

*MÁV Kórház és Központi Rendelőintézet Budapest  
Bőrgyógyászati Osztály és Bőr-, Nemibeteg gondozó Szakrendelő  
(osztályvezető: Dr. Farkas Beatrix egyetemi tanár)*

## **Hősokk fehérje (Hsp70) / melanoma-marker (Mel-5) sejtfelszíni antigén expressziós mintázat prognosztikai jelentősége cutan melanoma malignumban\***

### **Prognostic significance of heat shock protein 70 (Hsp70) / melanoma-associated marker (Mel-5) cell surface antigen expression pattern in cutan malignant melanoma**

FARKAS BEATRIX DR.

#### **ÖSSZEFOGLALÁS**

Cutan melanoma malignumból származó melanoma sejteken, valamint egészséges egyének sejtjein a membrán Hsp70 és a melanoma marker Mel-1, Mel-2 és Mel-5 antigének sejtfelszíni kifejeződésének vizsgálatával fenotípus meghatározás történt. A korábbi megfigyeléseknek megfelelően az egészséges egyének sejtjei membrán Hsp70-t nem expresszáltak. Melanoma markerekre a bőr fibroblasztok és perifériás limfociták negatív festődést mutattak, ugyanakkor a melanociták Mel-1 és Mel-5 sejtfelszíni antigénnel rendelkeztek. A Hsp70/Mel-5 sejtfelszíni antigén expressziós mintázat alapján a primer cutan melanomákat Hsp70(+)/Mel-5(-) illetve Hsp70(-)/Mel-5(+) fenotípusú csoportba lehetett sorolni. A két csoportba sorolt betegek kórlefolyását 4 évig követték. A Hsp70(-)/Mel-5(+) fenotípusú csoportba tartozó betegek (39%) prognózisa szignifikánsan ( $p < 0.05$ ) rosszabbnak bizonyult, mint a Hsp70(+)/Mel-5(-) csoportba tartozóké (túlélés: 22,2% vs 100%). A Hsp70/Mel-5 sejtfelszíni antigén expressziós mintázat prognosztikai jelentősége cutan melanomában összefüggésbe hozható a membránhoz kötött hősokk fehérje 70 kifejezett tumor-ellenes funkciójával.

#### **Kulcsszavak:**

**melanoma malignum - membránhoz kötött hősokk fehérje (Hsp) 70 - melanoma marker Mel-5 - prognosztikai jelentőség**

#### **SUMMARY**

Expression of membrane-bound Hsp70 and melanoma-associated markers (Mel-1, Mel-2 and Mel-5) was studied in melanoma cells from primary cutan malignant melanoma and in healthy human cells to determine their phenotype. As previously shown, cells from healthy human volunteers were found to be negative for membrane-bound Hsp70. Skin fibroblasts and peripheral blood lymphocytes were also negative for the melanoma-associated markers but melanocytes were positive for Mel-1 and Mel-5. The primary cutan melanomas could be divided into two groups according to their Hsp70/Mel-5 expression pattern: those with an Hsp70(-)/Mel-5(+) phenotype and an Hsp70(+)/Mel-5(-) phenotype. Groups of patients with a divergent Hsp70/Mel-5 membrane expression pattern of their primary melanoma were followed for 4 year by the known clinical and histological prognostic parameters. Patients in the group of Hsp70(-)/Mel-5(+) phenotype (39%) proved to be associated with a significant ( $p < 0.05$ ) graver prognosis comparing that observed in the group of Hsp70(+)/Mel-5(-) (overall survival: 22,2% vs 100%). The observed prognostic significance of Hsp70/Mel-5 expression pattern in cutan melanoma may be correlated to the potent anti-cancer function of membrane-bound heat shock protein 70.

