

Czerniak, jak każdy nowotwór złośliwy, jest chorobą genetyczną. Jego progresja jest spowodowana kumulowaniem się zmian w materiale genetycznym. W rozwój czerniaka są zaangażowane zarówno onkogeny, jak i geny supresorowe. Większość genów supresorowych może być zaliczona do jednej z dwóch grup – są to tzw. geny „portierzy” lub geny „dozorcy”. Inaktywacja genów należących do pierwszej grupy odgrywa podstawową rolę w rozwoju ok. 50 proc. przypadków czerniaka skóry u człowieka. Rozwój czerniaka skóry jest procesem stopniowym: od melanocytów prawidłowych, poprzez komórki wchodzące w skład znamion, fazę wzrostu radialnego, fazę wzrostu wertykalnego, aż do choroby przerzutowej. Mechanizmy molekularne będące przyczyną rozwoju czerniaka nie zostały dotychczas w pełni poznane. Jednakże zidentyfikowano pewne zmiany o kluczowym znaczeniu w tym procesie. Wyniki licznych badań wskazują na ważną rolę zahamowania ekspresji genu *p16/INK4a*, którego produkt białkowy pełni kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego. Wyniki badania profilu ekspresji komórek czerniaka przy pomocy technologii mikromacierzy DNA potwierdzają, że czerniak może być określony jako „choroba genów supresorowych”. Tym niemniej aktywacja niektórych onkogenów również odgrywa ważną rolę w rozwoju tego nowotworu. Utrata ekspresji genów *AP-2* i *c-KIT* ma prawdopodobnie kluczowe znaczenie dla nabywania przez komórki czerniaka zdolności do tworzenia przerzutów.

Słowa kluczowe: czerniak, biologia molekularna, cykl komórkowy, geny supresorowe, onkogeny, *p16/INK4a*.

Biologia molekularna czerniaka skóry

Molecular biology of cutaneous melanoma

Wojciech Z. Pawlak¹, Marlena Wawrocka-Pawlak²,
Cezary Szczylik¹

¹Klinika Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa;

²Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Akademia Medyczna, Warszawa

WPROWADZENIE

Czerniak skóry, jak każdy nowotwór złośliwy, jest chorobą genetyczną. Oznacza to, że za jego rozwój są odpowiedzialne trwałe zmiany w genomie melanocytów. Zmiany te są przyczyną nabywania przez komórki fenotypu złośliwego, na który składają się następujące cechy [1]:

- ▶ utrata kontroli wzrostu (niezależnie się od egzogennych czynników wzrostu oraz niewrażliwość na działanie czynników hamujących),
- ▶ oporność na apoptozę,
- ▶ zdolność do nieograniczonego namnażania się oraz różnie nasiloną utratą zdolności do różnicowania się i dojrzewania,
- ▶ zdolność do indukcji angiogenezy,
- ▶ zdolność do inwazji tkanek sąsiednich,
- ▶ zdolność do zasiedlania środowiska ektopowego, czyli tworzenie przerzutów.

Każda z powyższych cech może być w sposób mniej lub bardziej jasny powiązana z określonymi zmianami na poziomie genomu komórki nowotworowej.

Protoonkogeny i geny supresorowe odgrywają główną rolę w procesie nowotworzenia. Brak równowagi między działaniem obu tych grup prowadzi do nabywania fenotypu złośliwego. Za zmianę funkcji genów biorących udział w onkogenezie odpowiedzialne są mutacje, które zwykle kumulują się w materiale genetycznym przez dziesięciolecia. Jeżeli pewne mutacje zostaną

odziedziczone, to czas potrzebny do rozwoju nowotworu może być wielokrotnie krótszy. Ilość mutacji gromadzonych w materiale genetycznym komórki jest wypadkową siły działania egzogennych czynników mutagennych, aktywności układów detoksykacyjnych organizmu oraz sprawności mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA. Czynnikiem decydującym o nowotworzeniu może być zarówno przekształcenie protoonkogenów – w normalnych warunkach stymulujących wzrost i namnażanie się komórek – w onkogeny, jak i wypadnięcie funkcji genów supresorowych, które wykazują działanie przeciwstawne, tj. hamują proliferację [2].

Według koncepcji Berta Vogelsteina geny supresorowe można podzielić na 2 klasy [3]. Pierwszą z nich stanowią geny zwane *portierami* (ang. *gatekeepers*), drugą – geny zwane *dozorcami* (ang. *caretakers*). *Portierzy* pełnią ściśle określone funkcje na przebiegu wewnątrzkomórkowych szlaków molekularnych, gdzie hamują wzrost komórek lub promują ich apoptozę. Do tej grupy należą m.in. następujące geny: *RB1*, *p53*, *WT1*, *NF1*, *NF2*, *VHL*, *MEN1*, *MEN2*, *p16*, *CDK4*, *PTEN*, *APC*, *BRCA1*, *BRCA2*, *SDHD* oraz *CYLD*. W przypadku genów należących do tej grupy rozwój nowotworu następuje po inaktywacji obu kopii, przy czym mutacja w jednym allelu może być odziedziczona. Geny *dozorcy* pełnią bardziej ogólne funkcje, polegające – jak sama nazwa wskazuje – na utrzymaniu pewnego porządku w genomie. Należą tu przede wszystkim geny, których

