

Czerniak skóry jest nowotworem o ciągle wzrastającej liczbie zachorowań. Znajduje się na jednym z czołowych miejsc wśród chorób nowotworowych o wzrastającej zapadalności. Dlatego stał się w ostatnim czasie jednym z kluczowych punktów dociekań onkologii doświadczalnej i klinicznej. Duże znaczenie dla zrozumienia patogenezy czerniaka mają wyniki badań dotyczących roli, jaką odgrywają niekodujące sekwencje kwasów nukleinowych. Nie kodują one bezpośrednio sekwencji aminokwasów w białkach, jednak pełnią funkcję regulacyjną praktycznie na każdym etapie ekspresji materiału genetycznego. Zasadnicze klasy tych sekwencji to promotory genów, enhancery (odpowiedzialne za regulację poziomu transkrypcji), sekwencje zlokalizowane w obrębie intronów (związane z procesem splicingu) oraz 5'UTR i 3'UTR (nieulegające translacji rejonu mRNA położone po obu stronach sekwencji kodującej). Praca stanowi podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat roli sekwencji niekodujących w kancerogenezie czerniaka.

Słowa kluczowe: czerniak, sekwencje niekodujące, promotory, enhancery, splicing RNA, UTR.

Rola sekwencji niekodujących w kancerogenezie czerniaka

The role of non-coding sequences in melanoma carcinogenesis

Łukasz Kwinta

Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Epidemiologia czerniaka

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat wzrost zapadalności na czerniaka (zwłaszcza skóry) w krajach wysoko rozwiniętych uplasował go na jednym z czołowych miejsc wśród chorób nowotworowych o wzrastającej zapadalności. Pomiędzy poszczególnymi rejonami świata notuje się duże różnice zarówno w odniesieniu do samej zachorowalności (kraje o dużym następcznieniu zamieszkiwane przez populacje kaukaskie, np. Australia, Nowa Zelandia, niektóre stany USA, cechują się szczególnie wysoką liczbą nowych zachorowań), jak i dynamiki jej wzrostu. Amerykański raport z lat 1969–1999 potwierdził trend wzrostowy, wskazując, że na przestrzeni analizowanego okresu w USA nastąpił 5-krotny wzrost zapadalności na czerniaka skóry wśród mężczyzn w wieku powyżej 64 lat, 3-krotny wśród mężczyzn w średnim wieku, natomiast w grupie mężczyzn w wieku 20–44 lat wzrost ten był mniej niż 2-krotny (z tendencją do zatrzymania wzrostu). Wśród kobiet w podobnych przedziałach wiekowych wystąpiły podobne tendencje, ale stopień wzrostu był niższy [1]. Z kolei w australijskim stanie Queensland, gdzie jest notowana największa w skali globu zachorowalność na ten nowotwór (rocznie 56/100 tys. mężczyzn i 43/100 tys. kobiet [2] przy średniej światowej 4–12/100 tys. [3]), wzrost liczby zachorowań w skali roku wynosi 1,4% wśród mężczyzn i 0,7% wśród kobiet [4]. W Polsce pod koniec XX w. wzrost zachorowalności wyniósł dla mężczyzn 2,6% rocznie, a dla kobiet 4,4% rocznie [3]. Zapadalność na czerniaka skóry w Wielkopolsce w 2002 r. wyniosła 4,4/100 tys. wśród mężczyzn i 5,1/100 tys. wśród kobiet [3]. Mimo rosnącej liczby zachorowań na czerniaka obserwuje się stabilizację śmiertelności związanej z tą chorobą. Tendencję tę obserwuje się w Australii, Stanach Zjednoczonych i krajach europejskich [2]. W latach 1969–1999 wśród Amerykanów w średnim wieku zanotowano spadek śmiertelności związanej z czerniakiem [1]. Mimo to choroba w stadium zaawansowanym wciąż wiąże się ze złą prognozą. Przeżycia 5-letnie dla czerniaka skóry w IV stopniu zaawansowania wynoszą 9,5–18,8% [5]. Choć czerniak stanowi 4% nowotworów skóry (ok. 2% wszystkich chorób nowotworowych), jest odpowiedzialny za 80% zgonów spowodowanych nowotworami skóry [6]. Dlatego choroba, kilkadziesiąt lat temu uważana za rzadką, stała się w ostatnim czasie jednym z kluczowych punktów dociekań onkologii doświadczalnej i klinicznej. Badania nad genetyką czerniaka nie przyniosły do tej pory zadowalających wyników. Wprawdzie w przypadku niektórych genów bezspornie udowodniono, że odgrywają kluczową rolę w molekularnym szlaku kancerogenezy czerniaka (m.in. *BRAF*, *CDKN2A*, *PTEN* czy geny kadheryn E i N [6]), jednak wciąż nie są znane odpowiedzi na wiele pytań dotyczących patogenezy tej choroby.

Sekwencje niekodujące

Przez długi czas badania nad genetyką czerniaka skupiały się wyłącznie na mutacjach rejonów kodujących genów. W ostatniej dekadzie XX w. więk-

The incidence of skin melanoma is increasing, with the number of new cases rising at one of the highest rates. That is why melanoma is becoming one of the key points of interest among oncologists. Findings concerning non-coding sequences (NCS) of nucleic acids are of great importance for our understanding of its pathogenesis. NCS do not code sequences of proteins but play a key role in the regulation of virtually all steps of genetic material expression. The main classes of NCS are: gene promoters, enhancers (responsible for regulation of transcription level), sequences localized in introns (playing a role in splicing), 5'UTRs and 3'UTRs (untranslated regions of mRNA localized on both sides of the coding sequence). This review is focused on the current state of knowledge in the role of NCS in melanoma carcinogenesis.

Key words: melanoma, non-coding sequences, promoters, enhancers, RNA splicing, untranslated regions (UTRs).

szą uwagę zwrócono na sekwencje kwasów nukleinowych, które nie kodują bezpośrednio sekwencji białek. W literaturze światowej traktującej o czerniaku coraz więcej miejsca poświęca się roli sekwencji, które regulują ekspresję materiału genetycznego (wraz z czynnikami oddziałującymi z tymi sekwencjami). Można wśród nich wymienić promotory genów, sekwencje odpowiedzialne za regulację transkrypcji (m.in. enhancery), sekwencje związane z dojrzewaniem pre-mRNA (w tym z dojrzewaniem końców 5' i 3' mRNA i ze składaniem transkryptów), z transportem mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy, z trwałością tych cząsteczek, wreszcie sekwencje odpowiedzialne za regulację translacji. Badania w tym zakresie pozwoliły odpowiedzieć na wiele pytań dotyczących kancerogenezy czerniaka.

