

Genetyczne uwarunkowania czerniaka

The genetics of melanoma

Urszula Brudnik¹, Anna Wojas-Pelc¹, Wojciech Branicki²

¹Katedra i Klinika Dermatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, kierownik Katedry i Kliniki: dr hab. med. Anna Wojas-Pelc

²Instytut Ekspertyz Sądowych, kierownik Instytutu: prof. dr hab. med. Wojciech Piekoszewski

Post Dermatol Alergol 2006; XXIII, 1: 21–25

Streszczenie

Badania dotyczące czerniaka skupiają się na wzajemnych interakcjach czynników genetycznych i środowiskowych, biorących udział w patogenezie tego groźnego nowotworu.

Największym postępem w badaniach nad genetyką czerniaka było odkrycie roli genów regulatorowych cyklu komórki – *CDK2a* i *CDK4*. Obecnie trwają poszukiwania innych genów, mogących odgrywać rolę w powstawaniu tego nowotworu. W pracy omówiono najnowsze doniesienia dotyczące genu *MC1R* (gen dla receptora typu pierwszego dla melanokortyny) oraz genów: *PTEN*, *BRAF*, *NRAS*. Poszukiwania wzajemnych oddziaływań tych genów (epistaza) oraz ich interakcji ze środowiskiem w konsekwencji mają służyć identyfikacji osób o zwiększonym ryzyku rozwoju czerniaka.

Słowa kluczowe: czerniak, genetyka, *CDKN2a*, *MC1R*.

Abstract

Melanoma is an important public health issue and research strategies are trying to elucidate the relative contribution of genes and environmental factors in its causation. In terms of genetic factors the discovery of cell cycle genes – *CDKN2a*, *CDK4* – has been a great advance. Current studies aim to identify other susceptibility genes and to determine the interactions of the various genetic and environmental factors. Among them, *MC1R* (Melanocortin-1 receptor gene), *PTEN*, *BRAF*, *NRAS* are being analysed more closely. Epistatic (gene-gene) and gene environmental interactions studies aim to recognize individuals at high risk.

Key words: melanoma, genetics, *CDKN2a*, *MC1R*.

Powstawanie nowotworu jest złożonym procesem, u którego podstaw leży utrata prawidłowej kontroli nad wzrostem i różnicowaniem komórek. W trakcie onkogenezy można wyodrębnić sekwencję następujących po sobie zdarzeń. Proces rozpoczyna faza inicjacji zmian na poziomie molekularnym, która po etapie promocji przechodzi w fazę progresji, polegającą na stopniowym pojawianiu się w komórce coraz większej liczby zmutowanych genów, aż do takiej akumulacji mutacji w komórce, która prowadzi do wyczerpania przez nią mechanizmów kontrolujących i do rozpoczęcia procesu nowotworowego. Zdarzenia te prowadzą do destabilizacji funkcji genomu. Nowotwory złośliwe można więc zaliczyć do swoistego rodzaju chorób genetycznych, a konstytucja genetyczna odgrywa istotną rolę w osobniczej wrażliwości na proces nowotworowy.

Większość zdarzeń genetycznych wywołujących proces nowotworowy ma miejsce w tkankach somatycznych w trakcie życia jednostki. Na ich powstawanie mają wpływ czynniki środowiskowe, tzw. kancerogeny. Mimo że są to zjawiska genetyczne, nie są one dziedziczne. Mutacje mogą również wystąpić w komórkach rozrodczych (ang. *germline*) i wówczas są przekazywane kolejnym pokoleniom, co prowadzi do pojawienia się rodzin o wysokiej częstości występowania określonych nowotworów. To właśnie wieloletnie obserwacje występowania niektórych nowotworów u osób spokrewnionych doprowadziły do wzrostu zainteresowania genami, które mogą brać udział w procesie onkogenezy. Badania prowadzone w rodzinnych zespołach nowotworowych zaowocowały lepszym zrozumieniem podstaw molekularnych patogenezy złośliwego nowotworzenia, równocześnie otwierając nowe możliwości nowo-

Adres do korespondencji: lek. med. Urszula Brudnik, Katedra i Klinika Dermatologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, ul. Kopernika 19, 31-501 Kraków, tel./faks+48 12 424 74 00, e-mail: piecuch@mp.pl

czesnej terapii zmierzającej do naprawy defektów genetycznych kluczowych w powstawaniu guza.