Melanoma, like all malignant tumors, is a genetic disease. Its progression is driven by a series of accumulating genetic changes. Genetic alterations involved in melanoma can activate inductive processes (oncogenes) or block negative pathways (suppressor genes). Most tumor suppressor genes can be divided into two groups, called gatekeepers and caretakers. Inactivation of gatekeepers may occur in about half of all melanoma cases. The development of human cutaneous melanoma is a consequence of a multistep process. This process involves formation of nevi from normal melanocytes, a radial growth phase, and a subsequent vertical growth phase. Finally, metastatic disease may be developed. The molecular mechanisms leading to human melanoma are not well known. However, some important genetic changes involved in melanoma development were recognized. An impressive list of experiments supports a role of p16/INK4a in melanoma formation. This protein is strongly involved in cell cycle-control machinery. Inactivation of p16/INK4a leads to uncontrolled cell proliferation. The gatekeepers other than p16/INK4a also play a part in melanoma formation. These are for example p19/INK4d, PTEN, as well as p53. The data obtained from gene expression profiling indicate that inactivation of gatekeepers plays an essential role in melanoma development. However, some oncogenes are also strongly involved in this process. One of these is CDK4, a target of p16's biochemical inhibitory activity. Metastatic melanoma cells do not express the c-KIT (CD117) receptor. Expression of c-KIT is regulated by the transcription factor AP-2. Expression of AP-2 is not detected in metastatic melanoma cells. The loss of AP-2 expression seems to be a crucial event in the development of metastatic human melanoma.

Key words: melanoma, molecular biology, cell cycle, tumor suppressor genes, oncogenes, p16/INK4a.

produkty białkowe są zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA oraz ochronę genomu przed szkodliwym wpływem ksenobiotyków i metabolitów wewnątrzkomórkowych. Do tej grupy zalicza się m.in. następujące geny: XP, CS, ERCC1, TFIH, ATM, BLM, FANCA, hMSH, hMLH1, hPMS, WRN, LKB1 oraz SMAD4. Mutacje inaktywujące te geny nie prowadzą *per se* do rozwoju nowotworów (sytuacja taka ma miejsce w przypadku genów *portierów*). Natomiast wypadnięcie czynności jednego z genów należących do tej grupy znacząco zwiększa niestabilność genomu. W konsekwencji prowadzi to do wzrostu ryzyka wystąpienia takich mutacji w protoonkogenach lub genach supresorowych, które bezpośrednio są przyczyną rozwoju fenotypu złośliwego.

JAK POWSTAJE CZERNIAK?

Odpowiedź na powyższe pytanie pozostaje niepełna. Zidentyfikowano co prawda szereg czynników ryzyka rozwoju czerniaka, ale nadal daleko do pełnego zrozumienia ich oddziaływań na poziomie molekularnym. Na poziomie zmian klinicznych obowiązuje model zaproponowany przez Clarka i wsp., który zakłada stopniowe przekształcanie się melanocytów w komórki dysplastyczne, a następnie w komórki atypowe o pełnym fenotypie złośliwym [4]. Etapy rozwoju prowadzącego od zmiany łagodnej do uogólnionego czerniaka obejmują kolejno:

- ▶ znamię nabyte zwykłe lub znamię wrodzone,
- ▶ znamię dysplastyczne,
- ▶ czerniak pierwotny – faza wzrostu powierzchniowego (radialnego),
- ▶ czerniak pierwotny – faza wzrostu głębokiego (wertikalnego),
- ▶ czerniak przerzutowy.

Należy pamiętać, że jest to tylko ogólny schemat sprawdzający się w przypadkach typowych. Czasami w przebiegu klinicznym choroby widoczne są tylko końcowe etapy opisanego procesu – skrajnym przypadkiem jest rozpoznanie przerzutów odległych czerniaka bez znanego punktu wyjścia.

Rozwój czerniaka skóry jest wynikiem wzajemnego oddziaływania szkodliwych czynników egzogennych, oraz zmian endogennych ułatwiających powstawanie nowotworu. Najważniejszym

czynnikiem zewnętrznym warunkującym rozwój czerniaka jest promieniowanie ultrafioletowe (UV). Z kolei wśród czynników wewnętrznych największe znaczenie ma obecność pewnych zmian w genomie melanocytów. Zmiany te warunkują większą wrażliwość komórek na mutagenne działanie promieniowania UV. Komórki, których genom został uszkodzony przez promieniowanie UV w stopniu uniemożliwiającym naprawę zwykle podlegają apoptozie w mechanizmie zależnym od genu p53. Jednakże komórki odporne na apoptozę mogą przeżywać i dawać początek klonom kumulującym mutacje. Z takich klonów drogą kolejnych selekcji rozwijają się komórki dysplastyczne, a następnie komórki nowotworowe [5].

Zmiany odziedziczone odgrywają decydującą rolę w rozwoju ok. 10 proc. przypadków czerniaka skóry. Najbardziej spektakularnym przykładem znaczenia tych zmian jest rozwój czerniaka w tym samym wieku i w tej samej lokalizacji u bliźniąt monozygotycznych [6]. Jeżeli choroba wystąpiła u krewnego lub krewnych I stopnia, to względne ryzyko zachorowania na czerniaka wynosi od 2 do 3. Natomiast gdy czerniak wystąpił u co najmniej trzech członków rodziny należących do dwóch lub więcej pokoleń, to ryzyko względne wynosi od 35 do 70. Godny podkreślenia jest fakt, że nie we wszystkich rodzinach z częstymi przypadkami czerniaka występuje zespół znamion dysplastycznych [7].