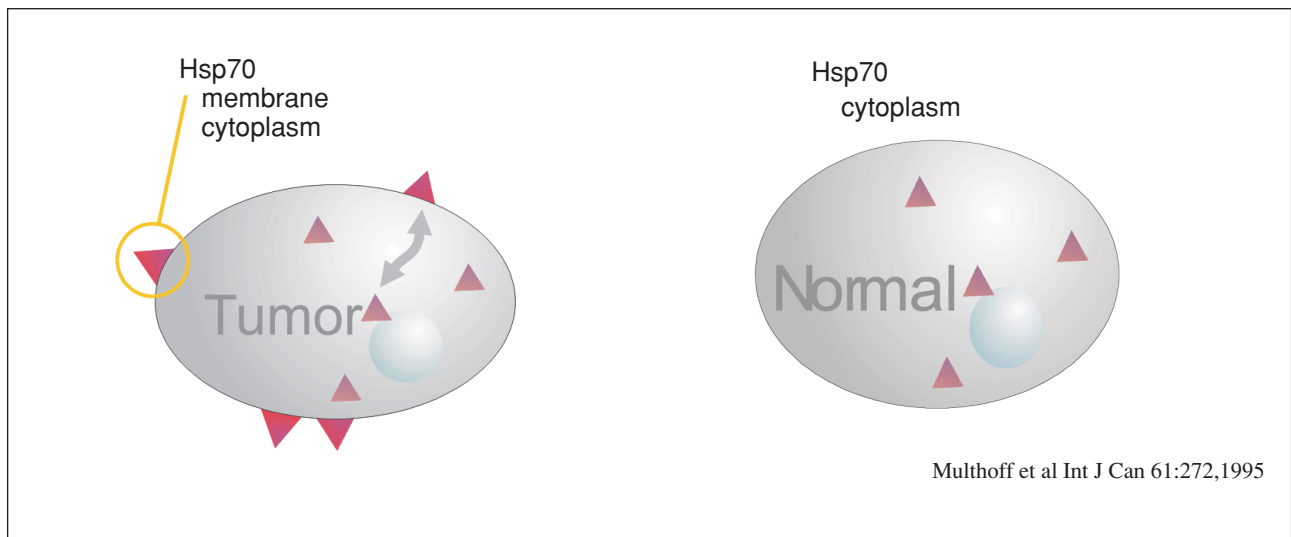
#### **Key words:**

**malignant melanoma - membrane-bound heat shock protein (Hsp) 70 - melanoma-associated marker Mel-5 - prognostic significance**

A sejt különböző alkotórészeiben megtalálható, konstitutív módon expresszálódó és indukálható, chaperon (dajka) funkcióval rendelkező hősokk fehérjék (HSP-k) legfőbb

feladata a sejtek védelme a különböző exogén és endogén behatások által okozott letális károsodástól (12). Az intracelluláris chaperonok részt vesznek polipeptidek korrekt szerveződésében, fehérjestruktúrák funkcióképessé tételében, transzportjában, valamint az antigén lebontásban és prezentálásban (9,10). A tumorszelektív antigének utáni

\* Dr. Simon Miklós emeritus professzor 90. születésnapjára írt közlemény



1. ábra

A Hsp70 hőszokk fehérje expressziója egészséges- és tumorsejteken

kutatás HSP-k (70 kD, 90 kD) azonosítását eredményezte (21). A Hsp70 sejtfelszíni kifejeződését számos malignus tumor (pl.: colorectalis, pancreas, tüdő carcinoma, leukemiák, stb.) sejtjein megfigyelték, ugyanakkor az egészséges sejtek plazmamembránjukon Hsp70 expressziót nem mutattak (1. ábra) (16). Ezen ismeretek birtokában a sejtfelszínen expresszálódó hőszokk fehérjéknek tumor-szektív marker szerepet tulajdonítottak (17). Ma már tudjuk, hogy az extracelluláris lokalizációjú, vagy membránhoz kötött HSP-k kifejezett anti-tumor immunválaszt fejtenek ki a veleszületett vagy szerzett immunmechanizmusok közvetítésével. Kimutatták, hogy a HSP-k chaperon funkciójuk révén kulcsszerepet játszanak az antigén prezentáló sejtek (APC), T-sejtek és természetes ölő (NK) sejtek által mediált tumorimmunitásban (15, 20, 21). Bebizonyosodott, hogy a sejtfelszíni membránhoz kötött HSP70 tumorspecifikus felismerő hely az NK-sejtek számára, valamint direkt módon aktiválni képes az NK-sejtek citolitikus és migrációs kapacitását (15). A hőszokk fehérje sejtfelszíni membrán expressziójával kapcsolatos kutatási eredmények különösen az oncoimmunologia területén okoztak jelentős változásokat (19).

A membrán HSP-k tumorimmunitásban betöltött szerepével kapcsolatos új megfigyelések birtokában érdemesnek tűnt melanoma malignumban szenvedő betegeknél meghatározni a primer tumor sejtfelszíni antigén expressziós mintázatát, és ennek ismeretében a körlefolyás követésével vizsgálni a HSP-fenotípus prognosztikai jelentőségét.