Mutacje i polimorfizmy w obrębie promotorów

W przypadku ok. 50% rodzin, w których czerniak występuje u kilku osób (ang. *familial melanoma malignum* – FMM), predyspozycja ta wiąże się z rejonem 9p21, w którym znajduje się *CDKN2A* (był to pierwszy gen supresorowy, który powiązano z onkogenezą *melanoma*). Tylko u ok. połowy osób z rodzin FMM, u których wykryto zaburzenia dotyczące *CDKN2A*, znaleziono mutacje w egzonach tego genu [7]. Sugerowano to występowanie mutacji w miejscach innych niż regiony kodujące genu. W 2000 r. Harland i wsp. opublikowali wyniki analizy mutacji rejonu promotorowego *CDKN2A* wśród członków 107 rodzin FMM [8]. Analiza dotyczyła ok. tysiąca par zasad przed miejscem startu transkrypcji. Stwierdzono 3 warianty sekwencji zlokalizowane w obrębie promotora A-191G (zamiana adeniny na guaninę 191 nukleotydów przed startem transkrypcji), A-493T i G-735A. A-191G uznano za polimorfizm o bardzo małym prawdopodobieństwie patogenności. Wariant G-735A występował co prawda również w kontrolnym DNA, autorzy jednak nie wykluczyli, że może on mieć wpływ na onkogenezę czerniaka. Ponadto zaobserwowano, że wariant A-493T jest w całkowanej nierównowadze sprzężeń z wcześniej poznanym polimorfizmem Ala148Thr rejonu kodującego genu *CDKN2A* (podstawienie alaniny treoniną), a Ala148Thr wykazuje związek ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na czerniaka [9]. Obliczenia ujawniły, że sekwencje te odległe w genie o blisko 6000 par zasad (pz) powinny zostać rozdzielone podczas rekombinacji raz na 16 000 podziałów mejozytycznych. Mimo tego oba polimorfizmy występują wspólnie w obrębie haplotypu lub w ogóle ich nie ma. Dotychczas nie znaleziono wytłumaczenia tego zjawiska.

W innym badaniu rejonu promotorowego *CDKN2A* analizą objęto odcinek 1116 pz powyżej kodonu *start* (położonego przed nim) [10]. Oparto się na doniesieniach, że obszar krytyczny pod względem aktywności promotora tego genu sięga 869 pz powyżej sekwencji kodującej [11]. Poza wariantami sekwencji promotora, o których informowali Harland i wsp. [8] (wnioski w ich przypadku były podobne), badaczom tym udało się zlokalizować inne takie miejsca – A-252T, G-347C i G-981T. Nie udało się zweryfikować znaczenia w transformacji nowotworowej wariantu w pozycji –981, ponieważ autorzy nie dysponowali materiałem od krewnych badanych osób. Uniemożliwiło to określenie, czy segreguje ona razem z chorobą. Dlatego kwestia patogenności tej zmiany pozostała otwarta. Pozostałe dwie uznano za nieistotne. Podkreślono także, że warianty wywierające mały wpływ na wydajność promotora oraz warianty wpływające na zróżnicowanie ekspresji *CDKN2A* w czasie lub w odmiennej lokalizacji tkankowej mogą nie zostać wykryte przy użyciu stosowanych technik. Nawet gdyby wpływ ten był stosunkowo mały, może okazać się istotny w sytuacji sumowania się wpływu kilku czynników sprzyjających kancerogenezie (konceptcja nakładania się kilku czynników ryzyka o jednostkowym słabym wpływie nabiera ostatnio znaczenia w odniesieniu do wielu nowotworów).

Oksygenaza hemu 1 (HO-1) jest białkiem zaangażowanym w przekazywanie sygnałów wpływających na cykl komórkowy i apoptozę. W promotorze genu *HO-1* zlokalizowano sekwencję mikrosatelitarną, cechującą się polimorfizmem liczby powtórzeń dwunukleotydu GT. Liczba tych powtórzeń waha się od 10 do 43. Krótsze sekwencje mikrosatelitarne są związane z większym

poziomem ekspresji genu *HO-1*. Udowodniono, że liczba powtórzeń koreluje z częstością zachorowania na czerniaka skóry [12]. Za punkt odcięcia między allelem długim (L – ang. *long*) i krótkim (S – ang. *short*) przyjęto 25 powtórzeń (L – 25 i więcej). Osoby badane, będące homozygotami względem allelu S, częściej należały do grupy chorującej na czerniaka skóry. Genotyp S/S występował u 21% chorych na czerniaka w porównaniu z 11,6% osób zdrowych (natomiast L/L u 46% chorych i u 44% osób z grupy kontrolnej). Nosicielstwo wariantu S/S wiązało się z 2-krotnie większym ryzykiem zachorowania na czerniaka. Porównanie chorych na czerniaka o genotypie S/S i L/L wykazało, że guzy u osób mających oba allele krótkie są bardziej inwazyjne, czego wykładnikiem jest stopień głębokości naciekania guza w skali Breslow. Nie wykazano natomiast statystycznie istotnej korelacji między długością polimorficznego allelu a długością czasu wolnego od choroby (DFS – ang. *disease free survival*).

Poza zmianami sekwencji promotorów, na których skupiono się w tej pracy, pamiętać należy o występowaniu również innych zaburzeń z nimi związanych (np. błędne wzorce metylacji wysp CpG zlokalizowanych w obrębie promotorów [13]).

Sekwencje wzmacniające transkrypcję (enhancery)

Enhancery są sekwencjami wpływającymi na wzrost podstawowego poziomu transkrypcji genów. Każdy enhancer jest położony w obrębie tej samej cząsteczki DNA co gen, który podlega jego regulacyjnemu wpływowi (są zatem elementami zlokalizowanymi w układzie *cis*). Położone są one w różnej odległości od regulowanych genów, maksymalnie do 50 000 pz. W odróżnieniu od promotorów, funkcja enhancerów nie jest uzależniona od orientacji względem genu (niektóre znajdują się po stronie 5', inne po stronie 3' genów). W ich obrębie znajdują się motywy rozpoznawane przez powszechnie występujące czynniki transkrypcyjne, jak również przez czynniki regulujące tkankowo-swoistą ekspresję genów. Na skutek wypętlenia odcinka DNA znajdującego się między enhancerem a promotorem dochodzi do kontaktu czynników transkrypcyjnych związanych z enhancerem, z rejonem promotora i czynnikami tam obecnymi.