CZERNIAK JAKO CHOROBA GENÓW SUPRESOROWYCH

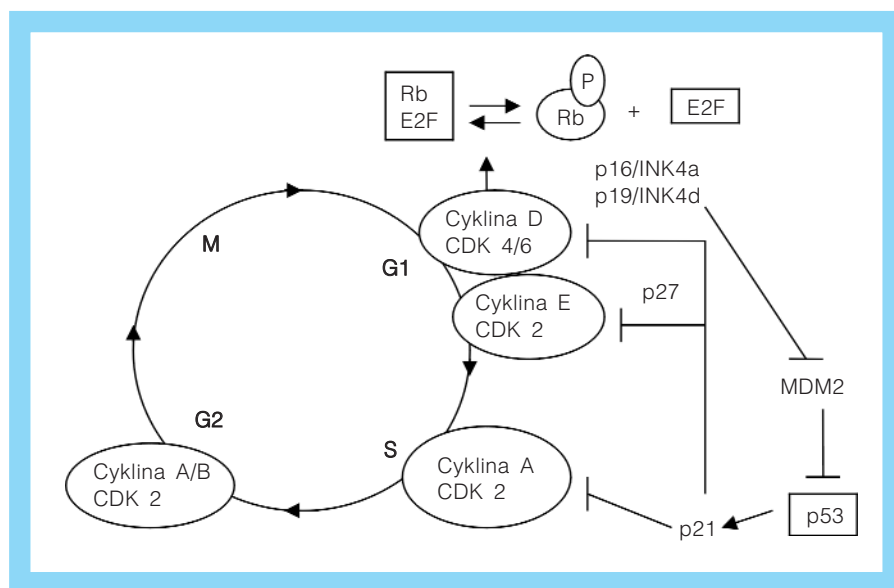
W przedstawionym powyżej modelu Clarka do każdego z etapów rozwoju czerniaka można przyporządkować charakterystyczne zmiany biologiczne i molekularne. Badania przeprowadzone na hodowlach komórek pobranych ze zmian barwnikowych w różnych fazach rozwoju wykazały, że [8]:

- ▶ melanocyty prawidłowe (tj. uzyskane z niezmięnionej skóry) nie wykazują aberracji chromosomowych. Ich czas życia w hodowli jest ograniczony do mniej więcej 50 podwojeń liczby komórek, a do prawidłowego wzrostu wymagają czynników egzogennych, takich jak insulina, bFGF (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów) i α MSH (hormon pobudzający melanocyty).

Ester forbolu stymuluje wzrost tych komórek. Ponadto prawidłowe melanocyty w zasadzie nie tworzą kolonii na podłożu półpłynnym oraz nie wykazują cech proliferacji po wszczepieniu ich myszom z nieczynnym układem odpornościowym (tzw. myszy nagie);

- ▶ komórki pochodzące ze znamion (zarówno zwykłych, jak i dysplastycznych) pod względem biologicznym nie różnią się istotnie od melanocytów prawidłowych, chociaż w niektórych przypadkach wykazano ich zdolność do wzrostu w pożywkach pozbawionych egzogenego bFGF;
- ▶ komórki czerniaka pierwotnego w powierzchniowej (radialnej) fazie wzrostu wykazują obecność nielosowych aberracji chromosomalnych (najczęściej w chromosomach 1., 6., 7. i 9.). Spośród egzogennych czynników wzrostu wymienionych powyżej wymagają jedynie obecności insuliny. Ich hodowla może być bez trudu prowadzona nawet po przekroczeniu 100 podwojeń liczby komórek. Ester forbolu hamuje wzrost tych komórek. Około 10 proc. komórek tworzy kolonie na podłożu półpłynnym, zaś w 80 proc. przypadków występuje wzrost guza u myszy nagich;
- ▶ komórki czerniaka pierwotnego w głębokiej (wertikalnej) fazie wzrostu uniezależniają się od obecności insuliny w pożywce. Zwiększa się również ich zdolność do tworzenia kolonii na podłożu półpłynnym oraz do wzrostu u myszy z nieczynnym układem odpornościowym;
- ▶ komórki uzyskane z przerzutów czerniaka wykazują obecność dodatkowych aberracji chromosomowych (przeważnie w chromosomie 11.) oraz jeszcze większą zdolność do tworzenia kolonii na podłożu półpłynnym (mniej więcej 25 proc. komórek tworzy takie kolonie).

Sekwencja zdarzeń molekularnych zachodzących na poziomie genomu, które warunkują wystąpienie powyższych zmian biologicznych została poznana jedynie częściowo. Tym niemniej pewne kluczowe elementy tego procesu zostały wyjaśnione w stopniu dostatecznym. Wyniki dotychczasowych badań usprawiedliwiają określenie czerniaka jako *choroby genów supresorowych*.



Ryc. 1. Podstawowe mechanizmy regulacji cyklu komórkowego (opis w tekście)

Regulacja cyklu komórkowego

Cykl komórkowy jest szeregiem zmian biologicznych zachodzących w komórce w czasie od końca jednego do początku następnego podziału. Cykl ten składa się z następujących faz:

- ▶ interfaza, która dzieli się na:
 - fazę G1 – do zakończenia mitozy do rozpoczęcia syntezy DNA,
 - fazę S – synteza DNA,
 - fazę G2 – od zakończenia syntezy DNA do rozpoczęcia podziału,
- ▶ mitoza, czyli podział komórki.