Munkánk során első lépésként cutan melanoma malignumból származó melanoma sejteken, valamint egészséges egyének melanin pigmentet tartalmazó (melanocita) és pigment mentes sejtjein (fibroblaszt, perifériás limfocita) multiparaméteres analízissel vizsgáltuk a sejtfelszíni antigén expressziós mintázatot. A HSP70 és a melanoma marker Mel-1, Mel-2 és Mel-5 antigének sejtfelszíni kifejeződésének meghatározása során arra a konzekvensen je-

lentkező tulajdonságra lettünk figyelmesek, hogy a HSP70 pozitív melanoma sejtek Mel-5 melanoma markert nem expresszálnak, ugyanakkor a sejtfelszíni HSP70 expressziót nem mutató melanomák tumorsejtjei membránjukon Mel-5 antigént hordoznak. A továbbiakban a tumor HSP70/Mel-5 fenotípusa és a betegség lefolyása közötti összefüggés vizsgálatával kívántuk meghatározni sejtfelszíni antigén expressziós mintázat prognosztikai marker szerepét és jelentőségét. Ezért a primer tumor HSP70/Mel-5 sejtfelszíni antigén expressziós mintázata alapján a melanoma malignumban szenvedő betegeket HSP70(+)/Mel-5(-) illetve HSP70(-)/Mel-5(+) fenotípusú melanomával rendelkezők csoportjába soroltuk, és 4 éven át követtük a betegség lefolyását.

## Anyag és módszer

### Sejtszeparálás és tenyésztés

A melanoma sejteket melanoma malignumban szenvedő betegek sebészileg eltávolított primer cutan tumorából szeparáltuk és tenyésztettük (5). Flow cytometriás analízishez a tumorsejt tenyészetek 2.-3. szubkulturáját használtuk. Az élő sejtek aránya > 90% volt [MTT-kolorimetriás teszt, (14)]. A nem-melanoma sejtek előfordulását áramlási citometriával, panleukocita marker antihuman-CD45 monoklonális antitest (mAT) (Dako), valamint ASO2 antifibroblast mAT (Dianova) alkalmazásával vizsgáltuk. (5).

A kontrollként egészséges humán melanocita (Colo 800, Acc 193) és bőr fibroblaszt sejtvonalak (DKFZ, Heidelberg), valamint alvadáságotól vérből denzitometriás gradiens centrifugálással szeparált perifériás limfociták (PBL) szolgáltak (5). A sejteket ugyanazon körülmények között tenyésztettük, mint a melanoma sejteket. A vizsgálatok végzéséhez a PTE ÁOK Régióális Etikai Bizottsága engedélyével, valamint beteginformációs és beleegyező nyilatkozattal rendelkezünk.

### Sejtfelszíni markerek (Hsp70, ASO2, MHC-I, Mel-antigének) áramlási citometriás analízise

A frissen szeparált humán sejtekből, vagy sejttenyészetekből nyert sejtszuspenziókat ( $1 \times 10^5$  sejt/vizsgáló minta) használtuk áramlási citometriás vizsgálathoz. A sejtfelszíni markerek meghatározására a sejteket fluoreszcein-izotiocionáttal (FITC) jelölt, vagy jelöletlen primer mAT-vel inkubáltuk. A jelöletlen első antitestekhez FITC-jelzett második antitestet (anti-egér mAT) adtunk. A követke-

## Eredmények

zõ antitesteket (és az izotípusnak megfelelő kontroll antitesteket) használtuk: anti-Hsp70-FITC mAT (klón C92F3B1, IgG1), anti-MHC-I-FITC mAT (W6/32, IgG2a) (Cymbus), anti-fibroblaszt mAT (ASO2, IgG1) (Dianova), anti-MAA antitestek: Mel-1 (Mel-1, IgG3), Mel-2 (Mel-2, IgG2a) és Mel-5 (Mel-5, IgG2a) (Signet). Az aspecifikus háttérfestődés megállapítására a fent említett, az izotípusnak megfelelő kontroll antitesteket (Immunotech) használtuk. Az áramlási citometriás analízis (FACS-calibur, Becton Dickinson) során a propidium-jodid (Sigma) negatív, élő, intakt sejtmembránnal rendelkező sejteket értékeltük. A specifikusan festődő sejtek megoszlását (%) a következő módon határoztuk meg: pozitívan festődő sejtek - izotípusnak megfelelő kontroll antitesttel festődő sejtek száma / 100. Hsp70 pozitívnak tekintettük a tumort akkor, ha a melanoma sejtek >10%-a mutatott festődést, valamint az izotípusnak megfelelő, kontroll antitesttel kapott áramlási citometriás görbéhez képest a "peak" jobbra tolt volt (5).

### Hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok

A szövetmintákból paraffinos, 4 µm-es metszeteket készítettünk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a metszeteket 3-aminopropil-trietoxi-szilánnal (Sigma) fedett tárgylemezre szárítottuk. A tumor környezethez való viszonyát, szerkezetét és citológiai jellemzőit hematoxilín-eozinnal festett metszeteken fénymikroszkóppal vizsgáltuk (4). Meghatároztuk a Clark féle szintet, valamint a tumor vastagságát (Breslow szám) (4). A melanin tartalom kimutatására Fontana-Masson festést, a hemosziderin azonosítására pedig berlini-kék festést végeztünk (4). Rutinszerűen S100 és HMB-45 antigén expressziós vizsgálat, valamint a Ki-67 proliferációs marker kimutatás történt (4). Szükség szerint Melan-A ellenes antitestet használtuk a melanociter eredet bizonyítására (4). Amelanotikus, illetve anaplázias tumor esetén a teljes antitest panel segítségét vettük igénybe, amely az említettek mellett a következő antitestekből állt: nagy és kis molekulásúlyú citokeratin (AE1/AE3) ill. (MNF116), vimentin, p53 (DO-7) és CD31 (JC/70A), valamint CD68 (KP1) (Dako) antigén ellenes antitest (4). Az immunhisztokémiai reakcióhoz a 4 µm-es metszeteket deparaffinálás, hőkezelés és endogén peroxidáz gátlását követően használtuk (4). A metszeteket háttérgátlás (normál lószérummal) után az előzőekben felsorolt elsődleges antitestek megfelelő hígításaival inkubáltuk. Negatív kontrollként normál egér, ill. nyúl szérumot használtunk. Második antitestként biotinált, lóban termelt, egér és nyúl ellenes ellenanyagot alkalmaztunk, majd streptavidin-peroxidáz-komplex-szel inkubáltuk. A reagenseket (Vectastain Universal Elite ABC Kit, Vector) a gyári utasításnak megfelelően használtuk. Az enzimreakciót "EAC-Substrate-Chromogen"-nel (Dako) tettük láthatóvá. Háttérfestésként Mayer-féle hematoxilint (Merck) alkalmaztunk (4).

### Stádium meghatározás, betegkövetés

A klinikai vizsgálat, a primer tumor és adott esetben a szentinel (örszem)/regionális nyirokcsomó(k) szövettani vizsgálata, az előírt laboratóriumi és képalkotó vizsgálatok ("staging") elvégzése után történt meg a betegek megfelelő stádiumba történő besorolása a TNM rendszer (pT: primér tumor patológiai adatai, N: regionális nyirokcsomó státusz, M: távoli metasztázis) használatával (1, 3). Követés-kor, a kontrollvizsgálatok során talált eltérések, elvégzett műtétek, hisztológiai eredmények alapján a változások a betegek stádiumba sorolásában feltüntetésre kerültek.

### Humán egészséges sejtek sejtfelszíni Hsp70 és melanoma marker antigén expressziós mintázata

Egészséges egyének melanin pigmentet tartalmazó (melanocita) és pigment mentes sejtjein (fibroblaszt, perifériás limfocita) multiparaméteres analízissel meghatározott sejtfelszíni antigén expressziós mintázatot az 1. táblázatban tüntettük fel. A vizsgált csoportokban az áramlási citometriával meghatározott MHC-I-re pozitívan festődő sejtek közel 100%-os aránya a sejtfelszíni membrán intaktóságára utalt. HSP70 plazmamembrán expressziót az egészséges egyénektől származó sejteken nem lehetett megfigyelni. A perifériás limfociták és a bőr fibroblasztok a melanoma marker Mel-1, Mel-2 és Mel-5 antitesttel negatív festődést mutattak. A bőr melanociták Mel-1 és Mel-5 sejtfelszíni antigénnel rendelkeztek, de Hsp70 membrán expressziót nem mutattak.

### Melanoma sejtek sejtfelszíni Hsp70 és melanoma marker antigén expressziós mintázata

A vizsgált kilenc primer cutan melanoma sejtjeinek membrán antigén expressziós mintázatát a 2. táblázatban tüntettük fel. A melanoma sejteket tartalmazó mintákban az ASO2 antitesttel meghatározott fibroblaszt kontamináció egy eset kivételével (mel30) 10% alatt maradt. A primer melanoma malignumból származó melanoma sejtek kifejezett MHC-I, Mel-1 és Mel-2 antigén expressziót mutattak. A melanoma marker Mel-5 (melanin szintézissel kapcsolatos glikoprotein) sejtfelszíni expressziója a vizsgált tumorokban jelentős különbséget mutatott. A 9 cutan melanoma malignumból származó melanoma sejtek áramlási citometriás analízise során a négy Hsp70 membrán expressziót mutató beteg tumorsejtjei Mel-5 melanoma markert nem expresszáltak. Ugyanakkor a sejtfelszíni Hsp70 expressziót nem mutató melanomák tumorsejtjei membránjukon Mel-5 antigént hordoztak (5 eset). Ezáltal a tumorokat Hsp70/Mel-5 expressziójuk alapján két csoportba lehetett sorolni, úgymint a Hsp70(+)/Mel-5(-) fenotípusú melanoma sejtekkel rendelkező, illetve a Hsp70(-)/Mel-5(+) expressziós tulajdonságot mutató melanomákra.

