA metszeteken a kollagén XVII fehérje mellett, klasszikus (S100, HMB45, MelanA) és újabb melanoma marker fehérjéket (CD63, KBA62, MTF, Tyrosinase) is teszteltünk, kimutatásukat optimalizáltuk. Melanoma diagnosztikai szerepüket rövid áttekintő közleményben foglaltuk össze, mely újszerű digitális formátumban teljes digitális metszetek közvetlen elérését teszi lehetővé (6) (lásd www.pathonet.com e-books).

A vizsgált melanocytás léziók kollagén XVII expresszióját szisztémásan összehasonlítottuk az S100, HMB45 és MelanA fehérjék kifejeződésével, teljes metszetek értékelésével (5. ábra). A kollagén XVII reakció érzékenysége melanomákban hasonló volt az S100 ill. MelanA reakciókéhoz és meghaladta a HMB45 immunfestéseket. Azonban ellentétben a többi melanoma markerrel a kollagén XVII néhány dysplastikus naevus atípusos sejtízüstől eltekintve naevusokban nem volt kimutatható, így a legjobb esélyt kínálja a bizonytalan dignitású melanomák diagnosztizálására. A kollagén XVII reakció minden melanoma típusban a mélybe terjedő daganatfészkekben és elszórt daganatsejtekben erőteljes pozitívítást adott, szemben a HMB45 reakcióval, mely inkább a felszíni daganatrészekben dúsult fel. Orsósejtes melanomákban az S100 mellett csak a kollagén XVII immunfestés bizonyult pozitívnek. Egyes idegsejtek kollagén XVII pozitívítása és az orsósejtes, desmoplastikus melanomák neurális marker (NCAM) reaktivitása a közös neuroectodermális eredet neurális jellegének dominanciáját jelzi, melyre a melanogenezis-asszociált klasszikus melanoma markerek kevésbé érzékenyek.



5. ábra. Felszínesen terjedő melanomában a kollagén XVII (9G2) a mélybe terjedő (szaggatott vonal alatt), míg a HMB45 elsősorban a felszíni melanomasejtekben mutatható ki. Kollagén XVII reakció orsósejtes melanomában, mely MelanA és HMB45 negatív volt. A kollagén XVII szignifikánsan kevesebb (**p<0.001) naevusban pozitív, mint a többi marker.

Kollagén XVII fehérje kimutatása melanomás vérszérumból

A kollagén XVII fehérje kimutatását 55 melanomás beteg és 20 kontroll személy vérszérumából ELISA módszerrel végeztük. A tisztított 9G2 monoklonális antitestet használtunk elfogóként, majd a megkötött szérumfehérjét a kollagén XVII-en egy másik epitópot (aa55-72) felismerő tormaperoxidáz enzimmel jelzett monoklonális antitesttel (9A7/C9) mutattuk ki, háromféle (10x-es, 5-ös és 2x-es) szérumhígítás mellett. Kontrollként a 9G2-által felismert rekombináns peptid hígítási sorát használtuk, mely lineáris intenzitásnövekedést mutatott 0,0315-1,0 µg/ml méréstartományban. A melanomás minták koncentráció értékeit a negatív mintákból számolt átlag OD450 + 2x-es szórás értékkel összevetve csupán 3 melanomás mintában kaptunk jelentős 3-5-szörös kollagén XVII koncentrációemelkedést, míg további 15 mintánál csak a határértékhez közeli emelkedést volt kimutatható. Az eredmények azt mutatják, hogy a melanómákra jellemző reziduális kollagén XVII domén csak néhány előrehaladott melanomás beteg szérumában jelenik meg, így a melanoma progresszió és áttétek felderítésére a módszer nem alkalmas.