Komórki dzielące się znajdują się w fazie spoczynkowej, która jest oznaczana symbolem G0. Kluczowe znaczenie w regulacji cyklu komórkowego ma faza G1, w przebiegu której występuje tzw. punkt restrykcyjny. Jest to pojęcie umowne, oznaczające pewną sekwencję zdarzeń molekularnych, po zajściu których komórka wchodzi w fazę S. Istota zjawisk zachodzących w punkcie restrykcyjnym polega na tym, że z jednej strony działają tu mechanizmy stymulujące przejście komórki do dalszych faz cyklu, a z drugiej strony proces ten jest hamowany przez przeciwstawnie działające mechanizmy regulacyjne. Odpowiedniki punktu restrykcyjnego znajdują się również na przebiegu fazy S i fazy G2 [9].

Regulacja cyklu komórkowego odbywa się przy pomocy szeregu wzajemnie oddziałujących białek (ryc. 1.). Najważniejsze znaczenie w tym procesie mają:

- ▶ rodzina białek Rb (p105, p107, p130), które wiążą i utrzymują w stanie nieaktywnym czynniki transkrypcyjne E2F. Aby pełnić tę rolę (tzn. być w stanie aktywnym), cząsteczki białek Rb muszą być defosforylowane (jest to sytuacja przeciwna do spotykanej w przypadku większości białek komórkowych, które są aktywowane poprzez fosforylację). W przypadku białek Rb ich fosforylacja powoduje utratę aktywności i odłączenie czynników transkrypcyjnych E2F, które z kolei stymulują ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w syntezę DNA;
- ▶ cykliny (A, B, D, E oraz H), czyli białka, których ekspresja zmienia się periodycznie w czasie trwania cyklu komórkowego. Główna rola cyklin polega na fosforylacji kolejnej grupy białek biorących udział w regulacji cyklu, które w ten sposób stają się aktywne;
- ▶ białka, które są fosforylowane przez cykliny zostały nazwane kinazami zależnymi od cyklin (CDK – ang. *cyclin dependent kinase*). To one pełnią rolę białek efektorowych odpowiedzialnych za fosforylację innych białek w poszczególnych fazach cyklu;
- ▶ inhibitory CDK, wśród których najważniejsze są 2 główne grupy:
 - rodzina białek Cip/Kip, czyli białka p21, p27 i p57, oraz
 - rodzina białek INK4, czyli białka p16/INK4a, p15/INK4b, p18/INK4c i p19/INK4d.

W kontekście rozwoju nowotworów złośliwych geny kodujące inhibitory CDK pełnią rolę genów supresorowych;

- białko p53, które za pośrednictwem białek p21, p27 oraz p16/INK4a jest zdolne do zahamowania progresji cyklu komórkowego w przypadku obecności takich uszkodzeń w DNA, których naprawa jest niemożliwa.

Czynniki wzrostu działające na komórkę za pośrednictwem swoistych receptorów powodują najczęściej zwiększenie ekspresji cyklin i CDK, przy jednoczesnym zmniejszeniu ekspresji inhibitorów CDK. Opisana powyżej regulacja cyklu komórkowego zachodzi również w melanocytach, ale w przypadku ich transformacji nowotworowej występują tu istotne zmiany.

Białko p16/INK4a w czerniaku skóry

Białko to, zwane również CDKN2A, pełni rolę inhibitora kinaz CDK4 i CDK6. *Locus* genu kodującego p16/INK4a znajduje się na chromosomie 9. (pozycja 9p21). Wypadnięcie funkcji tego genu stwierdza się w 25–40 proc. przypadków sporadycznych czerniaków [10]. Zmiany w obrębie tego genu prowadzące do jego inaktywacji mogą występować jako:

- mutacje punktowe,
- delecje dużych odcinków genu,
- tzw. wyciszenie genu (ang. *silencing*), które trwale hamuje jego ekspresję bez zmian w budowie pierwszorzędowej (czyli sekwencji zasad azotowych); wyciszenie to następuje na skutek metylacji zasad azotowych, wchodzących w skład DNA, ale może tu również odgrywać rolę niedawno odkryty mechanizm tzw. interferencji RNA.

Istotnym czynnikiem inaktywującym p16/INK4a jest promieniowanie UV. Ponadto odziedziczone mutacje w genie p16/INK4a występują u 30–50 proc. osób z czerniakiem należących do rodzin z wysoką częstością jego występowania [11]. Stwarza to potencjalną możliwość wczesnego wykrywania predyspozycji do rozwoju tego nowotworu.

Konsekwencje braku funkcjonalnego białka p16/INK4a są bardzo poważne. Kompleks cykliny D1/CDK4/CDK6 jest wtedy pozbawiony głównego hamulca swojej aktywności i bez ograniczeń

może fosforylować kompleks białek Rb, który uwalnia czynniki transkrypcyjne E2F. Powoduje to stałą aktywację cyklu komórkowego i przechodzenie od fazy G1 do fazy S.

Co ciekawe, białko p16/INK4a nie jest niezbędne do życia organizmu. Myszy, których komórki zostały pozbawione możliwości wytwarzania tego białka są w pełni zdolne do życia, choć częściej od zwierząt normalnych zapadają na nowotwory złośliwe. W przypadku mutacji w ludzkim genie p16/INK4a efekt fenotypowy jest zmieniony osobniczo i prawdopodobnie zależy od obecności innych zmian genetycznych [8].