Zidentyfikowano enhancery, które poprzez modyfikację ekspresji odpowiednich genów wpływają na procesy związane z różnymi aspektami rozwoju czerniaka, w tym na angiogenezę. Kluczową rolę w rozwoju naczyń zaopatrujących guzy odgrywa naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor* – VEGF) i jego receptor – kinaza tyrozynowa Flk-1. Receptor ten ulega ekspresji w czasie rozwoju naczyń, natomiast w dojrzałym łożysku naczyniowym nie stwierdza się go. Jest wykrywany w śródbłonku naczyń zaopatrujących guzy nowotworowe, w tym guzy czerniaka. Za ekspresję genu *Flk-1* odpowiada prawdopodobnie bliżej nieokreślony czynnik parakryny produkowany przez komórki nowotworowe. Udowodniono, że do aktywacji genu *Flk-1* kluczowy jest fragment obejmujący 939 pz powyżej startu transkrypcji oraz enhancer tego genu [14]. Wykazano, że są one aktywne *in vivo* w czasie angiogenezy w guzie czerniakowym (w modelu *mysim*). Ponadto doświadczenia pokazały, że do aktywacji angiogene-

zy dochodzi pierwotnie na obwodzie guza i proces postępuje później w kierunku jego środka.

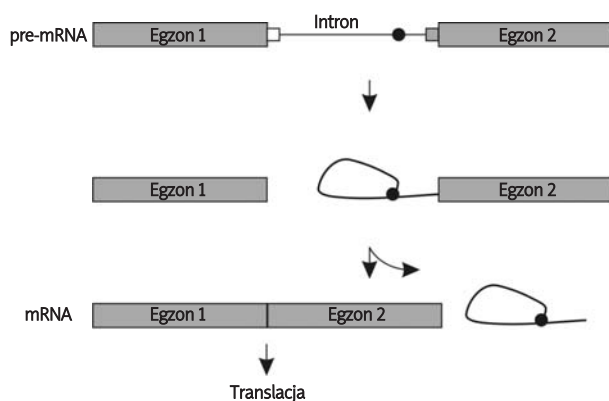
Znany jest także enhancer odpowiedzialny za nadekspresję jednego z antygenów związanych z czerniakiem – melanotransferyny. Enhancer ten znajduje się 2000 pz powyżej promotora genu melanotransferyny [15] i jest odpowiedzialny za wzmacnianie jego ekspresji w komórkach czerniaka. Składa się z 2 elementów, o rozmiarach 58 i 110 pz, oddalonych od siebie o 130 pz. Każdy z nich wiąże czynniki transkrypcyjne z rodziny AP1, do której należą takie białka jak produkty onkogenów *Fos* i *Jun*. Delecja tego enhancera znacznie upośledza ekspresję melanotransferyny. Także delecja każdego z dwóch elementów wiążących regulatory transkrypcji sprawia, że cały układ staje się nieaktywny, przy czym zaburzenia w obrębie elementu 110 pz wydają się mieć trochę większe znaczenie. Nie zmienia to faktu, że zarówno sekwencja 58 pz, jak i 110 pz jest niezbędna do nadekspresji melanotransferyny. Wykazują one silny synergizm działania i są od siebie zależne. Dotąd nie poznano mechanizmu, który odpowiada za współdziałanie obu struktur.

Podobnie wybiórcza nadekspresja w komórkach czerniaka dotyczy glukuronylotransferazy I glikozaminoglikanów (GlcAT-I). Jest to enzym o tyle ważny, że uczestniczy w syntezie oligosacharydowych łańcuchów glikoprotein, a przez to odgrywa kluczową rolę w interakcjach cząsteczek różnych klas (m.in. czynników wzrostu, cytokin czy cząsteczek adhezyjnych). Zidentyfikowano silny enhancer znajdujący się między pozycjami 303 i 153 powyżej miejsca startu transkrypcji genu *GlcAT-I* [16]. Jego aktywność w komórkach czerniaka skutkuje nadekspresją *GlcAT-1*. Poziom ekspresji tego genu jest np. 3 razy wyższy niż w komórkach raka wątrobowokomórkowego. Za udziałem zidentyfikowanego enhancera w nadekspresji przemawia fakt, że aktywność samych rejonów promotorowych w komórkach obu nowotworów jest taka sama. W komórkach o umiarkowanej ekspresji genu *GlcAT-1*, enzym ten odpowiada za syntezę oligosacharydu Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl, podczas gdy synteza oligosacharydów o innej budowie ma niski poziom. W komórkach czerniaka, gdzie dochodzi do nadekspresji *GlcAT-1*, odpowiada on prawdopodobnie także za syntezę oligosacharydu o składzie 3-O-siarczan-GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc. Może mieć to bardzo duże znaczenie dla rozwoju czerniaka, jego zdolności unikania rozpoznania przez komórki układu immunologicznego oraz dla wzrostu agresywności czerniaka o takim profilu ekspresji *GlcAT-1*. Interakcja między komórkami, także między wszelkimi komórkami organizmu a komórkami układu odpornościowego, odbywa się za pośrednictwem antygenów powierzchniowych, których zdecydowaną większość stanowią glikoproteiny. O swoistości tych oddziaływań w dużym stopniu decydują łańcuchy oligosacharydowe będące składnikami tych cząsteczek. Oligosacharydowe podjednostki cząsteczek adhezyjnych wykazują podobne właściwości, a zmiany w tym przypadku modyfikują zarówno oddziaływanie międzykomórkowe, jak i interakcje między komórkami a macierzą pozakomórkową. Efektem tego może być zdolność do opuszczania przez komórki czerniaka pierwotnych lokalizacji, wnikania do naczyń limfatycznych i krwionośnych, a następnie zasiedlania miejsc w organizmie, gdzie dochodzi do rozwoju ognisk przerzutowych.

