

W 41 przypadkach sporadycznego pierwotnego czerniaka oka badano ekspresję białka p16, mutacje punktowe i metylację wysp CpG w obrębie promotora genu p16. Ekspresję białka p16 oceniano immunohistochemicznie, a mutacje przy użyciu techniki PCR-SSCP. Metylację wysp CpG w obrębie odcinka promotorowego badano stosując reakcję PCR po uprzedniej modyfikacji DNA. W 15 proc. przypadków czerniaka naczyńniówki w mniej niż 10 proc. komórek nowotworowych stwierdzono obecność białka p16, w 70 proc. przypadków obecność białka stwierdzono w mniej niż 50 proc. komórek nowotworowych, a w 7 proc. przypadków ekspresję białka p16 stwierdzono w ponad 80 proc. komórek nowotworowych. Stopień ekspresji białka p16 był związany z typem histopatologicznym, a nie ze stopniem histologicznej inwazyjności tego nowotworu. W badanym materiale nie stwierdzono mutacji punktowych ani metylacji wysp CpG w obrębie odcinka promotorowego genu p16. W dwóch przypadkach stwierdzono polimorfizm w kodonie 84 (GAC/GAT).

**Słowa kluczowe:** czerniak oka, mutacje, metylacja wysp CpG, gen p16, ekspresja białka p16

*In 41 cases of sporadic primary uveal melanoma expression of p16, mutations in coding region and methylation of CpG islands in promotor region were studied. Expression of p16 was studied by immunohistochemistry and recorded by assessment of proportion of positive tumor cells and staining intensity. Results were expressed as staining index (IRS). Point mutations and mrthylation of CpG islands in promotor region of this gene were analyzed by PCR-SSCP method and PCR combined with chemical modification of studied DNA. In 15% of cases less than 10% of melanoma cells were p16 positive, in 70% of cases less than 50% of cells, while in 7% more than 80% of cells stained for p16 (mean IRS for all cases was 4.87-2.73). Analysis of intragenic mutations revealed in two patients substitution in codon 84 GAC/GAT – silent mutation. No methylation in CpG island in promotor region of p16 was found.*

**Key words:** uveal melanoma, mutations, methylation of CpG islands, p16 gene, expression of p16 protein

# Analiza ekspresji białka oraz mutacji i metylacji wysp CpG p16 w komórkach pierwotnego sporadycznego czerniaka oka

*Expression of p16 in sporadic primary uveal melanoma*

K. Mackiewicz, K. Lamperska, A. Kaczmarek, E. Kwiatkowska, M. Starzycka, B. Romanowska, J. Heitzman, J. Stachura, A. Mackiewicz

Zakład Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej w Poznaniu, Wielkopolskie Centrum Onkologii

## WSTĘP

W 13 proc. przypadków czerniak rozwija się w obrębie gałki ocznej, co sprawia, że gałka oczna jest drugim, co do częstości pierwotnym miejscem występowania tego nowotworu. Pomimo że czerniak skóry, jak i czerniak oka rozwijają się z tej samej komórki – melanocyta – biologia tych dwóch nowotworów znacznie się różni. Różnice przebiegu klinicznego obu typów czerniaka mogą być spowodowane różnicami anatomicznymi lub odpowiedzi immunologiczną; oko należy do tzw. narządów immunologicznie uprzywilejowanych [1]. Prawdopodobnie inne czynniki, w tym genetyczne biorą również udział w powstawaniu i przebiegu tego nowotworu. W przypadkach np. czerniaka skóry udało się zidentyfikować niektóre czynniki genetyczne, zaangażowane w jego powstawanie i progresję. Szczególne zainteresowanie budzą ostatnio zmiany w genie p16, zarówno w przypadkach sporadycznie występujących czerniaków skóry, jak i w dziedzicznych jego formach [2]. Gen p16 (CDKN2A) został zlokalizowany na chromosomie 9p21. Gen ten koduje dwa białka: p16 i p19ARF. To drugie białko powstaje na drodze alternatywnego składowania niedawno zidentyfikowanego eksonu 1B [3]. Obydwa białka są inhibitorami kinaz zależnych od cyklin CDK4, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego. Z tej przyczyny gen p16 został zaliczony do grupy genów supresorowych. Mutacje w obrębie części kodującej, jak i wyciszenie ekspresji p16 na skutek metylacji wysp CpG w obrębie odcinka promotorowego tego genu są często znajdowane w liniach komórkowych czerniaka. Również tego typu zmiany zostały stwierdzone w sporadycznych czerniakach skóry, jednak z mniejszą częstotliwością. Zmiany te nie są jedynymi mechanizmami powodującymi zmianę ekspresji białka p16. Analogiczne badania nie były do tej pory prowadzone w przypadkach sporadycznych pierwotnych czer-