Rola p19/INK4d

Białko to jest kodowane przez ten sam gen, co białko p16/INK4a. Różnica między obu białkami polega na alternatywnym składaniu transkryptu genu – w przypadku białka p19/INK4d dołączany jest odmienny egzon pierwszy (tzw. E1β). Delecja tego egzonu została wykryta w kilku liniach komórkowych czerniaka. Dotychczas nie wykryto mutacji punktowych w obrębie tego egzonu w ustalonych liniach komórkowych lub komórkach czerniaka pochodzących z guzów usuniętych pacjentom [8].

W normalnych warunkach p19/INK4d pełni 2 główne funkcje: inhibitora kinaz CDK4 i CDK6 oraz inhibitora białka MDM2. To ostatnie białko jest z kolei silnym inhibitorem p53, a zatem umożliwia komórce uniknięcie konsekwencji zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1. Brak czynnego białka p19/INK4a powoduje zatem zwiększenie fosforylacji kompleksu Rb (z następowym uwolnieniem czynników transkrypcyjnych E2F) oraz umożliwia hamowanie czynności białka p53 przez MDM2.

Inne geny supresorowe w czerniaku

Białko p15/INK4b wykazuje 77 proc. homologii w stosunku do białka p16/INK4a. Oba białka pełnią podobne funkcje – hamują kinazy CDK4 i CDK6. Najistotniejsza różnica między nimi polega na tym, że ekspresja p15/INK4b zwiększa się pod wpływem oddziaływania na komórkę transformującego czynnika wzrostu-beta (TGFβ), co nie jest obserwowane w przypad-

ku drugiego z omawianych białek. W przypadku czerniaka nie zaobserwowano dotychczas mutacji punktowych wpływających na budowę białka p15/INK4b. Natomiast ważny jest inny fakt – w niektórych przypadkach obserwowano brak funkcjonalnego białka p16/INK4a z równoczesnym zachowaniem ekspresji p15/INK4b [11].

Utrata heterozygotyczności (LOH – ang. *loss of heterozygosity*) w obrębie locus dla genu PTEN (ramię długie chromosomu 10.) jest wykrywana w 31 proc. przypadków pierwotnego czerniaka skóry. Co ciekawe, zmiana ta jest obecna już w czerniakach o grubości nacieku poniżej 1,5 mm, co świadczy o jej wczesnym pojawieniu się w czasie rozwoju choroby. W przypadku genu supresorowego, jakim jest PTEN, wykrycie LOH wskazuje na inaktywację obu jego kopii. Fizjologiczna rola białka PTEN polega przede wszystkim na hamowaniu przekazywania sygnałów z komórkowych receptorów czynników wzrostu do układu kierowanego przez białko Ras. Jak wiadomo, Ras jest białkiem, które poprzez kaskadę kolejno fosforylowanych kinaz (Raf – MEK – ERK – MAP) powoduje aktywację czynników transkrypcyjnych i w konsekwencji uruchomienie transkrypcji szeregu genów zaangażowanych w proliferację komórek. Inna rola PTEN polega na hamowaniu przekazywania sygnałów z receptorów błonowych do jądra komórkowego za pośrednictwem układu aktywowanego przez fosfatydyloinozytol. Ponieważ LOH w *locus* genu PTEN jest wykrywana w niemal 1/3 przypadków czerniaka skóry, utrata aktywności tego genu supresorowego może mieć istotne znaczenie w powstawaniu i/lub progresji choroby [8, 10].

LOH w obrębie *locus* dla genu p53 (najbardziej znany gen supresorowy, którego inaktywacja dotyczy około połowy przypadków wszystkich nowotworów złośliwych) jest zdarzeniem nieczęsto wykrywanym w przypadku czerniaka. Dotychczas zmiana ta była wykrywana w ok. 15 proc. przypadków pierwotnego czerniaka skóry, przeważnie w stadium dużego zaawansowania klinicznego. Mutacje w obrębie genu p53 zostały potwierdzone metodami bezpośrednimi w ok. 5 proc. przypadków czerniaka [8, 10, 12].

Mikromacierze DNA

– nowe spojrzenie

Przedstawione powyżej zmiany molekularne dotyczące genów supresorowych pozwalają na wskazanie kluczowych mechanizmów, zaangażowanych w rozwój choroby u mniej więcej połowy chorych z czerniakiem skóry. Podstawowym problemem jest oczywiście wyjaśnienie patogenezы molekularnej drugiej połowy przypadków. Z pomocą przychodzi tu technologia mikromacierzy DNA, która pozwala na badanie transkrypcji wielu tysięcy genów w ramach jednego eksperymentu. Znaczenie takiego badania w interesującym nas kontekście jest dwojakie:

- ▶ zwiększenie ilości transkryptu danego genu świadczy wprost o jego zwiększonej ekspresji, natomiast zmniejszenie lub zanik transkrypcji – o jego inaktywacji. Zastosowanie mikromacierzy drastycznie skraca okres niezbędny do zbadania ekspresji interesujących nas genów metodami tradycyjnymi, a ponadto może prowadzić do odkrycia zmian dotychczas zupełnie nieznanymi;
- ▶ podstawowe znaczenie dla rozwoju choroby może mieć zmiana ekspresji całych zespołów genów (tzw. profil lub podpis genetyczny), która jest możliwa do odkrycia tylko w przypadku jednoczesnego ich badania.