Introny i składanie transkryptów (splicing RNA)

Jednym z zasadniczych etapów ekspresji materiału genetycznego jest składanie transkryptów, czyli splicing. W wyniku transkrypcji genów kodujących białka powstają niedojrzałe cząsteczki mRNA (pre-mRNA). W ich skład wchodzi egzony oraz zlokalizowane pomiędzy nimi introny. Sekwencja nukleotydowa egzonów zostaje przepisana na sekwencję aminokwasów białka w procesie translacji, jednak zanim do tego dojdzie, z cząsteczki mRNA muszą zostać usunięte introny. Za wycięcie intronów i połączenie egzonów w jedną liniową cząsteczkę odpowiada proces składania transkryptów – splicingu (ryc. 1). Odrębnym zagadnieniem jest zjawisko alternatywnego splicingu. Polega ono na różnych sposobach składania pre-mRNA tego samego genu. Prowadzi to do powstania więcej niż jednego rodzaju mRNA, ponieważ podczas alternatywnego splicingu pewne egzony zostają włączone do cząsteczki, a inne usunięte wraz z intronami.

W prawidłowy przebieg procesu składania zaangażowane są konserwatywne sekwencje zlokalizowane w obrębie intronów. Na granicach z egzonami znajdują się sekwencje zwane miejscami splicingowymi 5' i 3' (miejsce 5' zwane jest także miejscem donorowym, a 3' – akceptorowym). W pobliżu miejsca 3' znajdują się kolejne dwa zachowawcze motywy – miejsce rozgałęzienia i trakt polipirymidynowy (ryc. 1.) [17]. Mutacje zlokalizowane w intronach mogą zaburzać proces składania transkryptów. Mutacje te mogą występować w obrębie wymienionych sekwencji konserwatywnych, potencjalnych miejsc wzmacniających i wyciszających proces splicingu, które mogą być zlokalizowane również w egzonach [18] lub w dowolnym miejscu intronu, co może wpłynąć na splicing m.in. poprzez wygenerowanie sekwencji odpowiadającej jednej z tych zachowawczych sekwencji. Zaburzenia splicingu, takie jak wyeliminowanie egzonów (lub fragmentów egzonów) z dojrzałych cząsteczek mRNA albo pozostawienie w obrębie mRNA intronów (ewentualnie ich części), mogą ostatecznie prowadzić do braku



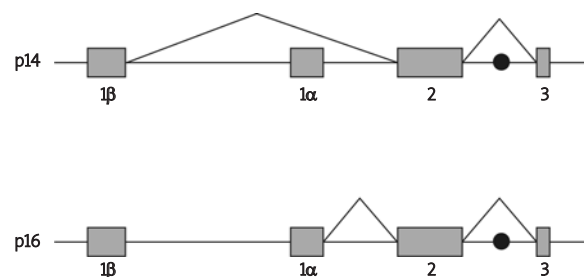
Ryc. 1. Schemat przebiegu procesu składania transkryptów. Lokalizacja zachowawczych sekwencji intronu: biały kwadrat – miejsce splicingowe 5' (miejsce donorowe), szary kwadrat – miejsce splicingowe 3' (miejsce akceptorowe), czarny punkt – miejsce rozgałęzienia

Fig. 1. Schematic view of RNA splicing. Localization of intron's conserved sequences: white square – 5' splice site (donor site), grey square – 3' splice site (acceptor site), black point – branch site

produkcji funkcjonalnego białka kodowanego przez dany gen. W przypadku genów supresorowych może to prowadzić do transformacji nowotworowej.

Gen *CDKN2A*

Zdecydowana większość badań i doniesień traktujących o tego typu mutacjach w kontekście kancerogenezy czerniaka, dotyczy analiz wspomnianego już genu supresorowego *CDKN2A*. W wyniku ekspresji tego genu i alternatywnego splicingu pre-mRNA dochodzi do powstania wielu transkryptów, przy czym trzy z nich kodują białka o kluczowej roli dla regulacji cyklu komórkowego (internetowa baza danych Entrez Gene, GenelD: 1029). Ta różnorodność produktów ekspresji *CDKN2A* powoduje, że mutacje w obrębie intronów, rzutuące na proces składania transkryptów tego genu, mogą mieć tym bardziej dramatyczne konsekwencje dla losów komórki. Gen *CDKN2A* składa się z następujących egzonów położonych w kolejności: 1 β , 1 α , 2 oraz 3 (ryc. 2.) [19]. Głównymi produktami ekspresji genu są białka p16^{INK4a} i p14^{ARF}. Cząsteczki mRNA ulegające translacji do tych białek są syntetyzowane, poczynając od innych miejsc startu transkrypcji. Trzecie wspomniane białko jest podtypem białka p16 i jest produkowane wyłącznie w trzustce (różni się od p16 C-końcem łańcucha polipeptydowego). Białko p16 powstaje w wyniku składania egzonów 1 α , 2 i 3, natomiast p14 – egzonów 1 β , 2 i 3 (ryc. 2.) [19]. Zasadnicza rola regulacji procesów proliferacji przez *CDKN2A* wynika z tego, że p16 i p14 oddziałują w kluczowych punktach cyklu komórkowego. P16 jest inhibitorem kinaz CDK4 i CDK6, które odpowiadają za fosforylację Rb [20], natomiast p14 wpływa głównie na stabilność p53 (bierze udział w inhibicji represora p53 – białka MDM2) [21], ale hamując CDK4 i CDK6 pełni również funkcje podobne do p16 [22]. Jeden gen kontroluje zatem 2 punkty kontrolne cyklu komórkowego (G1/S i G2/M). Duże znaczenie *CDKN2A* jako supresora kancerogenezy ujawnia się chociażby w liczbie chorób nowotworowych, w których obserwuje się zaburzenia jego ekspresji. Poza wpływem na onkogenezę czerniaka, prowadzą one także do rozwoju m.in. raka trzustki [23], raka pęcherza mo-



Ryc. 2. Struktura genu *CDKN2A* oraz układ egzonów wchodzących w skład dojrzałych cząsteczek mRNA kodujących białka p14 i p16. Egzony przedstawiono jako prostokąty. Czarnym punktem oznaczono intron 2. W skład mRNA kodującego białko p14 wchodzi egzony 1 β , 2 i 3, natomiast w skład mRNA p16: 1 α , 2 i 3

Fig. 2. Structure of *CDKN2A* gene and pattern of exons included to mature mRNAs coding p14 and p16. Exons are presented as boxes. Intron 2 is marked with black point. P14 mRNA consists of exons 1 β , 2 and 3. P16 mRNA contains exons 1 α , 2 and 3

czowego [24], międzybłoniaka optycznej [25], guzów ośrodkowego układu nerwowego typu *astrocytoma* (gwiazdzia-ka) [26] czy płaskonabłonkowego raka przetyku [27].