niaków oka. W związku z tym podjęto analizę ekspresji białka p16 w różnych typach histopatologicznych czerniaka naczyńniówki w powiązaniu z ewentualnymi zmianami w genie p16. W tym celu badano ekspresję białka p16 przy użyciu technik immunohistochemicznych oraz zmian w obrębie genu p16 przy użyciu techniki PCR-SSCP i analizy metylacji wysp CpG w obrębie odcinka promotorowego.

## MATERIAŁ I METODY

Tkanekę nowotworową pobrano od 41 chorych (średnia wieku 56 lat, 21 do 77 lat). W 37 przypadkach czerniak był zlokalizowany w naczyńniówce, w 4 przypadkach w naczyńniówce i ciałku rzęskowym. Po usunięciu gałki ocznej, tkanka nowotworowa została podzielona na dwie części. Część utrwalono w formalinie i przeprowadzono badania histologiczne, ta część tkanki służyła również do testów immunohistochemicznych. Pozostała część tkanki nowotworowej została zamrożona w ciekłym azocie i posłużyła do ekstrakcji DNA. Typ histopatologiczny czerniaków naczyńniówki przeprowadzono na podstawie zmodyfikowanego systemu Callendera [4]. Rozpoznano 2 przypadki czerniaka wrzecionowatokomórkowego typu B, 11 przypadków wrzecionowatokomórkowego typu A + B oraz 28 przypadków typu mieszanego.

## Immunohistochemia

Ekspresję białka p16 badano w tkance czerniakowej immunohistochemicznie z wykorzystaniem znakowanych przeciwciał (streptowidyna/biotyna) w skrawkach parafinowych. Skrawki o grubości 4 µm były odparafinowane w ksylenie, a następnie intensywnie płukane. Melaninę zawartą w skrawkach tkanki nowotworowej likwidowano poprzez działanie 0,25 proc. roztworem nadmanganianu potasowego przez 30 minut, intensywnie płukanie bieżącą wodą i działanie 5 proc. roztworem

kwasu szczawiowego przez 2 do 5 minut. Endogenna peroksydaza była blokowana w 1 proc. roztworze  $H_2O_2$  przez 30 minut, a nieswoiste wiązania blokowano w roztworze albuminy bydlęcej. Inkubację ze swoistym przeciwciałem anty p16 przeprowadzano w rozcieńczeniu 1:1500 w temperaturze 40°C przez noc. Następnie inkubowano z przeciwciałem biotynylowanym, płukano w PBS, barwiono hematoksyliną i odwadniano w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu i trzech zmianach ksylenu. W końcowym etapie zamaryowano w balsamie kanadyjskim.

Przeprowadzono również reakcje kontrolne polegające na stosowaniu surowicy mysiej w miejsce swoistego przeciwciała anty p16.

### Isolacja genomowego DNA

Genomowe DNA izolowano z zamrożonych w ciekłym azocie tkanek nowotworowych po ich shomogenizowaniu. Stosowano standardową metodę z proteinazą K, kilkakrotną ekstrakcją fenolem i chloroformem oraz precypitację etanolem. W przypadku tkanek nowotworowych zawierających dużą ilość melaniny, uzyskane DNA oczyszczano z zastosowaniem zestawu Wizard (Promega) lub kolumnienek do oczyszczania DNA (Qiagen) odpowiednio według zaleceń producenta.

### Analiza PCR-SSCP

Do wyszukiwania mutacji punktowych zastosowano technikę PCR-SSCP z wykorzystaniem następujących par starterów:

dla p16 eksonu 1: 1/16F: GGGAGCAG-CATGGAGCCG; 1/16R: AGTCGCCCGC-CATCCCCT; dla eksonu 2 genu p16: 2A/16F: AGTTCCCTTCCGTCATG, 2A/16R: CCAG-GTCCACCGGCAGA; 2B/16F: AGCCCA-ACTGCGCCGAC, 2B/16R: CCAGGTCCAC-CGGCAGA, 2C/16F: TGGACGTGCGGATGC, 2C/16R: GGAAGCTCTCAGGGTACAAATTC; dla eksonu 3 genu p16: 3/16F: CCGGTAGG-GACGGCAAGAGA, 3/16R: CTGTAGGACC-CTCGGTGACTGATGA. Startery przed reakcją PCR znakowano radioizotopem  $P^{32}$   $\gamma$ ATP (3000Ci/mmol, Amersham) na 5' końcu. Reakcję PCR wykonywano w objętości 5  $\mu$ l. Do jednostkowej reakcji stosowano następujące ilości reagentów: 1 x bufor do PCR, 1,5 mM  $MgCl_2$ , dNTPs 0,2 mM, startery 1  $\mu$ l, 6 proc. DMSO, Taq polimerazę 2,5 U/100  $\mu$ l oraz 50 ng genomowego DNA. Do powielenia odpowiednich fragmentów genu p16 stosowano 35 cykli o następującym profilu termicznym: 94C/5'; 94C/30'', 55C/30'', 72C/30''; 72C/5' – dla fragmentów eksonu 2 oraz: 94C/5'; 94/30'', 58C/30'', 72C/30''; 72C/5' dla eksonów 1 i 3. Zamplikowane fragmenty mieszało następnie z 95 proc. formamidem w stosunku 1/9. Po denaturacji termicznej 95C/5' nakładano po 3  $\mu$ l mieszaniny na 5 proc. żel poliakryloamidowy z dodatkiem 10 proc. glicerolu. Rozdział SSCP prowadzono w temperaturze pokojowej przy stałej mocy wynoszącej 15 W. Po rozdzieleniu żele przenoszono na bibułę typu Whatman 3 MM, suszono i następnie poddawano autoradiografii.

### Sekwencjonowanie

Pasma wykazujące inną w stosunku do pozostałych migrację wycinano z żelu, eluowano do wody, a następnie poddawano reamplifikacji. Otrzymane tą drogą produkty PCR nanoszono na 1,5 proc. żel agarozowy, a po elektroforezie wycinano i oczyszczano z wykorzystaniem zestawu do ekstrakcji DNA (Qiagen). Oczyszczone w ten sposób produkty reakcji PCR stanowią matrycę do cyklicznego sekwencjonowania z zastosowaniem fmoI zestawu sekwencyjnego (Promega). Produkty reakcji sekwencjonowania nanoszono na 6 proc. żel poliakryloamidowy zawierający 7,5 M mocznik. Po elektroforezie żel przenoszono na bibułę Whatman 3 MM, suszono i poddawano autoradiografii.

### Analiza metylacji wysp CpG odcinka promotorowego genu p16

Całkowite genomowe DNA poddawane było modyfikacji 3 M dwusiarczkiem sodu z 10 mM hydrochinonem według poprzednio opisanej metody [5]. Po modyfikacji DNA oczyszczano przy użyciu zestawu Wizard (Promega) i eluowano do wody. Reakcję kończono poprzez dodanie NaOH. Następnie DNA precypitowano etanolem, które tak przygotowane stanowiło matrycę w reakcji PCR z odpowiednio dobranymi starterami [5]. Reakcję przeprowadzano w objętości 10  $\mu$ l, stosując następujący profil termiczny: 95C/10''; 95C/45'', 60C/45'', 72C/60''; 72C/5''; cyklle te powtarzano 35 razy. Otrzymane produkty PCR analizowano w 2 proc. żelu agarozowym.

### Statystyka

Analiza statystyczna wyników przeprowadzona została z wykorzystaniem testów t-Studenta,  $\chi^2$  i korelacji Spearman'a.

### WYNIKI

#### Analiza immunohistochemiczna białka p16 w komórkach czerniaka oka

Większość pozytywnie zabarwionych komórek wykazywała obecność białka p16 w jądrze komórkowym (ryc. 1.). W kilku przypadkach obserwowano p16 zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie. W jednym przypadku czerniaka nie wykryto obecności p16 (PP-0), w 6 przypadkach obserwowano mniej niż 10 proc. pozytywnie zabarwionych komórek (PP-1), w 22 przypadkach było 10-50 proc. p16 pozytywnych komórek (PP-2), w 9 przypadkach 50-80 proc. (PP-3), a w 3 przypadkach było więcej niż 80 proc. pozytywnych komórek (PP-4). Na rycinie 1. pokazano przykład reakcji immunohistochemicznej.

#### Analiza PCR-SSCP

W preparatach DNA izolowanego z tkanek czerniakowej pochodzącej od dwóch chorych zaobserwowano różnice migracji konformerów w elektroforezie SSCP. Po sekwencjonowaniu stwierdzono substytucję w kodonie 84 GAC/GAT, która nie powoduje zmiany kodowanego aminokwasu (Asp/Asp).