Ponad 100 lat temu u chorych na czerniaka (MM – *melanoma malignum*) wykazano obecność predyspozycji genetycznej, sprzyjającej rozwojowi nowotworu. Jednak dopiero niedawno, w związku z rozwojem nowych możliwości biologii molekularnej, zintensyfikowano prace nad genami predysponującymi do rozwoju czerniaka.

U podstaw genetycznych transformacji nowotworowej komórki melanocyta leżą zaburzenia funkcjonowania dotyczące wielu szeroko rozumianych klas genów: supresorowych (hamują podziały komórkowe), protoonkogenów (aktywują namnażanie komórek), *MHC* – kontroli immunologicznej, genów nadzorujących naprawę mutacji w ludzkim genomie oraz genów związanych z procesami angiogenezy, adhezji komórek, komunikacji międzykomórkowej. Dwuuderzeniowa teoria kancerogenezy Knudsona, dotycząca rozwoju nowotworu zakłada wyzwalenie przez kancerogeny (w przypadku czerniaka – przede wszystkim światło słoneczne) uszkodzeń obydwu alleli danego genu (nowotwór występujący sporadycznie) lub jednego allelu u tych osób, które posiadają już dziedzicznie przekazaną mutację drugiego allelu (nowotwór rodzinny).

Większość autorów jest zgodna co do tego, że 5–12% czerniaków ma podłoże dziedziczne [1]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na współistnienie czerniaka z innymi nowotworami, najczęściej z gruczolakorakiem trzustki [1]. U dwóch rodzin, włoskiej oraz szwedzkiej, wykazano współistnienie czerniaka z rakiem piersi [2]. Doniesienia te jednak wymagają dalszych, bardziej szczegółowych, badań.

Przełomem w badaniach nad genetyką czerniaka było odkrycie przez naukowców z Utah w 1994 r. mutacji genu *CDKN2a/MTS1/INK4A*, zlokalizowanego na chromosomie 9p21 u osób z rodzinną postacią czerniaka [3]. Jest to gen z grupy supresorów kodujący 2 białka: p16 – hamujące fosforylację pRb (białka z rodziny retinoblastoma) oraz p14 o alternatywnej ramce odczytu (ang. *Alternative Reading Frame*), które poprzez wiązanie białka MDM2, biorącego udział w degradacji p53, zwiększa aktywność p53. Obydwa białka: pRb i p53 poprzez swój hamujący wpływ na cykl komórkowy odgrywają ważną rolę w procesie apoptozy komórek. Gen *p16* jest dziedziczony w sposób autosomalny dominujący. Produkt tego genu – białko p16 jest inhibitorem kinaz cyklinozależnych (CDK4, CDK6). Komórki znajdujące się w aktywnej metabolicznie fazie G1, podczas której odbywa się naprawa DNA uszkodzonego np. przez promieniowanie UV, aby mogły zsyntetyzować DNA i przejść do następnej fazy, muszą pokonać punkt kontrolny G1-S. Krytycznym ogniwem tej kontroli jest białko p16, które przyłącza się pomiędzy CDK4 lub CDK6 a cykliną D1, hamując tym samym funkcję tych kinaz, a w konsekwencji pośrednio fosforylację pRb i uwolnienie E2F1 – białek inicjujących transkrypcję. Białko pRb wykazuje dużą aktywność wówczas, gdy jest mało ufosforylowane, a jego działanie słabnie wraz ze wzrostem stopnia fosforylacji przez kinazy zależne od cyklin. Aktywne pRb wiąże kompleks transkryp-

cyjny E2F i dezaktywuje go. Kompleks ten jest niezbędny do przejścia komórki w fazę S. Efektem działania *p16* jest zatem uniemożliwienie transkrypcji kluczowych genów i zatrzymanie komórek w punkcie segregacji G1-S (ryc. 1.) W przypadku mutacji genu *p16* komórki, również te z uszkodzonym DNA, w sposób niekontrolowany przechodzą przez punkt kontrolny i rozpoczynają podział. Mutacje genów supresorowych (w tym *p16*) stwierdzano głównie w komórkach rozrodczych i dlatego są związane z zespołami nowotworów dziedzicznych. Mutacje genu *CDKN2a/p16* są najprawdopodobniej odpowiedzialne za 25% przypadków rodzinnego występowania czerniaka na świecie [4]. Należy tutaj zaznaczyć, że częstość występowania mutacji genu *CDKN2a* w ogólnej populacji nie jest znana.