Zaburzenia splicingu w czerniaku

Pierwsze doniesienie o mutacji punktowej w intronie, która predysponuje do zachorowania na czerniaka, pojawiło się w 1994 r. [28] i dotyczyło właśnie genu *CDKN2A*. W intronie 2 wykryto substytucję pierwszego nukleotydu (IVS2+1), transwersję G>T, powodującą zniszczenie konserwatywnej sekwencji donorowego miejsca splicingowego. Według autorów powinno skutkować to włączeniem intronu 2 do mRNA. Substytucja ta okazała się ściśle skorelowana z predyspozycją do zachorowania na czerniaka i występowaniem zespołu znamion dysplastycznych (ang. *dysplastic nevus syndrome* – DNS), natomiast u osób z grupy kontrolnej nie stwierdzono tej mutacji. Mutację tę opisano również m.in. w pracy McKie i wsp. [29], znajdując korelację z mnogimi pierwotnymi czerniakami (u osób z MPM, ang. *multiple primary melanoma*). Znalaziono jednak miejsce w obrębie egzonu 2 pełniące zastępczą funkcję miejsca donorowego [30]. Umożliwia to w obecności mutacji IVS2+1G>T powstanie transkryptów bez intronu, ale także pozbawione fragmentu 2 egzonu zlokalizowanego w jego części po stronie 3'. Mimo braku tego fragmentu egzonu 2, jeżeli doszłoby do translacji na matrycy takich cząsteczek mRNA, nie wyklucza to powstania aktywnego białka p14, a to stawiałoby pod znakiem zapytania faktyczne znaczenie mutacji IVS2+1G>T. Wnioski te oparto na danych wskazujących, które części białek p14 i p16 są krytyczne dla ich aktywności. W aktywności p16 kluczowe znaczenie mają motywy ankirynowe helisa–zwrot–helisa kodowane przez egzon 2 [30, 31] (jeden z nich jest częściowo kodowany właśnie przez fragment po stronie 3' egzonu 2). Fragment ten ulega wycięciu w czasie splicingu z wykorzystaniem opisanego zastępczego donorowego miejsca splicingowego. Wydaje się wątpliwe, żeby na matrycy takiego mRNA mogło powstać funkcjonalne białko p16. Inaczej sytuacja przedstawia się w odniesieniu do p14. Białko to zawdzięcza swoją aktywność biologiczną sekwencji kodowanej przez egzon 1β. Badania wykazują, że do aktywności p14 *in vitro* wystarczający jest peptyd ograniczony do sekwencji zakodowanej w tym jednym egzonie [30]. W opozycji do tych rozważań stoją wnioski Petronzelli i wsp. [32]. W rodzinie obciążonej występowaniem zespołu znamion dysplastycznych, czerniaków i nerwiakowłókniaków wykryli oni inną mutację intronową: substytucję G>C w akceptorowym miejscu splicingowym intronu 1. Zmiana ta zaburza splicing, powodując brak egzonu 2 w dojrzałych transkryptach (p14 i p16). Na podstawie przedstawionych wyżej przesłanek co do istotnych funkcjonalnie rejonów białek p14 i p16 można przyjąć, że substytucja ta z pewnością uniemożliwia powstanie funkcjonalnego białka p16, natomiast pozostawia nienaruszoną sekwencję egzonu 1β warunkującą aktywność p14 *in vitro*. Badacze podali jednak w wątpliwość funkcjonalność takiego białka p14 *in vivo*. Argumentowali to faktem, że fragment łańcucha polipeptydowego kodowany przez egzon 2 stanowi zbyt dużą część natywnego białka (ponad połowę jego masy), aby tak zmienne cząsteczki p14 mogły być aktywne w komórce.

Znane są także mutacje zlokalizowane w intronie między egzonami 1β i 1α. Biorąc pod uwagę położenie tego intronu, najprawdopodobniej wpływają one na splicing pre-mRNA białka p14, bez wpływu na p16. Na pograniczu egzonu 1β i intronu zidentyfikowano substytucje jednonukleotydowe w dwóch ostatnich pozycjach egzonu 1β oraz w 3 pierwszych intronu (G>A w pierwszej pozycji intronu (+1), T>C w miejscu +2 oraz A>G w miejscu +3). Ponadto zlokalizowano substytucję T>C w pozycji +56 tego intronu [12]. Spośród nich substytucje w pozycjach +1 i +3 wpływają na przebieg splicingu (i segregują z czerniakiem). W przypadku mutacji +1 w komórkach znajdują się cząsteczki mRNA p14, w których nie stwierdza się sekwencji odpowiadającej egzonowi 1β (mutacja zmienia sekwencję donorową splicingu i dezaktywuje ją). Z kolei substytucja w pozycji +3 prowadzi do usunięcia z pre-mRNA poza intronami także większej części egzonu 1β. W obu przypadkach zmiany w mRNA dotyczą egzonu kluczowego dla aktywności p14 (w rzeczywistości dotyczą też pozostałych egzonów, jednak rozważania na ten temat wykraczają poza zakres tego opracowania).