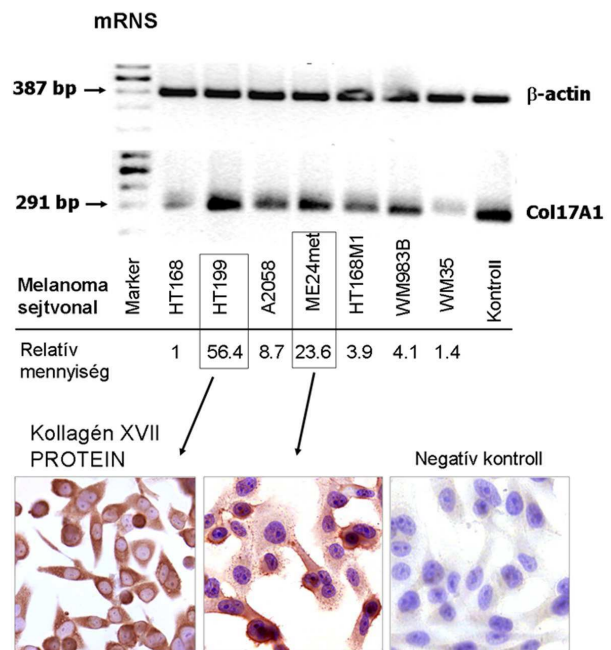
A melanoma proliferáció, apoptózis és adhézió befolyásolása specifikus antitesttel

A kollagén XVII-et mind mRNS, mind fehérje szinten vizsgáltuk genetikailag eltérő emberi melanoma sejtvonalakban, köztük az amelanotikus A2058, a korai növekedési fázisú WM35, az előrehaladott növekedésű WM983B, a mérsékelten áttétképző HT168 és az erőteljesen áttétképző HT199, ME24met ill. HT168M1 jelzésűekben (5). Pozitív kontrollként A431 cervix carcinoma sejtvonal szolgált. Az mRNS szintek reverz-transzkripcióval valósidejű PCR módszerrel történő méréséhez a **6. ábra** szerinti primereket használtuk. *In situ* immundetektálható fehérjét a hét vizsgált sejtvonalból négyben (HT199, ME24Met, WM983B és WM35) mutattunk ki, melyek között mind korai, késői és metasztatikus daganatok előfordultak és ahol a magasabb mRNS expresszió (HT199 és ME24met) magasabb fehérje szintekkel is társult (**7. ábra**). A kollagén XVII immunreakció, melyet 12-lyukú tárgylemezen tenyésztett sejteken végeztünk, elsősorban a melanoma sejtek cytoplazmájában és sejtmembránjában volt kimutatható. A pozitivitás mértéke fordított arányban változott a sejtek kiterjedésével, vagyis a kevésbé az üvegfelülethez tapadt sejtekben magasabb, míg szétterülő sejtekben alacsonyabb volt.

Huszonegy órás kollagén XVII-specifikus IgG2b kezelés hatására melanoma sejtvonalakban a célfehérje immuncytokémiaileg kimutatható mennyisége csökkent. Melanoma sejtvonalak tenyésztésében e specifikus immunkezelés sejtproliferációra, apoptózisra és sejtheadhézióra kifejtett hatását vizsgáltuk (7) (**8. ábra**). Az eredmények minden kezelési módban legalább 4 párhuzamos átlagából születtek, kontrollként, mind kezeletlen sejtek, mind IgG2b azonos koncentrációjával kezelt sejtek szolgáltak. A melanoma proliferáció változását kolorimetriás MTT (metiltetrazólium-bromid) teszttel mértük, ami az élő sejtek mitokondriális redukázainak formazán színreakciója alapján enged