Uzyskana w ten sposób wiedza ma znaczenie nie tylko poznawcze. Nowo odkryte mechanizmy molekularne mogą stanowić punkty uchwytu dla działania nowych leków. Ponadto określone profile ekspresji mogą być wykorzystywane jako czynniki prognostyczne i predykcyjne.

Badania przeprowadzone z zastosowaniem mikromacierzy DNA potwierdzają wcześniejsze dane na temat zmian molekularnych, zaangażowanych w powstawanie i progresję czerniaka. Dotychczas zbadano profile ekspresji zarówno ustalonych linii komórkowych tego nowotworu, jak i komórek uzyskanych z guzów pierwotnych i przerzutowych rozpoznanych u poszczególnych pacjentów. W miarę progresji czerniaka od postaci nieinwazyjnej do przerzutów odległych następuje utrata ekspresji ok. 30–40 genów. Równocześnie tylko kilka genów zwiększa swoją ekspresję. Potwierdza to przytoczoną wcześniej hipotezę, że czerniak jest *chorobą genów supresorowych* [13–16].

Rzeczywiście rozwój technologii mikromacierzy DNA ogromnie poszerzył możliwości warsztatowe biologów molekularnych. Z punktu widzenia onkologa klinicznego można zapytać: co z tego wynika dla pacjenta? Na razie niewiele, a bierze się to stąd, że istnieje szereg problemów czekających na rozwiązanie. Najważniejsze z nich to:

- ▶ istniejące ciągle poważne trudności metodologiczne w zakresie prawidłowego opracowania i interpretacji olbrzymiej ilości danych pochodzących z eksperymentów, w które jest zaangażowana technologia mikromacierzy;
- ▶ brak perspektywnych badań klinicznych, potwierdzających efektywność posługiwania się profilami ekspresji jako czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi.

Tym niemniej mikromacierze DNA będą niewątpliwie – w miarę przecięcia cięższych trudności – zajmować coraz bardziej znaczącą pozycję nie tylko w laboratoriach, ale także przy łóżku chorego.

ONKOGENY W CZERNIAKU

Mutacje w genach rodziny RAS są wykrywane tylko w ok. 10 proc. przypadków czerniaka. Spośród ogólnej liczby nowotworów złośliwych mutacje w tych genach spotyka się w ponad 50 proc. przypadków. Jednakże badania przeprowadzone na liniach komórkowych oraz materiale uzyskanym z guzów pierwotnych wykazały, że gen kodujący białko RAF może być zmutowany w ponad połowie przypadków czerniaka. RAF jest cytoplazmatyczną kinazą serynowo-treoninową i ulega aktywacji pod wpływem RAS. RAF uruchamia wspomnianą powyżej kaskadę kinaz, której składniki są kolejno fosforylowane i tą drogą następuje przeniesienie sygnałów molekularnych stymulujących proliferację z powierzchni błony komórkowej do jądra. Ponadto wykazano, że białko RhoC, które ma właściwości podobne do RAS, może odgrywać istotną rolę w nabywaniu przez komórki czerniaka zdolności do tworzenia przerzutów [17].

Kinaza CDK4, która pełni kluczową rolę w fosforylacji białek Rb, wykazuje obecność mutacji w kilku procentach przypadków czerniaka. Mutacje te prowadzą do drastycznego zmniejszenia zdolności wiązania się prawidłowego białka p16/INK4a ze zmienioną cząsteczką CDK4. Równocześnie zmutowa-

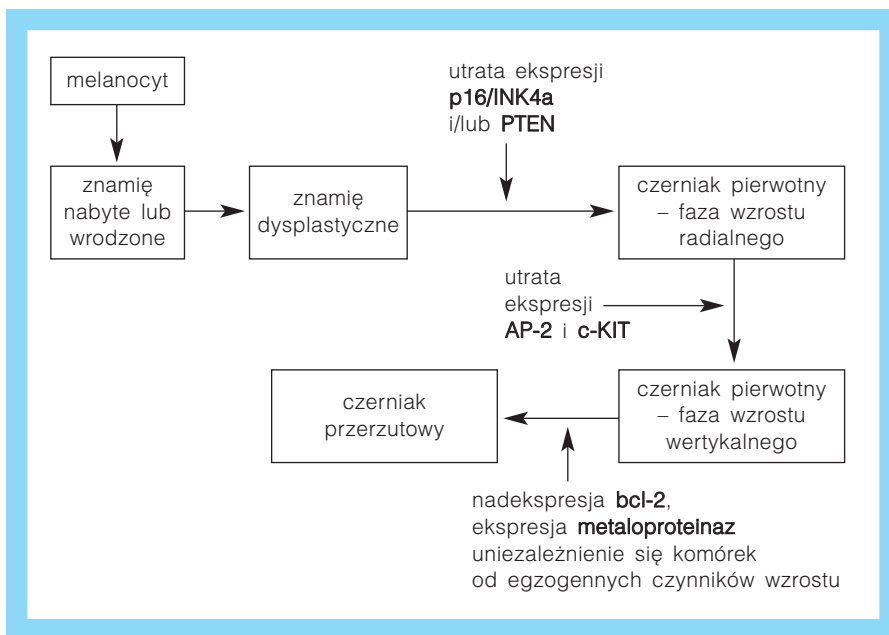
wana forma CDK4 posiada niezmienną powinowactwo do białek Rb [18].