Harland i wsp. zlokalizowali intronową mutację punktową położoną nie w jednej z konserwatywnych sekwencji zaangażowanych w splicing (zlokalizowanych na granicy z egzonami), a dalej w głąb sekwencji intronu genu *CDKN2A* [33]. Transwersja A>G została zlokalizowana w intronie 2, 105 nukleotydów od 5' końca egzonu 3 (IVS2-105A>G). Znalaziono ją u osób z brytyjskich rodzin FMM, u których wcześniej nie udało się zidentyfikować żadnych mutacji w rejonach kodujących genu. Mutacja ta segreguje razem z zachorowaniami na czerniaka i poprzez zaburzenia ekspresji genu *CDKN2A* wydaje się odpowiadać za zachorowania w tych rodzinach. Substytucja A>G w sąsiedztwie tyminy prowadzi do powstania donorowego miejsca splicingowego GT. W badaniu tym zidentyfikowano dwie różne populacje mRNA p16 (skupiono się głównie na analizie skutków tej mutacji dla mRNA p16). Jedna z nich zawiera cały 2 intron. W drugiej populacji z cząsteczek mRNA usunięty jest z intronu 2 końcowy fragment 105 nukleotydów, natomiast pozostała, większa część intronu, pozostaje po splicingu w dojrzałych cząsteczkach mRNA. Okazało się więc, że w przypadku drugiej populacji mRNA, powstałe na skutek mutacji miejsce splicingowe jest aktywne. Natomiast w obu przypadkach natywne miejsce donorowe na pograniczu egzonu 2 i intronu 2 nie wykazuje aktywności. Może to świadczyć o istnieniu mechanizmu blokującego to natywne miejsce donorowe w sytuacji powstania wewnątrz intronu drugiego takiego miejsca. Silne dowody wskazują na związek przyczynowo-skutkowy między tą substytucją a podatnością na czerniaka: we wszystkich rodzinach, w których wykryto tę mutację, występowało po kilka przypadków czerniaka związanego z *locus CDKN2A*. Okazało się, że jest to częsta mutacja wśród brytyjskich rodzin FMM, natomiast w wielonarodowościowej populacji Toronto jest rzadkim wariantem [33].

Rejony nieulegające translacji (ang. *untranslated regions* – UTR)

Mechanizmy potranskrypcyjne wpływają na wydajność syntezy białka m.in. poprzez regulację jądrowo-cytoplazmatycznego transportu mRNA, stabilności cząsteczek mRNA,

kierowanie lokalizacją mRNA w obrębie komórki czy wydajnością translacji. W potranskrypcyjnej regulacji czołową rolę odgrywają sekwencje mRNA zlokalizowane po stronie 5' i 3' rejonu ulegającego translacji (kodującego białko) – 5'UTR i 3'UTR. Wpływają one na procesy komórkowe poprzez wiązanie czynników białkowych, co jest uwarunkowane nie tylko sekwencją, ale także drugorzędową strukturą przestrzenną w obrębie 5'UTR i 3'UTR (białka wiążące RNA rozpoznają głównie przestrzenne motywy mRNA). Za stabilność cząsteczek mRNA odpowiedzialny jest w dużej mierze ogon poli-A znajdujący się na końcu 3'. Składa się on z ok. 250 jednostek adenozyliny, a jego skrócenie wyraźnie wpływa na okres półtrwania mRNA. Także 7-metyloguanozyna na przeciwnym końcu mRNA odgrywa taką rolę – usunięcie czapeczki (ang. *cap*) z końca 5' wpływa na degradację mRNA. W obrębie 3'UTR mRNA o krótkim okresie półtrwania, takich jak czynniki regulujące proliferację, znajdują się sekwencje bogate w adeninę i uracyl – ARE (ang. *AU-rich elements*), których obecność reguluje degradację mRNA przez wpływ na skracanie poli-A [34]. Zaburzenia w obrębie ARE, prowadzące do większej trwałości mRNA, umożliwiają syntezę większej liczby białek na matrycy danego mRNA, co w przypadku onkogenów może prowadzić do utraty kontroli nad proliferacją i do transformacji nowotworowej. Z kolei zaburzenia ARE skracające okres półtrwania mRNA są znamienne w onkogenezie poprzez wpływ na supresory nowotworzenia.

Najważniejszym etapem regulującym translację jest proces inicjacji, w którym kluczową rolę odgrywa 5'UTR. Wiązanie się czynników białkowych inicjujących translację jest ściśle uzależnione od motywów drugorzędowej struktury znajdujących się w tym rejonie [35]. Ponadto lokalizacja kodonu AUG (kodon startu translacji) i kontekst, w którym jest odczytywany (sekwencja w najbliższym otoczeniu), wpływają decydująco na rozpoczęcie syntezy białka. Dlatego wszelkie zmiany w obrębie tych rejonów prowadzą do bardzo istotnych modyfikacji przebiegu translacji (a przez to stają się czynnikami limitującymi wydajność ekspresji zmieniowanych genów).

Ważną cechą nowotworów jest zaburzenie architektury histologicznej w obrębie ognisk chorobowych oraz utrata biegunowości komórek. Jednym z mechanizmów, które odpowiadają za asymetrię budowy prawidłowych komórek, jest nierównomierne rozmieszczenie mRNA w komórkach. Udowodniono, że przestrzenna struktura drugorzędowa 3'UTR jest rozpoznawana przez czynniki pośredniczące w wiązaniu mRNA z cytoszkieletem (mikrotubulami lub filamentami aktynowymi), co wraz z selektywną degradacją mRNA odpowiada za nierównomierne rozmieszczenie tych cząsteczek. Skutkuje to utrzymywaniem komórkowej asymetrii istotnej m.in. w rozwoju, dojrzewaniu i proliferacji komórek [36]. Zaburzenia w tym zakresie mogą mieć wpływ na rozwój fenotypu złośliwego komórek.

Biorąc pod uwagę, w jak wielu istotnych etapach potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów biorą udział rejon 5'UTR i 3'UTR oraz ich wpływ na procesy kluczowe dla transformacji nowotworowej (proliferaacja, dojrzewanie i różnicowanie komórek), zainteresowano się nimi w kontekście czerniaka i genów związanych z jego kancerogenezą.