#### Analiza metylacji wysp CpG w obrębie promotora genu p16

Produkty PCR otrzymano jedynie w reakcji z zastosowaniem starterów pozwalających na powielenie fragmentów niemetylowanych. Ze starterami umożliwiającymi powielenie fragmentu promotora genu p16 zawierającego zmetylowane wyspy CpG, produkt reakcji PCR otrzymano jedynie w wypadku zastosowania do tej reakcji matrycy DNA służącej jako kontrola procesu modyfikacji i reakcji PCR.

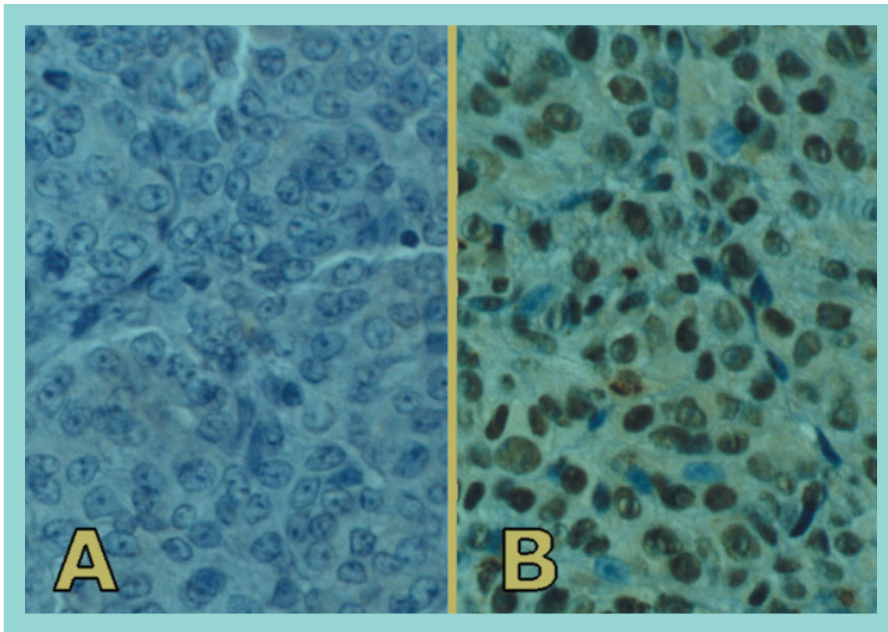
### DYSKUSJA

Analizując otrzymane wyniki można wyciągnąć trzy podstawowe wnioski:

- w czerniaku naczyniówki obserwuje się obniżenie ekspresji białka p16,
- zmiany ekspresji białka p16 można powiązać z typem histologicznym czerniaka naczyniówki,
- mutacje w obrębie genu p16 oraz wyciszenie ekspresji poprzez metylację wysp CpG odcinka promotorowego tego genu nie są mechanizmami zaangażowanymi w obniżenie, bądź utratę ekspresji białka p16 w tym rodzaju czerniaka.

Wybarwione na drodze reakcji immunohistochemicznej białko p16 lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym, ale również białko to obserwowano w cytoplazmie. W analizowanych przez nas czerniakach naczyniówki białko p16 obserwowaliśmy głównie w jądrze komórkowym, a tylko w kilku przypadkach stwierdziliśmy zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie. Zaobserwowano znaczne różnice w ilości pozytywnie wybarwionych komórek i w intensywności wybarwienia pomiędzy poszczególnymi przypadkami. Tylko w jednym przypadku czerniaka nie stwierdzono pozytywnie wybarwionych komórek. W ok. 15 proc. przypadków białko p16 wykryto w mniej niż 10 proc. komórek, a w 70 proc. przypadków w mniej niż 50 proc. komórek. Tylko w 7 proc. przypadków białko p16 obserwowano w ponad 80 proc. komórek. W celu uzyskania bardziej adekwatnych wyników zastosowano indeks barwienia IRS. Statystycznie znaczące różnice zaobserwowano w p16 IRS pomiędzy różnymi typami histopatologicznymi badanych czerniaków oka. Najniższy indeks IRS zaobserwowano w typie mieszanym, a także w przypadkach noszących histologiczne znamiona inwazyjności. Dotychczas ukazało się jedno doniesienie na temat zmian ekspresji białka p16 w sporadycznym czerniaku naczyniówki. W badaniach tych białko p16 lokalizowano zarówno w jądrach komórkowych, jak i w cytoplazmie. Tylko w 45 proc. przypadków obserwowano pozytywne barwienie białka p16, a w badanym materiale liczba wybarwionych komórek wahała się od 5 do 25 proc. Nie zaobserwowano natomiast korelacji pomiędzy typem histopatologicznym a zmianami ekspresji białka p16. Być może rozbieżność powyższych wyników z uzyskanymi w tej pracy spowodowana jest użyciem innymi przeciwciał do detekcji białka p16 w badanych tkankach. Coupland i wsp. [6] w swoich badaniach, do analizy białka p16 stosowali przeciwciała monoklonalne, podczas gdy w tej pracy stosowaliśmy przeciwciała poliklonalne. Ze względu na znikomą ilość danych doty-