6. ábra. A Col17A1 mRNS RT-PCR kimutatásához alkalmazott primerek

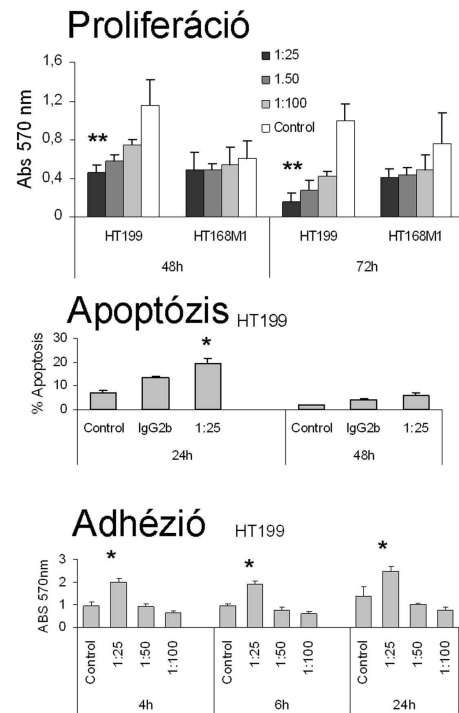
Primer jele (Génbank ID)	Szekvencia (5' to 3') (lokalizáció)	Termék
β-actin sense	TCT GGC ACC ACA CCT TCT AC (327-347)	
(gi:5016088) antisense	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC (714-692)	387 bp
Col17A 1 sense	CAGAATTGGATGATGTTAAGCGTT (636-660)	
(gi:18641353) antisense	CAGAGTAGGCATTGGTGTGGAG (905-926)	291 bp



7. ábra. A Col17A1 mRNS mennyiségi és minőségi analízise RT-PCR módszerrel melanoma sejtvonalakban. Az *in situ* kimutatott fehérje szintje jól korrelál a magas mRNS expressziójú sejtvonalakban.

a sejtszámra következtetni. 96 lyukú lemezekon 36 órán át tenyésztve az elővizsgált sejtvonalak növekedése a kontrollhoz képest csökkent, melynek mértéke a WM983B esetében átlagosan 35%, a HT168M1 esetében 18%, a WM35 esetében 39%, ill. a HT199 esetében pedig 45% volt. Részletes proliferációs vizsgálatokat a HT199 és az HT168M1 sejtvonalakkal végeztünk 24, 48 és 72 órás tenyésztéssel (8. ábra), ahol az immunkezelés HT199 sejtek proliferációját mind 48, mind 72 óra után szignifikánsan gátolta különösen az antitest 25-szörös hígításánál (20µg/ml IgG2b). Az apoptózis tesztben az apoptotikus sejtek arányát sejtszuspenzióban propidium jodiddal festett sejtvonalak FACS analízisével vizsgáltuk. A HT199 sejtvonalban a kollagén XVII-specifikus immunkezelés az apoptotikus sejtek számának jelentős emelkedését okozta, mind 24 és 48 óra után (30%, ill. 32%). Az adhéziós tesztben a sejtvonalakat szintetikus extracelluláris matrixon 9G2 jelenlétében tenyésztve 4, 6, ill. 24 óra után a letapadt sejtek teljes fehérjetartalmát mértük szulforodamin B-vel (SRB) történő festés után, fotometriásan. Az antitest 20µg/ml-es koncentrációjával történő immunkezelésre a HT199 sejtvonal adhéziója átlagosan közel 50%-al emelkedett minden kezelési időcsoportban, nagyobb antitest-hígításoknál pedig 10-40%-os csökkenést mutatott.