3' UTR

Rzeczony fenotyp złośliwego melanocytów pociąga za sobą zaburzenia prawidłowego różnicowania (wykładnikiem morfologicznym tego stanu rzeczy jest obecność komórek atypowych, a w skrajnych przypadkach anaplastycznych). Zaburzenia różnicowania towarzyszą wzrostowi aktywności proliferacyjnej komórek czerniaka, oporności na apoptozę, agresywności w stosunku do prawidłowych tkanek, obniżeniu produkcji melaniny, zaburzeniom architektury cytoszkieletu czy zmianom profilu antygenów powierzchniowych. Zasadniczym czynnikiem odpowiedzialnym za realizację prawidłowego programu różnicowania melanocytów jest białko kodowane przez gen *mda-7* (ang. *melanoma differentiation associated factor 7*). Pełni ono tę funkcję przez wpływ na strukturę chromatyny, co z kolei reguluje ekspresję odpowiednich genów. W komórkach czerniaka cechujących się niskim stopniem zróżnicowania stężenie białka kodowanego przez gen *mda-7* jest bardzo małe lub niewykrywalne, natomiast transkrypcja tego genu oraz poziom mRNA nie różni się od zdrowych komórek. Do zaburzeń ekspresji genu *mda-7* dochodzi na poziomie potranskrypcyjnym przez znaczne zmniejszenie stabilności mRNA [37]. W obrębie 3'UTR mRNA *mda-7* zidentyfikowano motyw, który odpowiada za tę zmianę stabilności. Jest to sekwencja AUUUUA, jedna z sekwencji ARE, które wpływają na okres półtrwania mRNA. Podkreślić należy, że po zastosowaniu interferonu β (IFN- β) i merozereiny stan ten ulega odwróceniu i komórki czerniaka wkraczają w nieodwracalny proces różnicowania (co jest bardzo obiecującą strategią terapeutyczną).

Opisano kilka wariantów sekwencyjnych 3'UTR genu *CDKN2A*. Najczęstszą lokalizacją zmian w obrębie 3'UTR są polimorfizmy C500G i C540T. Polimorfizm C500G jest związany ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na czerniaka u osób z rodzin FMM [38]. Kumar i wsp. w badaniach na 229 pacjentach chorujących na postać sporadyczną czerniaka udowodnili, że allel T w pozycji 540 występuje znamienne częściej wśród tych chorych [39]. Zarówno stan homozygotyczny, jak i układ heterozygotyczny wykazywały w tym względzie znamienność statystyczną. Obecność allelu G w pozycji 500 nie wykazywała w tej grupie badanych znamienne statystycznie wyższej częstości, natomiast obecność ta była w nierównowadze sprzężeń z polimorfizmem C>A zlokalizowanym w intronie genu *CDKN2B* (położonego w odległości ok. 50 000 pz od *CDKN2A*). Donoszono także o zależności między występowaniem C500G i C540T, a krótszym czasem DFS po remisji czerniaka [40]. Z kolei Lamperska i wsp. przeprowadzili analizę korelacji między występowaniem polimorfizmu C500G a takimi cechami klinicznymi czerniaka, jak lokalizacja pierwotnego ogniska, wiek, w którym choroba została zdiagnozowana, czy całkowity czas przeżycia (ang. *overall survival* – OS) [41, 42]. W badaniu tym nie wykazano statystycznie znamiennej zależności z tymi cechami, natomiast wykazano istotną korelację występowania polimorfizmu C500G z polimorfizmem Ala148Thr znajdującym się w egzonie 2 (o którym wiadomo, że wykazuje związek ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na czerniaka [9]).

5' UTR

Znane są także warianty sekwencyjne 5'UTR, mające znaczenie w patogenezie czerniaka. W pozycji 61 5'UTR genu

naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor* – EGF) zlokalizowany jest polimorfizm A>G. Okamoto i wsp. stwierdzili, że jego występowanie (włączając w to także stan heterozygotyczności) koreluje z głębszym naciekaniami tkanek przez nowotwór (ocenianym w skali Breslow) u badanych pacjentów [43]. Także DFS i OS są krótsze w przypadku występowania wariantu G (większe znaczenie ma stan homozygotyczny G/G, natomiast polimorfizm u heterozygot ma mniejszy, choć również znamienny wpływ) [44]. Ponadto w cytowanym badaniu ryzyko wystąpienia przerzutów okazało się wyższe u nosicieli wariantu G, jednak zależność ta nie osiągnęła znamienności statystycznej. Wszystkie te spostrzeżenia pokazują, że wariant A61G w 5'UTR jest potencjalnym markerem złośliwości czerniaka i wcześniejszej progresji choroby.

Liu i wsp. zlokalizowali mutację w obrębie 5'UTR genu *CDKN2A*, która predysponuje do zachorowania na czerniaka [45]. Mutacja ta położona jest 34 pz powyżej kodonu *start* (transwersja G-34T) i segreguje z zachorowaniami na ten nowotwór. Zamiana G na T w tej pozycji skutkuje powstaniem nowego kodonu AUG (kodonu startu translacji). Na matrycy takiego mRNA powstaje białko krótsze od natywnego p16 i zupełnie nieaktywne, gdyż do translacji dochodzi w innej ramce odczytu. Tylko minimalne ilości prawidłowego białka są wykrywane w komórkach, co oznacza, że w tych stosunkowo nielicznych przypadkach dochodzi do inicjacji translacji z natywnego kodonu AUG. Mutacja ta ogranicza ilość prawidłowego białka p16 do wartości nieprzekraczającej progowego stężenia w komórce, które jest niezbędne do utrzymania jego aktywności jako supresora nowotworzenia.

Należy się spodziewać, że w najbliższym czasie pojawi się wiele doniesień na temat wpływu sekwencji niekodujących na rozwój czerniaka. Ten kierunek badań już teraz rzuca nowe światło na pewne aspekty onkogenezy *melanoma*. Prawdopodobnie pozwoli pełniej zrozumieć patogenезę tego nowotworu i być może doprowadzi do ustalenia stosunkowo uniwersalnego molekularnego szlaku kancerogenezy czerniaka. Umożliwiłoby to w przyszłości opracowanie m.in. nowych strategii terapeutycznych czy testów genetycznych służących do określania ryzyka u osób z rodzinną predyspozycją do zachorowania.

