



Metastaserende en niet-metastaserende dikke melanomen: clinicopathologische predictors en moleculaire profilering

C. Güvenç¹, A. Antoranz², A. Szumera-Cieckiewicz^{3,4}, P.P. Teterycz⁵, P.R. Rutkowski⁵, R.V. Rawson^{6,7,8,9}, R.A. Scolyer^{6,7,8,9,10}, J.F. Thompson^{6,7,11}, J. Newton-Bishop¹², M. Stas¹³, V. Boecxstaens¹³, O. Bechter¹⁴, J. Vercauteren¹⁵, M. Garmyn¹, J. van den Oord², F.M. Bosisio²

Cutaan melanoom (CM) is de meest agressieve vorm van huidkanker en is verantwoordelijk voor 80% van alle sterfgevallen door huidkanker. [1]. De krachtigste prognostische marker in CM is de dikte, gemeten volgens Breslow, die positief correleert met het risico op uitzaaiing. [2]. Toch slaagt deze marker er niet in om de prognose te stratificeren bij patiënten met een hoge Breslow die niet metastaseert. Er is weinig bekend over meer specifieke klinische, pathologische en moleculaire predictoren van outcome in deze groep van patiënten, maar men neemt aan dat de oorzakelijke factor(en) in de melanoomcellen liggen. Onderzoek hiernaar is belangrijk omdat betere kennis van deze subgroep niet alleen leidt tot een betere stratificatie van patiënten m.b.t. prognose en therapie, maar ook dieper inzicht kan geven in de kritische klinische en moleculaire gebeurtenissen die tot metastase leiden. [3]

ACHTERGROND

Cutaan melanoom is de meest agressieve vorm van huidkanker, waarvan de wereldwijde incidentie snel toeneemt. Vroege stadia kunnen met succes worden behandeld door chirurgie, maar zodra metastasering is opgetreden, is de prognose infaust. De prognose van CM kan worden voorspeld op basis van het stadium van de patiënt en hangt af van een aantal klinisch-pathologische parameters, waaronder Breslowdikte (uitgedrukt in mm), ulceratie, mitose, leeftijd, geslacht, subtype en locatie van het primaire melanoom. Breslowdikte van het primaire melanoom is veruit de meest significante prognostische variabele. Echter, 5-10% van de dikke (≥ 2 mm) melanomen hebben een uitstekend prognose. Er is weinig

bekend over welke factoren bijdragen tot metastasering bij sommige patiënten met dikke melanomen, of omgekeerd welke factoren een rol spelen bij patiënten met dikke melanomen die nooit metastatische ziekte ontwikkelen. Bijgevolg is er enerzijds nood aan biomarkers die de huidige prognostische beoordeling voor deze patiënten kunnen verbeteren. Anderzijds kan onderzoek naar de biologie van dikke melanomen met een goede afloop, licht werpen op belangrijke processen die tumorprogressie en metastasering aansturen. Tumorprogressie en metastasering kunnen het gevolg zijn van veranderingen in de expressie van eiwitten die tumorgroei, invasie en migratie bevorderen, zoals, bijvoorbeeld, de expressie van het vasoactieve peptide Endotheline-1 of van

¹ Department of Dermatology, University Hospitals Leuven, 3000 Leuven, Belgium

² Department of Imaging and Pathology, Translational Cell and Tissue Research, University Hospitals Leuven, 3000 Leuven, Belgium

³ Department of Pathology and Laboratory Medicine, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, 02-781 Warsaw, Poland

⁴ Diagnostic Hematology Department, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, 02-776 Warsaw, Poland

⁵ Department of Soft Tissue/Bone Sarcoma and Melanoma, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, 02-781 Warsaw, Poland

⁶ Melanoma Institute Australia, The University of Sydney, Sydney, NSW 2000, Australia

⁷ Faculty of Medicine and Health, Sydney Medical School, The University of Sydney, Sydney, NSW 2000, Australia

⁸ Tissue Pathology and Diagnostic Oncology, Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, NSW 2000, Australia.