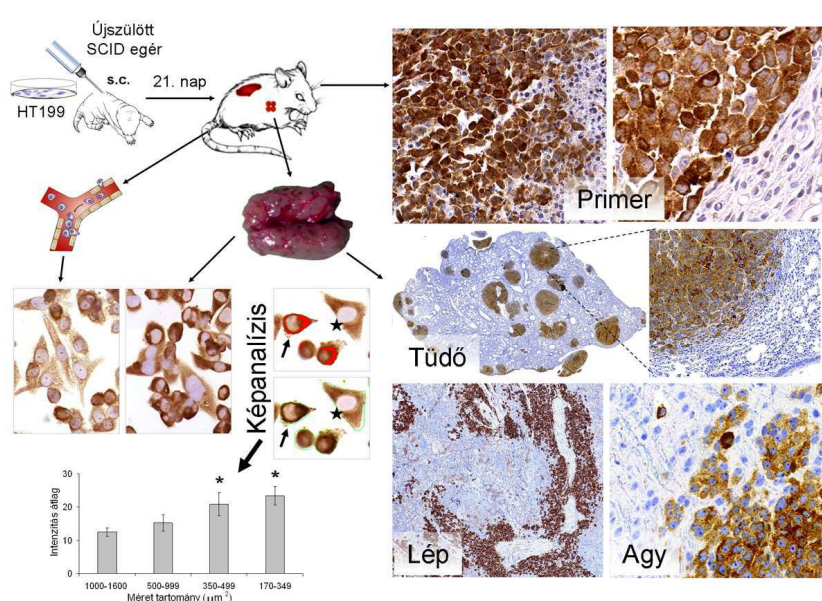
A fenti funkcionális vizsgálatok arra utalnak, hogy a reziduális kollagén XVII molekula NC16A régiójának aa507-529-ig terjedő szekvenciáját célzó immunkezeléssel a HT199 melanomasejtek proliferációját gátolni, apoptózis készségét és adhézióját pedig fokozni lehet, vagyis a kollagén XVII fehérje részt vehet a melanoma sejt e fontos funkcióinak szabályozásában.



8. ábra. HT199 melanoma sejtenyészetek kollagén XVII specifikus antitest kezelése 20µg/ml IgG2b koncentrációban (1:25) gátolja a melanoma sejtek proliferációját (**p<0,005) és fokozza apoptózis készségüket és felszíni adhéziójukat (*p<0,05).

Kollagén XVII kifejeződés primer és áttéti melanoma xenograftokban

A HT199 melanoma sejtvonal immundeficiens újszülött SCID egerekbe subcutan implantálva három héttel a beültetés után a daganat masszív megtapadását eredményezte mind primer, mind áttéti lokalizációkban (9. ábra). A recipiens állatok keringéséből és szolid daganatos mintáiból részben élő sejteket izolálva azokat újratenyésztettük, részben formalinrögítést követően parafinba ágyasztuk. A kollagén XVII fehérje reziduális doménje minden így nyert tenyészetben és szövetmintában konstitutív ex-



9. ábra. HT199 melanoma sejtvonal SCID egér xenograftjában a kollagén XVII fehérje mind primer, mind másodlagos daganatokban jelentősen kifejeződött. Az izolált és újratenyésztett melanoma sejtekben a célfehérje szintje a sejtek adhéziójával járó területnövekedésével párhuzamosan csökkent (*p<0,05).

pressziót mutatott (7,8). A bármely lokalizációból újratenyésztett HT199 melanoma sejtekben a kollagén XVII fehérje mennyisége fordított arányban változott a sejtek kitapadásának mértékével. Az alig letapadt ovális sejtek jelentősen több kollagén XVII fehérjét tartalmaztak, mint az elnyújtott, erős adhéziót mutató sejtek. Mindez összhangban van, mind a primer HT199 kultúrában, mind a humán melanomás esetekben megfigyelt hasonló jelenségekkel és a kollagén XVII specifikus immunkezelésre kialakuló adhézió fokozódással. A szöveti daganatszigeetek frontjának és arról leszakadó melanoma fészkek, egyedi daganatsejtek és az invazív dagantfrontok fokozott kollagén XVII expressziója *in vivo*, hasonló mechanizmus, részben a hiányzó kollagén XVII mediálta adhézió következménye lehet.