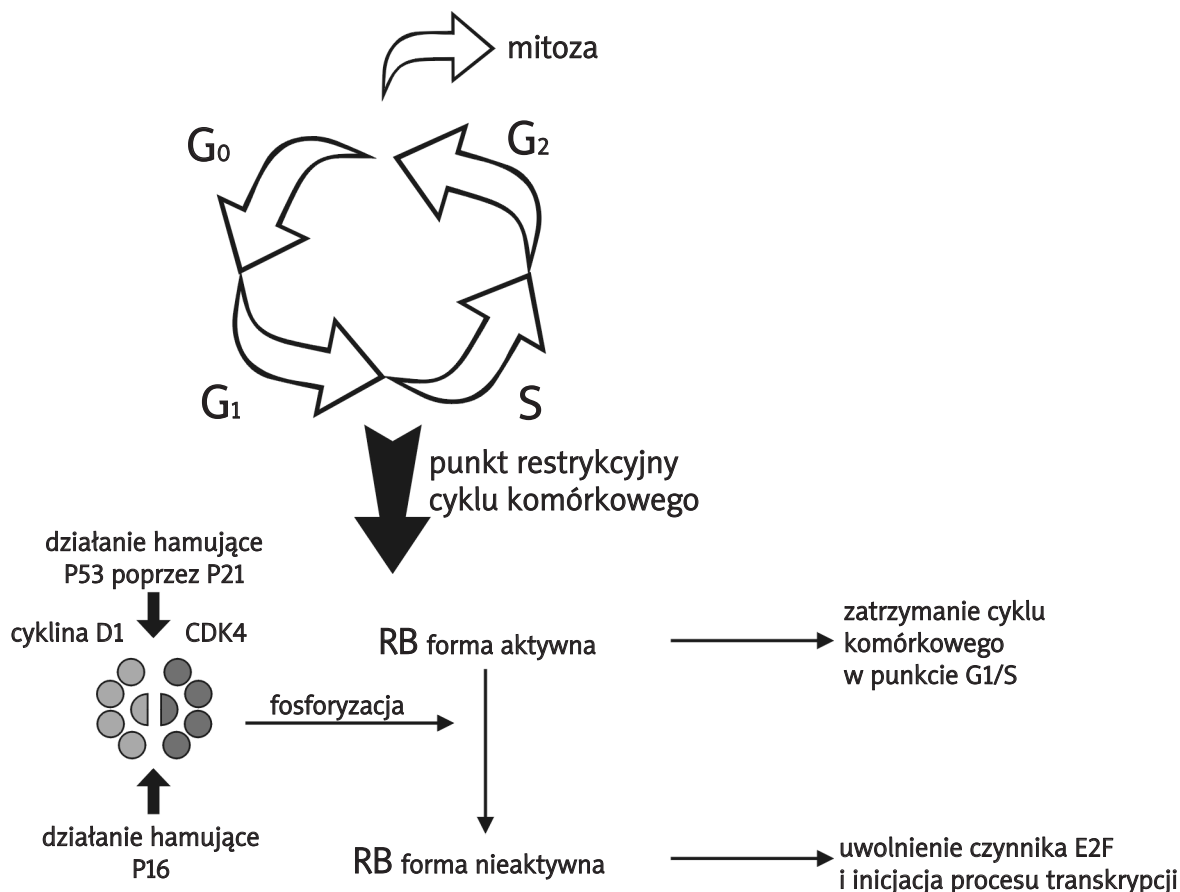
Genetycznie uwarunkowane i rodzinnie występujące nowotwory, takie jak rak piersi czy rak jelita grubego, charakteryzują się tym, że pojawiają się u ludzi młodych, najczęściej przed 40. rokiem życia. Tsoa i wsp. [5] przebadali 49 pacjentów z czerniakiem w kierunku mutacji w genach *CDKN2a* i *CDK4*, których średnia wieku w momencie wykrycia choroby wynosiła 32 lata. Tylko u 1 z nich stwierdzono mutację genu *CDK2a*, stąd wniosek, że dobór pacjentów do badań genetycznych wyłącznie pod kątem wieku, w przypadku czerniaka nie jest trafny.

W innym badaniu Berwick i wsp. [6] oceniali rolę mutacji genu *INK4a* u chorych, u których czerniak wystąpił jednorazowo, oraz u chorych z wieloma nieprzerzutowymi ogniskami czerniaka. U 8% chorych z mnogimi zmianami wykazano mutację w tym genie. U wszystkich chorych z pojedynczym czerniakiem stwierdzono allele niezmiennione.