⁹ NSW Health Pathology, Sydney, NSW 2000, Australia

¹⁰ Charles Perkins Centre, The University of Sydney, Sydney, NSW 2000, Australia

¹¹ Department of Melanoma and Surgical Oncology, Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, NSW 2000, Australia

¹² Institute of Medical Research at St James's, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK

¹³ Department of Surgical Oncology, University Hospitals Leuven, 3000 Leuven, Belgium

¹⁴ Department of General Medical Oncology, University Hospitals Leuven, 3000 Leuven, Belgium

¹⁵ Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, Rega Institute for Medical Research, Clinical and Epidemiological Virology, Katholieke Universiteit Leuven, 3000 Leuven, Belgium

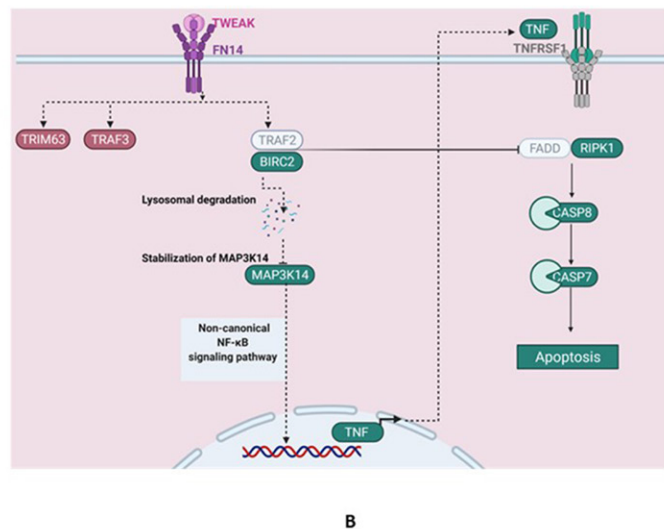
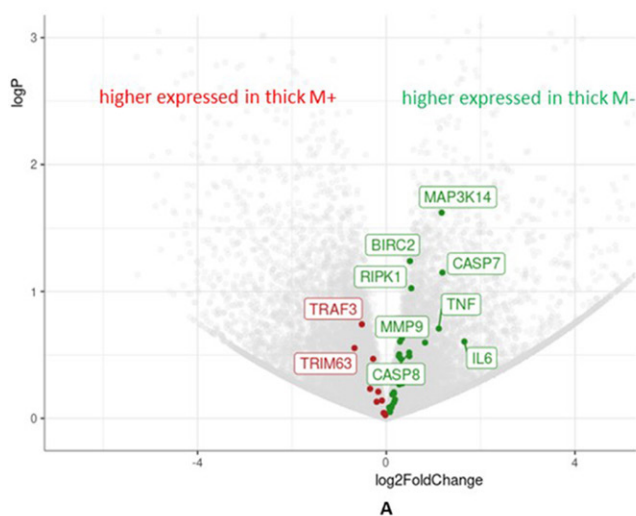
matrix metalloproteïnase 9 (MMP-9) door de CM-cellen. [4] Verscheidene signaaltransductieroutes zijn geïdentificeerd als belangrijke regulatoren in de progressie van CM, zoals de activering van de Ras/MAPK signaalroute door de gemuteerde BRAF of NRAS genen of wijzigingen in CCND1. Daarnaast zijn de PI3K/AKT/mTOR signaalroutes (bijvoorbeeld PTEN-verlies van functie), celcyclus regulatoren (bijv. CDKN2a, CDK4, CCND1), P53 (bijv. Tp53, MDM2), en signaalroutes betrokken bij epigenetische regulatie (bijv. ARID2a) vaak aangetast. [5]. Hoewel vele studies de rol van specifieke genen/eiwitten betrokken bij de verspreiding van CM hebben onderzocht, werd het metastaseringsproces zelf nooit bestudeerd vanuit een globaal, unbiased perspectief door middel van een bulk sequencing van het transcriptoom in plaats van zich te concentreren op de analyse van specifieke pathways. Bovendien hebben eerdere studies van genexpressie profielen (GEP) in CM geen groepen patiënten vergeleken die gematcht zijn voor alle andere prognostische kenmerken die een rol kunnen spelen bij het beïnvloeden van het metastatisch potentieel. Meer bepaald, de moleculaire verschillen die aan de basis liggen van het verschillend klinisch gedrag tussen dikke niet-metastaserende en dikke metastaserende melanomen zijn nog niet volledig opgehelderd. In het kort beoogde deze studie dus de onderliggende moleculair-genetische mechanismen te bestuderen die kunnen verklaren waarom een subset van dikke melanomen NIET metastaseert. Dit project omvatte zowel een retrospectieve analyse van klinisch-pathologische gegevens op reeds bestaande cohorten, als een moleculair-genetische studie op zowel retrospectieve databases als op een nieuwe reeks.