Kollagén XVII kifejeződés siRNS blokkolása

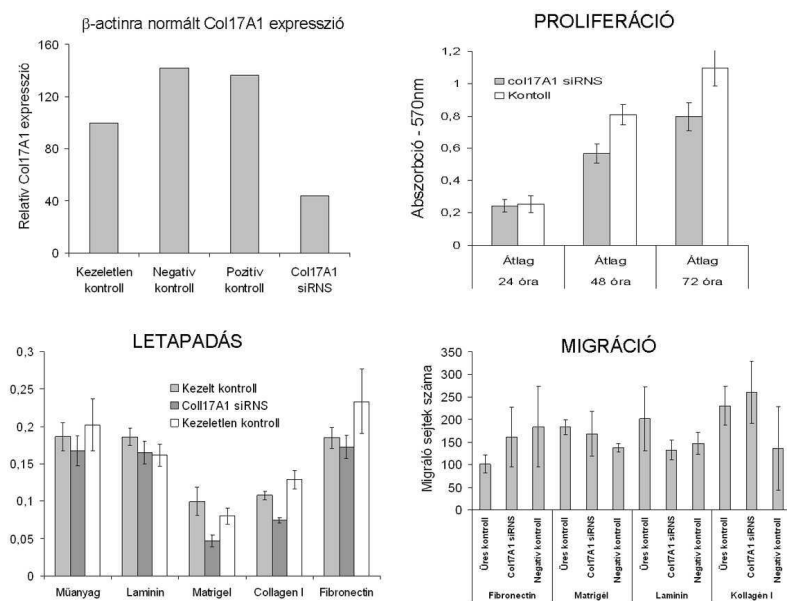
Kollagén XVII mRNS (Col17A1) gátló siRNS kezelés daganatnövekedésre, subsztrát adhézióra (letapadás) és sejtmigrációra gyakorolt hatását jelenleg is vizsgáljuk. A kezelés első sorozatának eredményeit az 10. ábra foglalja össze. Tervezett csendesítő siRNS-el és transzfecció kittel

(mindkettő Ambion, Applied Biosystems, AM16708, ill. AM 1631) a HT199 konfluens melanoma sejtvonalban a Col17A1 gén specifikus csendesítését siRNS/transzfecció ágenssel történő 48 órás inkubálással végeztük. A transzfecció eredményességét Col17A1 mRNS expresszió valósidejű RT-PCR módszerrel mért szignifikáns csökkenésével bizonyítottuk β -cateninre normált összevetésben. Az siRNS blokkolás a HT199 melanoma sejtek proliferáció gátlását eredményezte az összezavart („scrambled”) siRNS próbával végrehajtott kontroll transzfeccióhoz képest. A Col17A1 specifikus siRNS kezelésnek kitett HT199 sejtek

adhéziója a legtöbb matrix fehérjéhez ugyancsak csökkent, bár az eltérés nem szignifikáns. A migrációs tesztben 100 μ g/ml attraktánszt használtunk a kiindulási átlag sejtszám 104 sejt/lyuk volt. A migrációt Neuro Probe Reusable Multiwell Chemotaxis (Boyden) kamrában 8 μ m-es lyukméretű Whatman PVPF Nucleopore Track-Etch membránon keresztül teszteltük 11 óra után. Az üres és a „scrambled” kontrollok értékeinek jelentős eltérése miatt a teszt további tökéletesítésre és ismétlésre szorul, miként a többi teszt újabb párhuzamos vizsgálatokkal kerül kiegészítésre az eredmények összegzése és közlése előtt.

Melanoma diagnosztika a daganat-matrix határ nem-invazív kimutatásával

A melanoma progresszió fehérje szintű markereinek keresése mellett, a University College London Sejt és Fejlődésbiológiai Intézetével (prof. David Becker) együttműködve bizonyítottuk, hogy a pulzáló infravörös lézer fényvel működő un. másodlagosan generált harmonikus képalkotás módszere (second harmonic generation imaging, SHG) festetlen melanoma metszeteken és teljes bőrpreparátumokon alkalmas a daganat és a környező kollagén határfázisának a pontos azonosítására, így a melanomák korai nem-invazív kimutatására (9,10).