Sejtípus	ASO2	MHC-I	HSP70	Mell	Mel-2	Mel-5	HSP70/ Mel-5
Pozitívan festődő sejtek							
PBL	2±1.1	98±3.5	5±3.5	2±3.0	5±1.7	5±2.3	- / -
fibrob.	87±4.8	96±2.7	3±2.0	4±1.4	4±1.8	3±1.9	- / -
mcita.	7±2.0	99±3.9	1±0.5	98±9.8	4±2.2	22±8.0	- / +
PBL: humán perifériás limfocita, fibrob.: bőr fibroblaszt, mcita.: melanocita (n=50), áramlási citometria, pozitívan festődő sejtek átlaga ± SEM							

1. táblázat

Hsp70 és melanoma marker antigének sejtfelszíni membrán expressziója humán egészséges sejtekben

Beteg-jelölés	ASO2	MHC-I	HSP70	Mel-1	Mel-2	Mel-5	HSP70/ Mel-5
% Pozitívan festődő sejtek							
mel12	1	97	27	21	98	2	+ / -
mel28	2	99	1	85	96	92	- / +
mel15	5	99	38	99	99	3	+ / -
mel19	2	99	7	95	88	84	- / +
mel25	nt.	98	2	92	66	69	- / +
mel26	8	98	30	93	53	1	+ / -
mel24	4	98	21	95	45	7	+ / -
me129	3	98	2	82	94	49	- / +
me130	54	98	8	96	41	30	- / +
Áramlási citometria, antitestek: anti-HSP70-FITC mAT, anti-MHC-IFITC mAT, anti-fibroblaszt mAT (ASO2), és anti-MM antitestek (Mel-1, Mel-2 és Mel-5)							

2. táblázat

Hsp70 és melanoma marker antigének sejtfelszíni membrán expressziója cután melanoma malignumból szeparált melanoma sejteken

**A primer cutan melanoma Hsp70/Mel-5 fenotípusának jelentősége az onkológiai paraméterek tükrében**

Vizsgálatunk során több mint 4 évig követtünk huszonhárom, melanoma malignumban szenvedő beteget, akiknél a

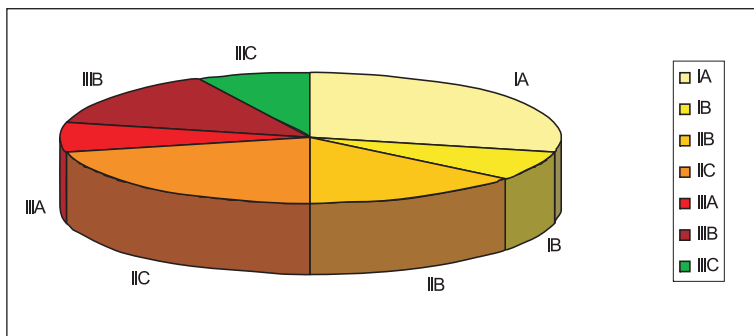
primer cutan melanoma sebészi eltávolítását követően megtörtént a tumorsejtek Hsp70/Mel-5 fenotípusának meghatározása. A 12 nő és 11 férfi beteg életkora 26 és 76 év közötti volt (3. táblázat). A primer tumor az esetek 60%-ában törzsi, 27%-ában pedig végtagi lokalizációt

mutatott (további lokalizációk: nyak, genitális régió). A betegeket melanómájuk fenotípusa alapján Hsp70(+)/Mel-5(-), a továbbiakban Hsp70(+), illetve Hsp70(-)/Mel-5(+), a továbbiakban Hsp70(-) csoportba soroltuk. Kiindulási állapotnak a primer melanoma malignum műtéti időpontjában észlelteket tekintettük. Ezen értékeket, valamint a követés során az utolsó kontrollvizsgálatkor észlelt paramétereket a 3. táblázatban foglaltuk össze. A két csoport között az átlagéletkorban jelentős különbséget nem észleltünk. A Hsp70(+) betegek között a női, míg a Hsp70(-) csoportban a férfi nem dominanciáját lehetett megfigyelni. Kiinduláskor a Hsp70(+) csoportba tartozó betegek 64%-a az IA-IIIC stádiumba nyert besorolást, IIIC feletti stádiumú beteg nem volt (2a. ábra). A Hsp70(-) tumor fenotípusú betegek besorolásuk során magasabb stádiumba (44% IIIC-IV) kerültek (2b. ábra). A primer tumorok szövettani jellemzőit a 3. táblázatban tüntettük fel. Az átlagos tumorvastagság a Hsp70-t nem expresszáló csoportban duplája volt a Hsp70(+) csoportban észlelteknél. A Hsp70(-) fenotípussal rendelkezőknél a tumorok 60% Clark III (többi Clark IV-V) inváziós szintet mutatott. A Hsp70(+)