Różne doniesienia wskazują na ważną rolę nadekspresji innych onkogenów w patogenezы molekularnej czerniaka. Można tu wymienić białko bcl-2, które jest zlokalizowane w błonach mitochondrialnych i działa jako czynnik hamujący apoptozę. Jednakże istnieją sugestie, że zmiany te występują stosunkowo późno w przebiegu choroby. Byłby to kolejny argument przemawiający za hipotezą, że początkowe etapy powstawania i rozwoju czerniaka są zależne od utraty ekspresji genów supresorowych [5, 8, 10]. W tym kontekście niezwykle intrygująca jest rola pewnego onkogeny w progresji ludzkiego czerniaka.

Rola c-KIT w czerniaku

Protoonkogen c-KIT (CD117) koduje białko receptorowe obecne w błonie komórkowej, którego część cytoplazmatyczna wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej. Mutacje w obrębie tego protoonkogeny prowadzą do aktywacji receptora c-KIT bez konieczności wiązania się liganda. W warunkach fizjologicznych białko c-KIT jest obecne m.in. na macierzystych komórkach krwiotwórczych. Ligandem aktywującym ten receptor jest cytokina SCF (ang. *stem cell factor*), która jest w tym przypadku wytwarzana przez komórki podścieliska szpiku kostnego. Niedawno zmutowany c-KIT został zidentyfikowany jako ważny onkogen w guzach zrębu przewodu pokarmowego (GIST). Odkrycie to, wraz z wykazaniem hamowania aktywności c-KIT przez imatinib, spowodowało przełom w leczeniu tych nowotworów [19].

W przypadku czerniaka sytuacja jest dość zaskakująca: onkogen c-KIT staje się tu genem supresorowym. Ekspresja c-KIT na powierzchni prawidłowych melanocytów jest duża. Natomiast w przypadku ok. 70 proc. linii komórkowych ludzkiego czerniaka ekspresja ta jest niewykrywalna. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku guzów przerzutowych u pacjentów z czerniakiem. Wykazano ponadto, że utrata ekspresji c-KIT przez komórki czerniaka wyraźnie koreluje z ich potencjałem do tworzenia guzów przerzutowych u myszy z nieczynnym układem odpornościowym. Wyniki kolejnych eksperymentów dowiodły, że SCF indukuje apoptozę komórek czerniaka, wykazu-



Ryc. 2. Kluczowe mechanizmy molekularne zaangażowane w powstawanie i progresję czerniaka

jących ekspresję c-KIT. Następnie wykazano, że ekspresja c-KIT na powierzchni komórek czerniaka znajduje się pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego AP-2. Linie komórkowe czerniaka o wysokim potencjale metastatycznym nie wykazują ekspresji AP-2. Utrata ekspresji AP-2 i c-KIT jest przypuszczalnie jednym z kluczowych zdarzeń prowadzących do przejścia czerniaka z fazy wzrostu powierzchniowego (radialnego) do fazy wzrostu głębokiego (wertykalnego), co w praktyce klinicznej jest widoczne jako rozwój guza naciekającego skórę właściwą [20].

Badanie ekspresji AP-2 i/lub c-KIT może być wykorzystane do prognozowania przebiegu wczesnego czerniaka skóry. Wykazano, że utrata ekspresji AP-2 u chorych z czerniakiem w I stopniu zaawansowania klinicznego koreluje z krótszym czasem całkowitego przeżycia. Ponadto możliwe jest rozważenie wykorzystania SCF w leczeniu chorych z czerniakiem w przypadku obecności ekspresji c-KIT. Można wreszcie brać pod uwagę możliwość zastosowania terapii genowej, polegającej na transfekcji komórek czerniaka prawidłową kopią genu c-KIT [20, 21].

PODSUMOWANIE

Biologia molekularna czerniaka skóry nadal kryje wiele zagadek. Co prawda pewne zmiany, które wydają się mieć kluczowe znaczenie w inicjacji i progresji tego nowotworu zostały zidentyfikowane, to jednak duża liczba

problemów nadal oczekuje na rozwiązanie. Z poznawczego punktu widzenia można pokusić się o przedstawienie kluczowych zmian molekularnych w powiązaniu z konkretnymi zmianami zachodzącymi w biologii melanocytów na poszczególnych etapach rozwoju tego nowotworu (ryc. 2.). Natomiast z klinicznego punktu widzenia ważne jest, jaka część naszej wiedzy na temat molekularnej patogenezy czerniaka może być przydatna w codziennej praktyce medycznej. Na razie można tu mówić raczej tylko o potencjalnych możliwościach, takich jak:

- ▶ wykorzystanie badania nosicielstwa mutacji (np. w genie kodującym białka p16/INK4a i p19/INK4d) do prognozowania ryzyka wystąpienia czerniaka;
- ▶ poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych u chorych z czerniakiem. Może tu być przydatna zarówno ocena ekspresji pojedynczych genów (np. AP-2, c-KIT), jak również badanie profilu ekspresji wielu genów przy pomocy technologii mikromacierzy DNA;
- ▶ poszukiwanie punktów uchwytu dla działania nowych leków przeciwczeraniakowych, oraz możliwość indywidualizacji leczenia w zależności od wyników badań molekularnych wykonywanych u poszczególnych pacjentów.