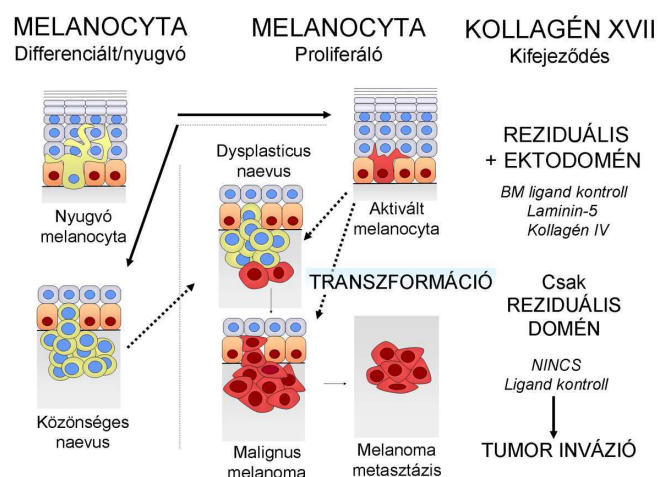
10. ábra. A HT199 melanoma sejtvonal col17A1 mRNS expressziója proliferációs, letapadási és migrációs tulajdonságainak változása Col17A1 siRNS kezelés hatására.

Összefoglalás és következtetések

Az átmeneti („borderline”) fenotípusú melanocytás léziók malignitásának eldöntése jelentős diagnosztikus probléma. Ebben projektben bizonyítottuk, hogy a kollagén XVII fehérje, mely a differenciálatlan keratinocyták matrix adhéziójában fontos és laphámrákban felülregulálódik, ugyancsak szelektíven kifejeződik aktivált melanocytákban, primer és áttéti melanomákban, melanoma sejtvonalakban és dysplasticus naevusok egyes atípusos sejtészkeiben, míg nyugvó melanocytákban és naevusokban nem mutatható ki. A kollagén XVII immunhisztokémiai reakció jól kiegészíti a hagyományos markerek (S100, HMB45, MelanA) profilját, azzal az előnnyel, hogy nem melanosoma-kapcsolt fehérje, így negatív benignus léziókban, viszont orsósejtes melanomákban is pozitív. Kapcsolata a malignus transzformációval nyilvánvaló naevoid melanomákban, ahol a differenciált naevusokról lefűződő melanoma sejtek kollagén XVII pozitívvá válnak.

Megfigyeléseinket két, azonos epitópot (aa507-529) felismerő klón (9G2 és 6D1) megegyező reakcióprofilja is támogatja. Pozitív reakciójuk melanomákban a kollagén XVII reziduális domén kimutatására korlátozódott, sem a fehérje ektodoménjét, sem specifikus bazális membrán ligandjait (laminin-5 és kollagén IV) nem tudtuk kimutatni a legtöbb melanomában. A hiányzó kollagén XVII közvetített matrix interakciók ellenére a fehérje reziduális doménje célzott immunkezelés hatására a melanoma sejtek proliferációját gátolta, apoptózis és adhéziós készségét pedig fokozta, ami a kollagén XII fehérje szerepét felveti nemcsak a specifikus matrix adhézióban, hanem extracelluláris szabályozó jelek közvetítésében is. A kollagén XVII fehérje kifejeződése melanomákban pozitív statisztikai összefüggést mutatott a sejtproliferációval (emelkedett Ki67, cyclinD1 ill. eltűnő p16^{ink4} pozitív sejtfrakciók), a daganatok vertikális növekedési fázisával, Breslow, ill. Clark szerinti terjedésével és az invazív daganatfronttal, melyek a melanoma progresszió ismert markerei. A HT199 erősen áttétképző melanoma sejtvonal ugyancsak konstitutív kollagén XVII kifejeződést mutatott, mind primer kultúrában, primer és áttéti xenograftokban és keringő daganatsejtekben, emelkedett fehérjeszintekkel az invazív daganatsejtekben az adherens sejtekhez képest. Eredményeink szerint a kollagén XVII fehérje reziduális doménjének felülregulált megjelenése alkalmas a malignus melanocytás elváltozások elkülönítésére a benignus naevusoktól. Míg aktivált melanocyták kollagén XVII közvetített bazális membrán kapcsolatra képesek, ennek elvesztése melanomákban, feltehetően hozzájárul a melanoma kifejlődéséhez. A kollagén XVII fehérje kifejeződését és feltételezett szerepét melanocytás léziókban a **11. ábra** foglalja össze vázlatosan.