PARAMÉTEREK	HSP70(+) mm (n=14)	HSP70(-) mm (n=9)	p
ÁTLAG ÉLETKOR (év)	59,6 (39-76)	56,6 (26-72)	> 0,5
FÉRFI (%) NEM NŐ (%)	35,7	66,7	< 0,5
TUMORVASTAGSÁG (mm)	4,2 (0,2-12)	9,7 (1,6-33)	< 0,5
SZUPERFIC. (%) TU. TÍPUSA NODULÁR. (%)	50,0	25,0	< 0,5
HORIZ. (%) NÖV. FÁZIS VERT. (%)	21,4	0	< 0,5
LIMFOCIT. INFILTR. + (%) SZENTINEL NYCS.+ (%)	78,5	11,1	< 0,5
KIINDULÁS REG. NYCS. + (%) NYCS. MET. (%)	0	28,7	< 0,5
KÖVETÉS MULT. BELSZ. M. (%)	35,7	22,2	< 0,5
KÖVETÉSI IDŐ (hó)	29,4 (9-49)	17,6 (1-34)	< 0,5
TU. MENTES (%) ÁLLAPOT EXITUS (%)	100	22,2	< 0,5
A melanoma malignumban (mm) szenvedő betegek demográfiai és onkológiai paraméterei a primer műtét időpontjában (kiindulási), valamint a követés során végzett utolsó kontrollvizsgálatkor észlelt értékeket mutatják.			

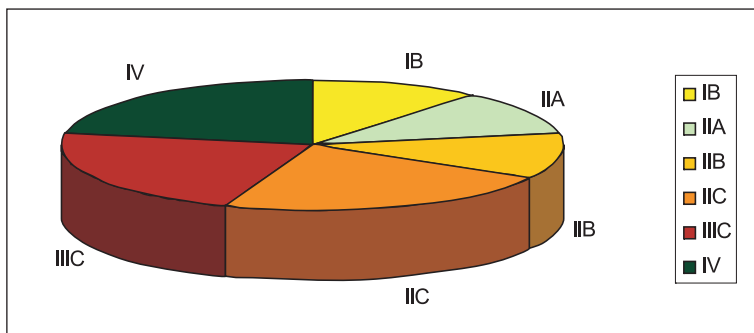
3. táblázat

Tumorszelektív Hsp70 sejtfelszíni membrán expresszió prognosztikai jelentősége melanoma malignumban



2a. ábra

Hsp70 (+)/Mel-5 (-) fenotípusú melanoma malignumban szenvedő betegek stádiumbeosztása



2b. ábra

Hsp70 (-)/Mel-5 (+) fenotípusú melanoma malignumban szenvedő betegek stádiumbeosztása

csoportban a tumorok 70% Clark II-III szintűnek bizonyult. A Hsp70(-) fenotípusba tartozók 75%-ának histológiailag noduláris típusú melanómája volt. A Hsp70-t nem expresszáló melanomák mindegyike vertikális növekedési fázist mutatott, és a tumor körüli limfocitás gyűrű többnyire hiányzott. Ezzel szemben a Hsp70(+) csoportban a limfocitás infiltrátum meglehetősen dominált és a tumorok 50% szuperficiális típusú volt.

A kiindulási állapotban a Hsp70(-) csoportban a betegek több mint 40%-a nyirokcsomó érintettséggel (N3) rendelkezett. A sejtfelszíni membránon Hsp70 expressziót nem mutató melanomás betegeink közel 80%-t a követés során kialakult multiplex metasztázisokkal elvesztettük. A Hsp70(-) csoportban a betegek 30%-nál a túlélés nem érte el a 9 hónapot. A Hsp70(+) fenotípusú betegeink közül a 4 éves követés során egy beteget sem veszítettünk el. A vizsgálat végén a Hsp70(+) csoportban a betegek tumor mentesnek bizonyultak. A Hsp70(-) csoportban ez az állítás az esetek 20%-ára vonatkozott (követés: 12, 29 hó).

## Megbeszélés

A 70 kD és 90 kD molekulatömegű HSP-k tumor szelektív plazmamembrán lokalizációjáról (colon, tüdő carcinoma, leukémiák, stb.) számos munkacsoport beszámolt (11, 15, 16, 17, 22). Tekintettel arra, hogy a bőrtumorokkal kapcsolatos ilyen irányú ismeretek nem álltak ren-

delkezésre, a legrosszabb indulatú bőrtumoron, a melanoma malignumon kezdtünk el vizsgálatokat végezni a tumor szelektív sejtfelszíni HSP-expresszió vonatkozásában. Kontrollként egészséges egyénektől származó, melanin pigmentet tartalmazó sejtek (melanociták) és pigmentet nem tartalmazó sejtek (perifériás limfociták, bőr fibroblasztok) sejtfelszíni Hsp70 és melanoma marker (Mel-1, Mel-2, Mel-5) antigén expresszióját határoztuk meg. Azt találtuk, hogy az egészséges egyének limfocitái és bőr fibroblasztjai sem melanoma marker antigén, sem Hsp70 sejtfelszíni expressziót nem mutattak. A bőr melanociták Mel-1, Mel-5 antigén pozitív, Hsp70 negatív fenotípussal rendelkeztek. Eredményeink az egészséges egyénektől származó melanin pigmenttel rendelkező, és pigmentet nem tartalmazó sejtek vonatkozásában megfeleltek azon korábbi megállapításoknak, hogy az egészséges sejtek Hsp70 membránexpressziót nem mutatnak (16).