We wcześniejszej pracy Monzon i wsp. [7] przebadali 33 chorych z mnogimi pierwotnymi ogniskami czerniaka oraz z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku MM. Wśród nich 5 miało mutację w genie *p16*, a dodatkowo w 3 przypadkach krewni tych pacjentów mieli tę samą mutację. Dane te sugerują konieczność badań genetycznych również u członków rodzin takich pacjentów.

Drugi z genów – *CDK4*, kodujący cyklinozależną kinazę 4, jest protoonkogenem zlokalizowanym na chromosomie 12q13. Produkt tego genu łączy się z cykliną D1 i powstały kompleks przyspiesza przejście z fazy G1 do S. Wykryte mutacje tego genu powodujące *nabycie funkcji* (ang. *gain of function mutations*) prowadzą do przekształcenia protoonkogeny w aktywny onkogen. Produkt zmutowanego genu *CDK4* nie powoduje zmniejszenia aktywności kompleksu z cykliną D1, natomiast hamuje przyłączenie się do *CDK4* białka p16, co w efekcie czyni kinazę *CDK4* niewrażliwą na wpływ niezmutowanego produktu genu *p16*. Około 10% komórek czerniaka w hodowlach komórkowych posiada mutację R24C (zamiana argininy na cysteinę) w obrębie genu *CDK4*. Mutacji tej nie obserwuje się w komórkach macierzystych, dotyczy ona wyłącznie genów tkankowych. Do tej pory mutacje tego genu zostały opisane u 2 rodzin amerykańskich oraz 1 francuskiej [8].

Jednak większość z występujących na świecie przypadków czerniaka jest sporadyczna, dlatego zdecydowa-



Rb – białko z rodziny retinoblastoma; E2F – czynniki transkrypcyjne; CDK4 – cyklinozależna kinaza 4; G0, G1, G2, S – fazy cyklu komórkowego

Ryc. 1. Cykl komórkowy oraz regulacja punktu restrykcyjnego G1/S

na przewagę badań dotyczy mutacji genów w komórkach somatycznych, które mogą odgrywać rolę w patogenezie tego groźnego nowotworu.

Obiecujące są badania Duncana i wsp. [9], którzy wykazali, że ilość mRNA melastatyny – białka specyficznego dla melanocytów – jest odwrotnie proporcjonalna do zdolności przerzutowania danego czerniaka, niezależnie od jego grubości. Analizując ilość mRNA dla melastatyny u 150 chorych z czerniakiem ograniczonym do skóry, autorzy stwierdzili, że spadek mRNA koreluje ze wzrostem inwazyjności nowotworu.

Ciekawe wydają się także doniesienia dotyczące mutacji genów: *NRAS*, *BRAF*, *PTEN/MMAC1* w hodowlach komórek czerniaka. Geny te, należące do wspólnej rodziny ras biorącej udział w przekazywaniu sygnałów mitogennych wewnątrz komórki, wydają się ściśle ze sobą powiązane.

Tsoa i wsp. [10] wykazali zależność pomiędzy aktywacją *NRAS* i inaktywacją *PTEN/MMAC1* w komórkach czar-

niaka. Późniejsze badania zwracają uwagę na związek aktywności genu *BRAF* z aktywnością genu *NRAS* [11]. Wreszcie kolejne badania Tsoa i wsp. [12] sugerują możliwą kooperację pomiędzy aktywacją genu *BRAF* i inaktywacją genu *PTEN* w celu uaktywnienia ścieżki *NRAS* i promocji tumorigenezy.

Gen *PTEN/MMAC1* znajdujący się na chromosomie 10q jest związany z chorobą Cowdena. W badaniach Indsto i wsp. [13] 48% czerniaków dających przerzuty wykazało delecję dużych obszarów w obrębie chromosomu 10q. W innym badaniu w 26% komórek z hodowli czerniaka stwierdzano delecje właśnie w genie *PTEN* [14]. Wyniki tych badań wskazują, że wraz z progresją czerniaka dochodzi do spadku poziomu lipidowo-proteinowej fosfatazy, produktu genu *MMAC1*.

Gen *BRAF*, którego produkt jest jedną z 3 kinaz serynowo-treoninowych, w postaci zmutowanej (wykazującej większą aktywność jako kinaza), występuje statystycznie

częściej u chorych z czerniakiem na skórze w mniejszym stopniu narażonej na działanie promieniowania słonecznego. Chorzy z czerniakiem na skórze w dużym stopniu ekspozycyjni na światło nie wykazują mutacji genu *BRAF* [15]. Badania te sugerują, że do rozwoju czerniaka prowadzi co najmniej 2 niezależne drogi.