**Ryc. 1. Immunohistochemiczna lokalizacja białka p16, czerniak oka**  
**A) kontrola – bez pierwszego przeciwciała; B) z anty p16**

czących zmian ekspresji białka p16 w czerniakach oka nasze badania odnieśliśmy do tych prowadzonych w czerniakach skóry. W badaniach Reed i wsp. [7] pokazano, że p16 ulega ekspresji na normalnym poziomie w przypadku czerniaków *in situ* i w większości czerniaków pierwotnych. W 52 proc. przypadków pierwotnych czerniaków i w przypadku 72 proc. inwazyjnych obserwowano częściową lub zupełną utratę ekspresji białka p16. Podobne wyniki uzyskano w pracach Grovera i wsp. [8], w których wykazano ekspresję p16 w 96 proc. łagodnych znamion barwnikowych i znaczącą redukcję ekspresji w czerniakach pierwotnych (31 proc. badanych przypadków) i przerzutowych (63 proc. badanych przypadków). Również inni autorzy obserwowali utratę ekspresji białka p16 w inwazyjnych stadiach czerniaka [9]. Wyniki te sugerują, że utrata ekspresji białka p16 nie jest związana z samym etapem transformacji nowotworowej, pojawia się natomiast w bardziej zaawansowanych stadiach i raczej towarzyszy chorobie przerzutowej [10].

Jest kilka możliwych mechanizmów inaktywacji p16 w czerniakach skóry i oka, należą do nich: homozygotyczne delecje [11], LOH [12], mutacje w obrębie części kodującej genu, metylacja wysp CpG w obrębie promotora genu [13] i niestabilność odcinków mikrosatelitarnych [14]. W tej pracy badaliśmy dwa z wyżej wymienionych mechanizmów. Mutacje w genie p16 znajdowane były w liniach komórkowych czerniaka. Znajdowano również mutacje dziedziczne w tym genie w przypadkach rodzinnego występowania czerniaka skóry. Mutacje somatyczne są również obserwowane w tkankach czerniaka, ale z niższą częstotliwością [15]. Pomimo to, małe delecje i mutacje punktowe znajdowane w obrębie genu p16 występują i mogą prowadzić do utraty produktu białkowego tego genu [16]. My również analizowaliśmy DNA z tkanki nowotworowej pod kątem tego typu zmian stosując technikę PCR-SSCP. W dwóch przypadkach stwierdziliśmy substytucję C/T. Mutacja ta jednak nie powoduje zmiany kodowanego

aminokwasu. Innych mutacji nie stwierdziliśmy w badanym materiale, podobnie jak inni autorzy analizujący zmiany w genie p16 w czerniakach oka [17]. W związku z powyższym przeprowadziliśmy analizę metylacji wysp CpG w obrębie odcinka promotorowego genu p16. W badanym przez nas materiale nie stwierdziliśmy tego typu zmian. Merbs i Sidransky [18] obserwowali metylację w obrębie promotora genu p16 w dwóch na 33 przypadki. Wyniki te mogą sugerować zatem, że wyżej wymienione sposoby inaktywacji genu p16 nie są charakterystyczne dla czerniaka naczyniówki. W poszukiwaniu innych przyczyn zmniejszenia lub utraty ekspresji białka p16 w czerniakach oka analizowano np. markery mikrosatelitarne. LOH w obrębie loci 9p21 i 9p21-22 zaobserwowano w 24 proc. i 32 proc. przypadków czerniaków oka. LOH w obrębie 9p21 jest często znajdowana w przypadku sporadycznych czerniaków skóry. Wyniki uzyskane w czerniakach pierwotnych i przerzutowych wskazują, że LOH pojawia się w późniejszych stadiach rozwoju czerniaka skóry [19]. W badaniach tych nie analizowano jednak poziomu ekspresji białka p16. Związek pomiędzy LOH 9p21, a utratą lub zmniejszoną ekspresją białka p16 w czerniakach oka jest więc spekulatywny. Można oprzeć się jedynie na badaniach przeprowadzonych w czerniaku skóry, w których wykazano, że zmiany w ekspresji białka p16 miały związek z LOH [19]. Możliwość tą mamy zamiar sprawdzić w dalszych badaniach, w których wykorzystamy materiał pochodzący od większej liczby chorych.