Primer cutan melanoma malignumból szeparált és tenyésztett melanoma sejtek kifejezett MHC-I, Mel-1 és Mel-2 antigén expressziót mutattak. Ugyanakkor a Hsp70 sejtfelszíni membrán expresszióval rendelkező tumorok mindegyike Mel-5 melanoma markerrel negatív volt, valamint a Mel-5 pozitív melanoma sejtek Hsp70 expressziót nem mutattak. A sejtfelszíni antigén kifejeződés alapján a tumorokat két csoportra lehetett osztani: Hsp70(+)/ Mel-5(-), illetve Hsp70(-)/Mel-5(+). A frissen szeparált és tenyésztett melanoma sejtek áramlási citometriás analízisével kapott eredmények megegyeztek. A melanomában megfigyelt fenotípus eltérések a membrán Hsp70 expresszió vonatkozásában megegyeztek az egyéb malignómában észleltekkkel, vagyis a primer tumorok egy része Hsp70(+) volt (7,11, 7).

Az általunk megfigyelt, a tumorimmunitásban kulcsszerepet betöltő új marker tulajdonság (Hsp/Mel-5) jelentőségét cutan melanomában szenvedő betegek hosszútávú követésével vizsgáltuk. Betegeinknél megfigyelt membrán Hsp70(+) fenotípusú primer cutan melanoma előfordulási aránya (61%) nagyságrendileg megegyezett a fej-nyak spinocelluláris carcinomáiban (73%) ill. acut myeloid leukemiában (62-80%) észleltekkkel (7, 11).

A primer cutan melanoma műtét időpontjában nyert, prognosztikai szempontból fontosnak tartott paraméterek (3. táblázat) alapján, a dominálón háti lokalizációjú, exulcerált, vastag, vertikális növekedési fázist mutató tumorokkal (T3b-4b) rendelkező, magas stádium besorolású (2b. ábra) férfi betegek a melanoma fenotípusa szerint a Hsp70(-)/Mel-5(+) csoportba tartoztak. Halmozott tumorrelőfordulást (melanoma duplex, majd triplex) szintén e csoportban észleltünk. A prognosztikailag kedvezőbb paraméterekkel rendelkező betegek primer melanoma fenotípusa Hsp70(+)/Mel-5(-) volt. Vizsgálat lezárásáig a tünet

mentes túlélés a HSP70(+)/Mel-5(-) fenotípusú betegek között átlagosan  $29,4 \pm 8,4$  hónap volt (3. táblázat). Ezzel szemben a HSP70(-)/Mel-5(+) fenotípusú melanomás csoportban a túlélés  $17,6 \pm 4,7$  hónapnak bizonyult. A HSP70(-)/Mel-5(+) csoport tagjainak közel 80%-t a primer melanoma műtétet követő 1-34 hónappal multiplex melanoma metasztázisok miatt elvesztettük (3. táblázat).

Eredményeink arra utalnak, hogy a primer cutan melanomában az általunk megfigyelt HSP70/Mel-5 sejtfelszíni antigén profil a betegség lefolyásával jól korrelált. Az új marker már a primer melanoma malignum műtéti eltávolítása után közvetlenül információval szolgálhat a melanoma malignumban szenvedő betegek várható prognózisára. A Hsp70(+)/Mel-5(-) fenotípusú melanomák esetén észlelt kedvezőbb prognózis magyarázatául a membrán Hsp70 tumorimmunitásban betöltött pozitív szerepe szolgál. A membrán Hsp70 immunogén peptidek hordozó (carrier) molekulájaként specifikus T-sejt mediálta immunválaszt indukál, valamint „target”-ként szerepel az NK-sejtek számára (Hsp70-NK-sejt-citolízis) (7, 8, 11, 15, 19, 20, 22, 23). Ezen adatok arra utaltak, hogy az extracelluláris, membránhoz kötött Hsp70-t expresszáló tumorsejtek kedvező célpontok a citolitikus folyamatok számára (2, 15, 16). Ennek bizonyítékául szolgál, hogy a Hsp70 membrán-pozitív tumorsejteket az alacsony dózisu IL-2-vel és a Hsp70-peptid TKD-vel előkezelt NK-sejtek *in vitro* elpusztították (18). *In vivo*, tumoros egerekben a TKD-vel stimulált NK-sejtekkel hasonló eredményt észleltek (13). Napjainkban ezen ismeretek alapján már NK-sejt alapú immunterápiát alkalmaznak *ex vivo* TKD/alacsony dózisu IL-2 aktivált autológ NK-sejtekkel colon- és tüdő carcinomában (6). Munkacsoportunk együttműködés keretében autológ NK-sejtek 14-mer-Hsp70-peptid-derivátum általi stimulációjával végez vizsgálatokat melanoma metasztázisban.