Do molekularnego rozróżnienia pomiędzy grupami ryzyka zachorowania na czerniaka u osób o różnych fenotypach i o różnym narażeniu na promieniowanie ultrafioletowe mogą również służyć badania nad polimorfizmem innego genu, kodującego receptor typu pierwszego dla melanokortyny (*MC1R*).

Po ekspozycji na światło słoneczne w skórze dochodzi do zwiększenia melanogenezy poprzez bezpośrednie działanie promieniowania na komórkę melanocyta, zwiększoną lokalną produkcję α -MSH (α -Melanocyte-Stimulating Hormone) oraz dzięki parakrynnemu wpływowi tlenu azotu produkowanego w keratynocytach. α -MSH wiążąc się z receptorem *MC1R* na melanocytach, stymuluje aktywność tyrozynazy poprzez podniesienie poziomu cAMP i w efekcie pobudza proces produkcji melaniny. Pigmentacja skóry jest uwarunkowana występowaniem w niej melaniny, która występuje w dwóch formach: (1) jako barwnik czarnobrózowy, czyli eumelanina, oraz (2) jako barwnik żółtopomarańczowy – feomelanina. Fenotyp barwnikowy skóry zależy od proporcji w zawartości feomelaniny i eumelaniny. Osoby o jasnej karnacji i rudych włosach (tzw. fenotyp RHC – ang. *red hair colour*) wykazują przewagę feomelaniny i ograniczoną zdolność do produkcji eumelaniny. Eumelanina ma charakter fotoprotekcyjny, feomelanina natomiast uwrażliwia tkanki na działanie promieni UV oraz powstających reaktywnych form tlenu. Początkowe etapy powstawania obu odmian barwnika są takie same. Dopakinon to ostatni wspólny prekursor obu barwników. Ostateczna forma melaniny zależy od receptora typu pierwszego dla melanokortyny, który odgrywa kluczową rolę w procesie melanogenezy.

Aktywacja receptora *MC1R* w efekcie prowadzi do produkcji eumelaniny. Zmiany w obrębie białka budującego receptor *MC1R* prowadzą do mniej wydajnej stymulacji produkcji cAMP w porównaniu z receptorem niezmiennym, w odpowiedzi na działanie hormonu α -MSH. Gen dla białka receptorowego *MC1R* jest zlokalizowany na chromosomie 16q24.3 i odpowiada za powstanie 317 aminokwasowego produktu [16].

Prowadzone ostatnio badania genetyczne wykazały, że posiadany wariant genu dla receptora *MC1R* ma istotny wpływ na fenotyp barwnikowy. Niektóre allele genu *MC1R* silnie predysponują do występowania rudych włosów i jasnej karnacji skóry [17]. Na świecie zidentyfikowano kilkadziesiąt różnych alleli genu *MC1R*. Dane z literatury wskazują na to, że wiele z nich jest związanych z jasną skórą, występowaniem przebarwień oraz skłonnością do pojawiania się znamion barwnikowych [18]. Osoby o takim fenotypie powinny być bardziej narażone na działanie promieni ultrafioletowych, prawie się nie opalają, do-

znając oparzeń. Większość publikacji jest zgodna co do tego, że mutacje Arg151Cys, Arg160Trp mają kluczowe znaczenie w powstawaniu takiego fenotypu [19]. Po raz pierwszy badacze brytyjscy [20] wykazali, że niektóre warianty genu *MC1R* występują częściej u pacjentów z czerniakiem. Valvedre i wsp. [20] stwierdzili, że mutacja Asp84Glu występowała wyłącznie u osób chorych na ten nowotwór. Jednocześnie prowadzone ostatnio badania australijskie obejmujące dużą grupę chorych (460 z czerniakiem oraz 399 kontroli) nie potwierdziły tych wyników. Wykazano natomiast zależność pomiędzy obecnością innych alleli: Arg151Cys, Arg160Trp, Asp294His a zwiększoną zachorowalnością na czerniaka skóry. Ta korelacja okazała się jeszcze silniejsza u osób z czerniakiem oraz ciemniejszą karnacją skóry (typ III i IV wg skali Fitzpatricka). Badacze ci sugerują, że powyższe mutacje w genie *MC1R* mogą zwiększać ryzyko zachorowania na czerniaka w sposób niezależny od ich wpływu na fenotyp pigmentowy [21].