A kollagén XVII NC16A régiója (aa490-567) kulcsszerepet játszik a fehérje ismert funkcióiban, így az $\alpha 6$ -integrinnel való kapcsolatában, a tripla hélix kialakításában és metalloproteázok célpontjaként (aa528-547 régió) a 120 kDa ektodomén leválásának a helye. A fehérje immunodomináns régióját, (aa507-520), mely ugyancsak itt található és átfed klónjaink (9G2 és 6D1) specificitásával (aa507-529), CD4+ memória T sejtek és immunglobulinok ismerik fel és támadják bullosus pemphigoidban (BP). A memória T sejtek kevert Th1/Th2 cytokineket, köztük interferon α -át és γ -át termelnek, melyek melanoma ellenes hatása közismert. E megfigyelések és a melanomák kollagén XVII termelése miatt feltételezhető BP-ben az autoimmun válasz protektív hatása melanoma kialakulásával szemben. Valóban az irodalomban nincs közlés melanoma és



11. ábra. Kollagén XVII expresszió melanocytás léziókban és feltételezett kapcsolata a melanomák kialakulásával. Piros sejtmag = proliferáció; narancs és piros cytoplazma = kollagén XVII pozitívitás

BP együttes előfordulásáról. Egy tanulmány pl. több mint 1100 BP eset daganatos asszociációt vizsgálva nem talált melanómát, holott a normál populációban közismert az 1/70-150 melanoma előfordulási gyakoriság. Naevus és BP együttes előfordulásáról is csak egy esetet közölnek, ahol azonban a melanómát imitáló súlyosan dysplasticus naevus spontán regressziójáról számolnak be. Továbbá, BP-s betegektől származó kollagén XVII specifikus antitesttel történő kezelés keratinocytákban aktiválja a foszfolipáz C (PLC) szignálat, emelkedett intracelluláris Ca^{2+} szintet kiváltva, amely szignál melanómákban PLC inhibitor függő apoptózist indukál. Ezek a megfigyelések és a kollagén XVII gyakori előfordulása melanómában felveti a fehérje szerepét a melanoma transzformációban és egy potenciális immunterápia relevanciáját. Az utóbbira tervezett HT199 xenograft modellkísérlet folyamatban van.

A kollagén XVII konstitutív kifejeződése melanoma xenograftok primer és másodlagos daganataiban, emelkedett szintje a daganatok invazív vertikális frontján, az elszórt daganatfészkekben és egyedi daganatsejtekben, valamint a primer és másodlagos tenyészetek mobilis daganatsejtjeiben a letapadtakkal szemben, a kollagén XVII fehérje szerepére utal a melanoma invázió és agresszivitás kapcsán is.

Mivel a kollagén XVII fehérje keratinocytákban és laphámrákban is kifejeződik és előfordul központi idegrendszeri neuronokban és aktivált endothel sejtekben is, rutin immunmorfológiai kimutatása egy diagnosztikus panel részeként ajánlott.

Összefoglalva, a projekt során nyert eredményeink szerint a kollagén XVII fehérje reziduális doménje melanómákban a malignus transzformáció és a daganat invazivitás markere, mely orsósejtes melanómákban is kimutatható és segít a malignus melanocytás léziókat a benignusaktól elkülöníteni, még bizonytalan fenotípusú daganatok esetén is. A specifikus ligand interakciók hiánya, az ektodomén ill. laminin-5 és kollagén IV elvesztése miatt, valószínűleg szerepet játszik a hibás negatív „feedback” szabályozásban és a reziduális domén folyamatos termelésében. A reziduális domén az NC16A régió funkcionálisan fontos szakaszait még hordozza, így fontos extracelluláris szignálok közvetítésében vehet részt, rajta keresztül a melanoma sejtek növekedése célzottan gátolható. A kollagén XVII fehérje felülregulációjának pontos molekuláris mechanizmusa és kapcsolata egyéb a melanocytá és melanoma biológiában fontos szerepet játszó egyéb faktorokkal, így pl. az integrinokkal, további kutatásokat igényel.