Abstrahując od szeregu przeszkód do pokonania na drodze do wykorzystania powyższych idei w praktyce

można podać kilka konkretnych przykładów, jak to zrobić [8]:

- ▶ osoby, u których zostało wykryte nosicielstwo mutacji zwiększających ryzyko zachorowania na czerniaka mogłyby być poddane programom edukacyjnym (np. w celu uświadomienia konieczności unikania ekspozycji na promieniowanie słoneczne) oraz ściślejszym badaniom przesiewowym;
- ▶ można wykorzystać obecność produktów zmutowanych genów w komórkach czerniaka (np. kinazy CDK4) w celu indukcji przeciwnym nim odpowiedzi immunologicznej;
- ▶ wprowadzenie prawidłowej kopii genu p16/INK4a do komórek czerniaka mogłoby przywrócić prawidłową regulację cyklu komórkowego, co w efekcie hamowałoby progresję nowotworu;
- ▶ w fazie badań przedklinicznych znajdują się związki małowcząsteczkowe naśladujące działanie prawidłowego białka p16/INK4a, a zatem przywracające normalną regulację cyklu komórkowego.

Droga do wykorzystania powyższych idei w praktyce klinicznej jest jeszcze dość długa. Tym niemniej reprezentują one bardzo obiecującą dziedzinę onkologii, czyli tzw. badania translacyjne, które mają na celu wykorzystanie wiedzy zdobytej podczas prowadzenia badań podstawowych do osiągnięcia nowych korzyści klinicznych u chorych na nowotwory. Jest to obszar badań, których wyniki mogą w najbliższych latach spowodować znaczne postępy w leczeniu nowotworów złośliwych.

PIŚMIENNICTWO

1. Campisi J. *Cancer and ageing: rival demons?* Nature Rev Cancer 2003; 3: 339-49.
2. Szczylik C, Pawlak W. *Perspektywy terapii genowej w onkologii*. W: *Onkologia kliniczna*. (Red. M. Krzakowski), Borgis Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 2001.
3. Kinzler KW, Vogelstein B. *Familial cancer syndromes: The role of caretakers and gatekeepers*. In: *The Genetic Basis of Human Cancer* (Red.: Vogelstein B, Kinzler KW), McGraw-Hill Companies, Inc., New York 2002.
4. Clark WH Jr, Elder ED, Guerry D IV, et al. *The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma*. Hum Pathol 1984; 15: 1147-56.

5. Polsky D, Cordon-Cardo C, Houghton A. *Molecular biology of melanoma*. In: *The Molecular Basis of Cancer* (Red.: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta L), W.B. Saunders Company, Philadelphia 2001.
6. St-Arneault G, Nagel G, Kirkpatrick D, et al. *Melanoma in twins. Cutaneous malignant melanoma in identical twins from a set of triplets*. *Cancer* 1970; 25: 672-7.
7. Kefford RF. *Clinical approach to genetic risk for melanoma*. ASCO Educational Book 2002; 436-45.
8. Kamb A, Herlyn M. *Malignant melanoma*. In: *The Genetic Basis of Human Cancer* (Red.: Vogelstein B, Kinzler KW), McGraw-Hill Companies, Inc., New York 2002.
9. Kastan MB, Skapek SX. *Molecular biology of cancer: The cell cycle*. In: *Cancer. Principles and Practice of Oncology* (Red.: DeVita VT, Jr., Hellman S, Rosenberg SA), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001.
10. Herlyn M, Satyamoorthy K. *Molecular biology of cutaneous melanoma*. In: *Cancer. Principles and Practice of Oncology* (Red.: DeVita VT, Jr., Hellman S, Rosenberg SA), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001.
11. Demierre MF, Nathanson L. *Chemoprevention of melanoma: an unexplored strategy*. *J Clin Oncol* 2003; 21: 158-65.
12. Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, et al. *Dual inactivation of Rb and p53 pathways in RAS-induced melanomas*. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2144-53.
13. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. *Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling*. *Nature* 2000; 406: 536-40.
14. Santini D, Baldi A, Vincenzi B, et al. *New molecular approaches in the diagnosis and prognosis of human cancer*. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 334b.
15. Carr KM, Bittner ML, Trent JM. *Gene expression profiling in human cutaneous melanoma*. ASCO Educational Book 2002; 428-35.
16. Carr KM, Bittner M, Trent JM. *Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma*. *Oncogene* 2003; 22: 3076-80.
17. Houghton AN, Polsky D. *Focus on melanoma*. *Cancer Cell* 2002; 2: 275-8.
18. Sotillo R, Garcia JF, Ortega S, et al. *Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13312-17.
19. Ruka W, Rutkowski P, Nowecki Z i wsp. *Imatinib mesilate – inhibitor kinazy tyrozynowej w leczeniu nowotworów zębów przewodu pokarmowego – gastrointestinal stroma tumors (GIST)*. *Współczesna Onkologia* 2002; 6: 562-9.
20. Bar-Eli M. *Molecular events controlling human melanoma metastasis*. ASCO Educational Book 2000; 428-36.
21. Bar-Eli M. *Role of AP-2 in tumor growth and metastasis of human melanoma*. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 377-85.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr med. **Wojciech Z. Pawlak**
Klinika Onkologii
Wojskowy Instytut Medyczny
ul. Szaserów 128
00-909 Warszawa
tel./faks 0 (prefiks) 22 610 30 98
e-mail: wojpaw@wim.mil.pl