Piśmiennictwo

- Geller AC, Miller DR, Annas GD, Demierre MF, Gilchrist BA, Koh HK. Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999. *JAMA* 2002; 288: 1719-20.
- Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer – the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 2008; 624: 89-103.
- Kyrcel W, Teresiak M. Czerniak skóry: aktualne możliwości leczenia w Polsce na podstawie analizy leczonych pacjentów i przeglądu literatury. *Współcz Onkol* 2006; 10: 437-48.
- Whiteman DC, Bray CA, Siskind V, Green AC, Hole DJ, Mackie RM. Changes in the incidence of cutaneous melanoma in the west of Scotland and Queensland, Australia: hope for health promotion? *Eur J Cancer Prev* 2008; 17: 243-50.
- Mackiewicz A. Nowa klasyfikacja czerniaka złośliwego skóry. *Współcz Onkol* 2002; 6: 348-53.
- Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355: 51-65.
- Borg A, Sandberg T, Nilsson K, et al. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in *CDKN2A* mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1260-6.
- Harland M, Holland EA, Ghiorzo P, et al. Mutation screening of the *CDKN2A* promoter in melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 45-57.
- Dębniak T, Scott RJ, Huzarski T, et al. *CDKN2A* common variants and their association with melanoma risk: a population based study. *Cancer Res* 2005; 65: 835-9.
- Pollock PM, Stark MS, Palmer JM, Walters MK, Aitken JF, Martin NG, Hayward NK. Mutation analysis of the *CDKN2A* promoter in Australian melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32: 89-94.
- Hara E, Smith S, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16^{CDKN2A} expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 859-867.
- Okamoto I, Krögler J, Endler G, et al. A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with risk for melanoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 1312-5.
- Kwinta Ł. Epigenetyka czerniaka. *Współcz Onkol* 2008; 12: 45-50.
- Heidenreich R, Kappel A, Breier G. Tumor endothelium-specific transgene expression directed by vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences. *Cancer Res* 2000; 60: 6142-7.
- Duchange N, Ochoa A, Plowman GD, Rozé A, Amdjadi M, Zakin MM. Identification of an enhancer involved in the melanoma-specific expression of the tumor antigen melanotransferrin gene. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 2853-9.
- Kitagawa H, Taoka M, Tone Y, Sugahara K. Human glycosaminoglycan glucuronyltransferase I gene and a related processed pseudogene: genomic structure, chromosomal mapping and characterization. *Biochem J* 2001; 358: 539-46.
- McKeown. Alternative mRNA splicing. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 133-55.
- Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 2002; 297: 1007-13.
- Stott FJ, Bates S, James MC, et al. The alternative product from the human *CDKN2A* locus, p14 (ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998; 17: 5001-14.
- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/*CDKN2* in primary human tumours. *Nat Genet* 1995; 11: 210-2.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, et al. The *Ink4a* tumor suppressor gene product, p19^{Arf}, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; 92: 713-23.
- Pawlak WZ, Wawrocka-Pawlak M, Szczylak C. Biologia molekularna czerniak skóry. *Współcz Onkol* 2003; 7: 548-55.
- Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994; 8: 27-32.
- Sakano S, Berggren P, Kumar R, Steinbeck G, Adolfsson J, Onelöv E, Hemminki K, Larsson P. Clinical course of bladder neoplasms and single nucleotide polymorphisms in the *CDKN2A* gene. *Int J Cancer* 2003; 104: 98-103.
- Kratzke RA, Otterson GA, Lincoln CE, Ewing S, Oie H, Geradts J, Kaye FJ. Immunohistochemical analysis of the p16^{INK4} cyclin-dependent kinase inhibitor in malignant mesothelioma. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87: 1870-5.
- Randerson-Moor JA, Harland M, Williams S, et al. A germline deletion of p14 (ARF) but not *CDKN2A* in a melanoma-neural system tumour syndrome family. *Hum Molec Genet* 2001; 10: 55-62.
- Liu Q, Yan YX, McClure M, Nakagawa H, Fujimura F, Rustgi AK. MTS-1 (*CDKN2*) tumor suppressor gene deletions are a frequent event in esophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Oncogene* 1995; 10: 619-22.
- Hussusian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994; 8: 15-21.
- MacKie RM, Andrew N, Lanyon WG, Connor JM. *CDKN2A* germline mutations in U.K. patients with familial melanoma and multiple primary melanomas. *J Invest Dermatol* 1996; 111: 269-72.
- Rizos H, Puig S, Badenas C, Malveyh J, Darmanian AP, Jiménez L, Milà M, Kefford RF. A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14^{ARF}. *Oncogene* 2001; 20: 5543-7.
- Parry D, Peters G. Temperature-sensitive mutants of p16^{CDKN2} associated with familial melanoma. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3844-52.

32. Petronzelli F, Sollima D, Coppola G, Martini-Neri ME, Neri G, Genuardi M. CDKN2A germline splicing mutation affecting both p16 (ink4) and p14 (arf) RNA processing in a melanoma/neurofibroma kindred. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31: 398-401.
33. Harland M, Mistry S, Bishop DT, Bishop JA. A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2679-86.
34. Xu N, Chen CY, Shyu AB. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4611-21.
35. Kozak M. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 5134-42.
36. St Johnson D. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 1995; 81: 161-70.
37. Madireddi MT, Dent P, Fisher PB. Regulation of mda-7 gene expression during human melanoma differentiation. *Oncogene* 2000; 19: 1362-8.
38. Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, Hayward N. CDKN2A variants in a population-base sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 446-52.
39. Kumar R, Smeds J, Berggren P, Straume O, Rozell BL, Akslen LA, Hemminki K. A single nucleotide polymorphism in the 3'untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *Int J Cancer* 2001; 95: 388-393.
40. Sauroja I, Smeds J, Vlaykova T, et al Analysis of G (1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 404-14.
41. Lamperska K, Przybyła A, Kycler W, Mackiewicz A. The CDKN2a common variants: 148 Ala/Thr and 500 C/G in 3' UTR and their association with clinical course of melanoma. *Acta Biochim Polon* 2007; 54: 119-24.
42. Lamperska K, Przybyła A, Kaczmarek A, Leporowska E, Mackiewicz A. Podłoże genetyczne czerniaka – badania własne i przegląd piśmiennictwa. *Współtżc Onkol* 2006; 10: 297-302.
43. Randerson-Moor JA, Gaut R, Turner F, et al. The relationship between the epidermal growth factor (EGF) 5'UTR variant A61G and melanoma/nevus susceptibility. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 755-9.
44. Okamoto I, Roka F, Kroegler J, et al. The EGF A61G polymorphism is associated with disease-free period and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2242-6.
45. Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N, Hogg D. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nat Gen* 1999; 21: 128-32.

Adres do korespondencji

mgr biotech. **Łukasz Kwinta**
Zakład Immunologii Nowotworów
Katedra Biotechnologii Medycznej
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Wielkopolskie Centrum Onkologii
ul. Garbary 15
61-866 Poznań
e-mail: lukasz.kwinta@wp.pl