Badania populacyjne w Wielkiej Brytanii wykazały, że wystąpienie w genie *MC1R* mutacji Asp84Glu, Val92Met, Asp294His nie zwiększało ryzyka czerniaka w całej populacji badanych, ale u osób posiadających ciemniejszą, mniej wrażliwą na słońce skórę [22]. Natomiast wystąpienie tych wariantów genu nie miało wpływu na zwiększenie zachorowalności na czerniaka u osób z I i II typem skóry, czyli łatwo ulegających oparzeniom słonecznym.

Interesujące są wyniki badań przedstawiających zależność pomiędzy odpowiedzią skóry na promieniowanie słoneczne a obecnością różnych wariantów genu *MC1R*. W eksperymencie Healy i wsp. [23] stopień nasilenia opalenizny po regularnym nasłonecznieniu był zależny od liczby obecnych wariantów genu. Badania grupy badaczy holenderskich wykazały, że penetracja zmutowanego genu *p16* może być zwiększona poprzez równoczesną obecność wariantów genu *MC1R* warunkujących wystąpienie jasnego fenotypu [24].

W perspektywie obiecujące wydaje się wykorzystanie wyników badania obecności wariantów genu *MC1R* w diagnostyce czerniaka.

Zrozumienie genetycznych podstaw leżących u podstawy czerniaka ma ogromne znaczenie prognostyczne, pozwala bowiem na wyodrębnienie grup zwiększonego ryzyka zachorowania, a być może w przyszłości pozwoli na wyprzedzenie zachowania nowotworu na podstawie jego *genetycznego odcisku palca*.

Piśmiennictwo

1. Parker JL, Florell SR, Alexander A, et al. Pancreatic melanoma surveillance in patients with familial melanoma. *Arch Dermatol* 2003; 139: 1019-25.
2. Anderson H, Bladstrom A, Olsson H, et al. Familial breast and ovarian cancer: a Swedish population-based register study. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 1154-63.
3. Hussussian JP, Struwing AM, Goldstein PA, et al. Germline *p16* mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994; 8: 15-21.

4. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations in melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 19: 894-903.
5. Tsoa H, Zhang X, Kwitkiwski K, et al. Low prevalence of germline CDKN2a and CDK4 mutations in patients with early-onset melanoma. *Arch Dermatol* 2000; 136: 1118-22.
6. Berwick M, Orlow I, Mahabir S, et al. Estimating the relative risk of developing melanoma in INK4A carriers. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 65-70.
7. Monzon J, Lin L, Brill H, et al. CDKN2a mutations in multiple primary melanoma. *N Engl J Med* 1998; 338: 879-87.
8. Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDK2a (p16)/ARF tumor suppressors. *J AM Acad Dermatol* 2000; 42: 705-22.
9. Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, et al. Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 568-76.
10. Tsoa H, Zhang X, Fowlkes K, et al. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res* 2000; 60: 1800-4.
11. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-54.
12. Tsoa H, Goel V, Wu H, et al. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 337-41.
13. Indsto JO, Holland EA, Kefford RF, et al. 10q deletions in metastatic cutaneous melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 100: 68-71.
14. Guldberg P, Straten P, Birck A, et al. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 1997; 57: 3660-3.
15. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1878-90.
16. Rees JL. Genetics of hair and skin colour. *Annu Rev Genet* 2003; 37: 67-90.
17. Valverde P, Healy E, Jackson I, et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995; 11: 328-30.
18. Bastiaens M, Huurne J, Gruis N, et al. The melanocortin-1 receptor gene is the major freckle gene. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1701-8.
19. Rees JL. The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. *Pigment Cell Res* 2000; 13: 135-140.
20. Valverde P, Healy E, Sikkink S, et al. The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet* 1996; 10: 1663-6.
21. Palmer JS, Duffy DL, Box NF, et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 2000; 66: 176-86.
22. Ichii-Jones F, Lear JT, Heagerty AH, et al. Susceptibility to melanoma: influence of skin type and polymorphism in the melanocyte stimulating hormone receptor gene. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 218-21.
23. Healy E, Flannagan N, Ray A, et al. Melanocortin-1 receptor gene and sun sensitivity in individuals without red hair. *Lancet* 2000; 355: 1072-3.
24. Van der Velden PA, Sandkuijl LA, Bergman W, et al. Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies melanoma risk in Dutch families with melanoma. *Am J Hum Genet* 2000; 69: 774-9.