WAT HEBBEN WE JUIST ONDERZOCHT?

Eerst onderzochten we de bruikbaarheid van klassieke prognostische parameters in dikke melanomen om patiënten uit deze groep beter te kunnen stratificeren voor prognose en behandeling. Vervolgens hebben we voor het eerst de genexpressie profielen van dikke primaire melanomen die niet metastaseren vergeleken met een gematchte groep van dikke primaire melanomen die wel metastaseren, met als doel een gen signatuur te identificeren die geassocieerd is met niet-metastaserende melanomen.

RESULTATEN

In de afgelopen twee jaar hebben we de klinische, pathologische en moleculaire verschillen tussen niet-metastaserende en metastaserende dikke melanomen onderzocht om elementen te vinden die zouden kunnen helpen hun verschillende klinische gedrag te verklaren en inzicht te krijgen in mechanismen van metastasering in CM. Een retrospectieve analyse van de clinicopathologische gegevens van een Leuvense patiëntencohort (n=140) en follow-up van 5 jaar toonde aan dat de outcome van deze patiënten niet gecorreleerd was met één van de gekende klinische of histologische parameters. [6] Ook in de validatie database van Leeds vonden we gelijkaardige resultaten (n=141). Dit suggereert dat vanaf een bepaalde Breslowdikte, andere factoren binnen het melanoom de outcome voorspellen en dat we ons moeten verdiepen in moleculaire prognostische markers met behulp van RNA sequencing. Op basis van deze initiële data hebben we een internationaal consortium opgericht, met cohorten van patiënten uit België, Australië en Polen, via de EORTC-groep melanoomgroep, om het aantal patiënten te verhogen dat nodig is voor geavan-



Figuur 1. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) Pathway in dikke melanoma.

(A): Volcano Plot voor differentiële genexpressie: rode vakjes zijn genen met hogere expressie in metastaserende dikke melanomen (links), en groene vakjes zijn genen met hogere expressie in niet-metastaserende dikke melanomen (rechts).

(B): Apoptose module van de TWEAK pathway (Gemaakt met Biorender): Genen overgeëxprimeerd in niet-metastaserende dikke melanomen (groen) en genen overgeëxprimeerd in metastaserende dikke melanomen (rood), TWEAK/Fn14 interactie kan de degradatie van cIAPs in gang zetten en vervolgens apoptotische processen versterken via TNFR1(8, 9). De figuur 1B werd aangepast van Bhattacharjee et al. Gemaakt met Biorender.

ceerde moleculaire en next generation pathologie-analyse en om de resultaten van de moleculaire analyse te valideren. In samenwerking met het Melanoma Institute in Australië en het Maria Skłodowska-Curie Institute of Oncology in Polen voerden we differentiële genexpressie- en pathway-analyses uit (n=24) en toonden aan dat de 'TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) pathway' geüpereguleerd was in dikke niet-metastaserende melanomen. [6] Er werden ook andere pathways geïdentificeerd maar we bespreken enkel de TWEAK pathway in detail, omdat deze ons zeer specifiek lijkt en het potentieel heeft om bepaalde moleculen die in de TWEAK pathway aanwezig zijn, zoals TNF-alfa, naar de kliniek te vertalen. Geïsoleerde ledemaatperfusie is een behandelingsoptie bij melanoompatiënten met meervoudige in-transitmetastasen, waarbij gebruik wordt gemaakt van regionale chemotherapie met een combinatie van melphalan en TNF-alfa perfusie.