A primer cutan melanomán általunk megfigyelt Hsp70/Mel-5 antigén expressziós mintázat, egyrészt új markerként, már a tumor műtéti eltávolítása után közvetlenül információval szolgálhat a melanoma malignumban szenvedő betegek várható prognózisára, és ennek megfelelően hozzájárulhat az adekvát terápiai és követési terv felállításához. Másrészt a Hsp70-peptid aktivált NK-sejtre alapuló immunterápia része lehet e rendkívül rosszindulatú tumor hatékony gyógykezelésének.

## IRODALOM

- Balch C. M., Soong S. J., Atkins M. B., et al.: A bőr melanomáinak bizonyítékokon alapuló osztályozási rendszere. CA Cancer J. Clin. (magyar kiadás) (2004) 54, 131-149.
- Botzler C., Issels R., Multhoff G.: Heat shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells in association with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. Cancer Immunol Immunother. (1996) 43, 226-230.
- Buzaid A. C., Balch C. M.: Proposed change of TNM classification. Melanoma Res. (2001) 11, (Suppl 1.) 4-5.
- Farkas B.: Citoprotektív útvonalak szabályozása bőrgyógyászati betegségekben. MTA doktori értekezés (2003)
- Farkas B., Hantschel M., Magyarlaci M. et al.: Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma. Melanoma Res. (2003) 13, 147-152.
- Gastpar R., Andreesen S. W., Gross C. et al.: Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat-shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. Clin Cancer Res. (2004) 10, 3699-3707.
- Gehrmann M., Schmetzer H., Eissner G. et al.: Membrane-bound heat shock protein 70 in acute myeloid leukemia: a tumor-specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous natural killer cells. J Hematol. (2003) 88, 473-475
- Gross C., Hansch D., Gastpar R. et al.: Interaction of heat-shock protein 70-peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. Biol Chem. (2003) 384, 267-279.
- Hartl F. U.: Molecular chaperons in cellular protein folding. Nature. (1996) 381, 571-579.
- Hartl F. U., Hayer-Hartl M.: Molecular chaperons in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science. (2002) 295, 1852-1858.
- Kleinjung T., Arndt O., Feldmann H. J. et al.: Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy - a target for natural killer (NK) cells. Int J Radiation Oncology Biol Phys. (2003) 57, 820-826.
- Lindquist S., Craig E. A.: The heat shock proteins. Annu Rev Genet. (1988) 22, 631-677.
- Moser C., Schmidbauer C., Gurtler U. et al.: Inhibition of tumor growth in mice with severe combined immunodeficiency is mediated by heat-shock protein 70 (Hsp70)-peptide-activated CD94 positive natural killer cells. Cell Stress Chaperones. (2002) 7, 365-373).
- Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. (1983) 65, 55-63.
- Multhoff G., Botzler C., Jennen L., et al.: Heat-shock protein 72 on tumor cells - recognition structure for natural killer cells. J. Immunol. (1997) 158, 4341-4350.
- Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M. et al.: A stress-inducible 72kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. Int J Cancer. (1995) 61, 272-279.
- Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M. et al.: CD3-large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72kD heat-shock protein on human sarcoma cells. Blood. (1995) 86, 1374-1382.
- Multhoff G., Mizzen L., Winchester C. C. et al.: Heat-shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. Exp Hematol. (1999) 27, 1627-1636
- Radons J., Multhoff G.: Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. J Immunol. (2006) in press.
- Schild H.-J., Arnold-Schild A., Lammert E. et al.: Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. Curr Opin Immunol. (1999) 11, 109-114.
- Srivastava P. K.: Heat shock protein 70 - associated peptides elicit specific cancer immunity. J Exp Med. (1993) 178, 1391-1396.
- Tao QX., Yu H., Zhang L. et al: Tumor cell membrane-bound heat shock protein 70 elicits antitumor immunity. Immunol Lett. (2002) 84, 81-87.
- Wells A. D., Malkovsky D.: Heat shock proteins, tumor immunogenicity, and antigen presentation: an integrated view. Immunol Today. (2000) 21, 129-132.