**PIŚMIENNICTWO**

- Garner A, Klintworth GK. *Pathobiology of ocular disease: a dynamic approach*. Marcel Dekker Inc, New York 1994.
- Fountain JW, Bale SJ, Housman DE, Dracopoli NC. *Genetics of melanoma*. Cancer Surv 1990; 9:645-671.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, et al. *Tumor suppression of the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF*. Cell 1997; 91:649-659.

- McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE, et al. *Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology*. Am J Ophthalmol 1983; 96:502-509.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:9821-9826.
- Coupland SE, Bechrakis N, Schuler A, Anagnostopoulos I, Hummel M, Bornfeld N, Stein H. *Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma*. Br J Ophthalmol 1998; 82:961-970.
- Reed JA, Loganzo F, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW, Albino AP. *Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppression gene in melanocytic lesion correlates with invasive stage of tumor progression*. Cancer Research 1995; 55:2713-2718.
- Grover R, Chana JS, Wilson GD, Richman PI, Sanders R. *An analysis of p16 protein expression in sporadic malignant melanoma*. Melanoma Res 1998; 3:167-272.
- Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. *P16 and p21 WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry*. Am J Dermatopathol 1998; 20 (3): 255-261.
- Strume O, Akslen LA. *Alteration and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma*. Int J Cancer 1997; 74:535-539.
- Peng HQ, Bailey D, Bronson D, Goss PE, Hogg D. *Loss of heterozygosity of tumor suppressor genes in testis cancer*. Cancer Research 1995; 55:2871-2875.
- Flores FF, Graeme JW, Glendending JM, Holuska FG, Castresana JS, Rubio M-P, Pastorifide GC, Boyer LA, Kao WH, Bulky ML, Barnhill RL, Hayward NK, Housman DE, Fountain JW. *Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma*. Cancer Research 1996; 58:5023-5032.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers*. Cancer Research 1995; 55:4525-4530.
- Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H. *Mutation of p16 and p15 tumor suppressor genes and replication errors contribute independently to the pathogenesis of sporadic malignant melanoma*. Arch Dermatol Res 1998; 290 (4):175-180.
- Holuska FG, Hodi FS. *Molecular genetics of familial cutaneous melanoma*. J Clin Oncol 1998; 16:670-682.
- Morita R, Fuimoto A, Hatta N, Takehara K, Takata M. *Comparison of genetic profiles between primary melanomas and their metastases reveals alterations and clonal evolution during progression*. J Invest Dermatol 1998; 111 (6):919-24.
- Ruiz A, Puig S, Lynch M, Castel T, Estivill X. *Retention of the CDKN2A locus and low frequency of point mutations in primary and metastatic cutaneous malignant melanoma*. Int J Cancer 1998; 76 (6):312-316.
- Morita R, Fuimoto A, Hatta N, Takehara K, Takata M. *Comparison of genetic profiles between primary melanomas and their metastases reveals alterations and clonal evolution during progression*. J Invest Dermatol 1998; 111 (6):919-24.
- Ruiz A, Puig S, Lynch M, Castel T, Estivill X. *Retention of the CDKN2A locus and low frequency of point mutations in primary and metastatic cutaneous malignant melanoma*. Int J Cancer 1998; 76 (6):312-316.
- Merbs SL, Sidransky D. *Analysis of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) alterations in primary sporadic uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40 (3):779-783.
- Funk JO, Schiller PI, Barrett MT, Wong DJ, Kind P, Sander CA. *P16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma*. J Cutan Pathol 1998; 6:291-296.

**ADRES DO KORESPONDENCJI**

prof. dr hab. med. **Andrzej Mackiewicz**  
 Zakład Immunologii Nowotworów  
 Akademii Medycznej  
 Wielkopolskie Centrum Onkologii  
 ul. Garbary 15  
 61-866 Poznań

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych, nr projektu: 339/P05/97/12.*  
*Autorzy dziękują dr. P. Wysockiemu za pomoc w przygotowaniu manuskryptu.*