A projekt során született előadások, közlemények:

1. Stelkovic E, **Krenács T**: Kollagén XVII expresszió melanocytás ill. nem-melanocytás bőrdaganatokban: a malignus transzformáció és tumor progresszió potenciális markere. (*legjobb fiatal előadó díja*). Magyar Patológusok Társasága 65. Kongresszusa Hajdúszoboszló, 2006. október 5-7.
2. Stelkovic E, Korom I, Marczinovits I, Molnar J, Rasky K, Raso E, Ficsor L, Molnar B, Kopper L, **Krenacs T**: Collagen XVII/BP180 protein expression in squamous cell carcinoma of the skin detected with novel monoclonal antibodies in archived tissues using tissue microarrays and digital microscopy. *Applied Immunohistochem Mol Morphol* 16:433-441, 2008.
3. **Krenács T**, Rásó E, Stelkovic É, Korom I, Plótár V, Orosz Zs, Ráski K, Tímár J: Kollagén XVII, egy hemidezmosomális adhéziós fehérje, fokozott expressziója malignus melanomában. Magyar Patológusok Társasága 66. Kongresszusa. Balatonfüred 2007. október 4-6.
4. **Krenacs T**, Stelkovic E, Raso E, Korom I, Marczinovits I, Kopper L, Timar J: Overexpression of the hemidesmosomal adhesion protein collagen XVII in malignant melanoma. *Virchows Archiv* 2007, 451:159, (abstract). 21st European Congress of Pathology, Istanbul, Turkey, September 9-12th 2007.
5. **Krenacs T**, Stelkovic E, Varga E, Korom I, Kiszner G, Plotar V, Orosz Zs, Timar J, Raso E: Collagen XVII expression differentiates malignant melanomas from atypical nevi and it is a target of immunotherapy in cultured melanoma cells. *Histopathol* 2008, 53 Suppl.1. 394. (abstract) 27th International Congress of IAP, Athens, Greece, October 12-17th, 2008.
6. **Krenacs T**, Szekeres Gy, Battyani Z: Diagnostic immunomorphology of malignant melanoma (V 1.3). e-Books, www.pathonet.com
7. **Krenacs T**, Kiszner G, Stelkovic E, Korom I, Varga E, Plotar V, Orosz Zs, Timar J, Raso E. Malignant melanomas can be differentiated from atypical nevi by collagen XVII expression, which can be a target of immunotherapy. *Virch Arch* 455 (Suppl 1):S11, 2009. European Congress of Pathology, Florence, Italy, September 4-9th. 2009.
8. **Krenacs T**, Kiszner G, Stelkovic E, Nemeth I, Varga E, Korom I, Zsakovics I, Barbai T, Marczinovits I; Molnar J, Rasky K, Plotar V, Timar J, Raso E. Collagen XVII protein expression can differentiate cutaneous malignant melanomas from benign nevi and mediate antibody induced apoptosis of melanoma cells. *Am J Pathol* (*közlésre elküldve*) **IF: 5.917**
9. Virich G, **Krenacs T**, Moir G, Ragoowansi R, Becker D, Thrasivoulou C: Diagnostic assessment of malignant melanoma using non-linear second harmonic generation imaging. *Melanoma Research* 2007, 17:23. Abstract, 6th International Conference on the Adjuvant Therapy of Malignant Melanoma, Stockholm, Sweden, 15-17 June 2006.
10. Thrasivoulou C, Virich G, **Krenacs T**, Korom I, Becker DL. Non-invasive second harmonic diagnostic imaging of human skin cancers. *Br J Dermatol* 2010 (*közlésre elfogadva, nyomdában*) **IF: 3.489**