Onze studie bevestigde dus voor de eerste keer dat de apoptose module van de TWEAK pathway geüpereguleerd was in niet-metastaserende dikke melanomen en identificeerde een gen signatuur geassocieerd met niet-metastaserende dikke melanomen door gebruik te maken van geavanceerde moleculaire technieken. Volgens de literatuur speelt de TWEAK/Fn14 signaleringsroute een sleutelrol bij kanker. Studies ontdekten dat TWEAK:Fn14 betrokkenheid in kankercellen de invasieve activiteit positief of negatief kan reguleren, afhankelijk van de kanker cellijn. [7] Zij toonden aan dat TWEAK activering van de niet-canonieke NFκB pathway in prostaatkanker proliferatie en invasie stimuleert, terwijl het in melanoomcellen het de proliferatie en invasie remt. In het bijzonder reguleert de Fn14-TRAF-TNFR as de intracellulaire signaaltransductie die doodsignalen in tumorcellen teweegbrengt via de niet-canonieke NF-κB signaalweg. Zoals beschreven in de onderstaande figuur 1B, na de vorming van het TRAF2-cIAP1 (BIRC2) complex, ondergaat het cathepsine B-gemedieerde degradatie. De degradatie van het TRAF2-cIAP1 complex leidt tot de stabilisatie van MAP3K14 (NIK). Dit laatste induceert de autocriene cellulaire apoptose-machine door activering van het RIPK1-FADD-Caspase-8 complex en maakt tumorcellen gevoelig voor de dood. [8,9] In onze studie identificeerden wij zes belangrijke geüpereguleerde genen geïdentificeerd die betrokken zijn bij de apoptose module van de TWEAK pathway in niet-metastaserende dikke melanomen, namelijk MAP3K14 (NIK1), BIRC2 (cIAP1), RIPK1, CASP7, CASP8, TNF, wat suggereert dat RIPK1-FADD-Caspase-8 complex-gemedieerde apoptose van melanoom cellen een cruciaal mechanisme in de preventie van metastase in dikke melanomen. Ook in de validatiedatabase van Leeds vonden we dat apoptose module van de TWEAK pathway geüpereguleerd was in niet-metastaserende dikke melanomen.

TOEKOMSTIG ONDERZOEK

Op basis van deze interessante voorlopige gegevens willen wij in de volgende stappen van dit project de TWEAK pathway te valideren en de rol van het immuunsysteem in het metastatische proces onderzoeken. Het is de bedoeling om deze bevindingen te valideren op eiwitniveau op Tissue micro array (TMA) met behulp van immunohistochemische tech-

nieken (MILAN methode: Multiple Iterative Labeling through Antibody Neodeposition), om zo informatie te verschaffen over de onderliggende mechanismen van dikke melanomen die niet/wel metastaseren. Een gedetailleerde moleculaire kennis van de biologie van dikke melanomen zal verder bijdragen tot de specificatie van nieuwe biomarkers voor risicostratificatie, wat het klinisch beheer van deze ziekte zal verbeteren. Bovendien kunnen deze resultaten richting geven aan toekomstige therapeutische paden door het identificeren van nieuwe doelwitten voor geneesmiddelen die gebruikt kunnen worden in secundaire preventie.

TREFWOORDEN

Melanoma - Breslowdikte - TWEAK pathway

KEYWORDS

Melanoma - thick Breslow - TWEAK pathway

LITERATUUR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(6):472-92.
3. Rajkumar S, Watson IR. Molecular characterisation of cutaneous melanoma: creating a framework for targeted and immune therapies. *Br J Cancer.* 2016;115(2):145-55.
4. Falzone L, Salemi R, Travali S, Scalisi A, McCubrey JA, Candido S, et al. MMP-9 overexpression is associated with intragenic hypermethylation of MMP9 gene in melanoma. *Aging (Albany NY).* 2016;8(5):933-44.
5. Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell.* 2015;161(7):1681-96.
6. Guvenc C, Antoranz A, Szumera-Cieckiewicz A, Teterycz PP, Rutkowski PR, Rawson RV, et al. Road to Metastasis: The TWEAK Pathway as a Discriminant between Metastasizing and Non-Metastasizing Thick Melanomas. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19).
7. Armstrong CL, Galisteo R, Brown SA, Winkles JA. TWEAK activation of the non-canonical NF-κB signaling pathway differentially regulates melanoma and prostate cancer cell invasion. *Oncotarget.* 2016;7(49):81474-92.
8. Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WW, Hawkins CJ, Schneider P, et al. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFα. *The Journal of cell biology.* 2008;182(1):171-84.
9. Bhattacharjee M, Raju R, Radhakrishnan A, Nanjappa V, Muthusamy B, Singh K, et al. A Bioinformatics Resource for TWEAK-Fn14 Signaling Pathway. *J Signal Transduct.* 2012;2012:376470.

CORRESPONDENTIEADRES

Canan Güvenc

E-mail: canan.guvenc@uzleuven.be