

Zmiany w obrębie chromosomowego locus 9p21 występują w wielu typach nowotworów, obejmując również czerniaka złośliwego. W tym obszarze zlokalizowane są 2 geny supresorowe: p16 (CDKN2A) i p15 (CDKN2B). Zmiany ekspresji tych genów mogą być spowodowane przez: homozygotyczne i heterozygotyczne delecje, mutacje punktowe lub metylację odcinków promotorowych. W Zakładzie Diagnostyki i Immunologii Nowotworów analizowano 110 przypadków czerniaka złośliwego skóry i gałki ocznej. W żadnym z przypadków nie wykryto metylacji wysp CpG w genach p16 i p15. Wydaje się zatem, że proces metylacji wysp CpG w odcinkach promotorowych nie jest głównym mechanizmem wyciszania ekspresji obu genów w czerniaku złośliwym skóry i gałki ocznej.

Słowa kluczowe: czerniak skóry, czerniak gałki ocznej, metylacja wysp CpG, gen p16, p15.

Changes in the chromosome region 9p21 in many types of tumors including malignant melanoma were observed. There are two suppressor genes in this region: p16 (CDKN2A) and p15 (CDKN2B). Number of mechanism might be involved in inactivation of these genes. They include: homozygous and heterozygous deletions, point mutations and methylation of the promoters. In the Department of Cancer Immunology we investigated 110 cases of cutaneous and uveal malignant melanoma. We found no methylation in CpG islands in promotor regions of p16 and p15 genes. It seems that methylation of promoters is not responsible for inactivation of both genes in cutaneous and uveal malignant melanoma.

Key words: cutaneous malignant melanoma, uveal malignant melanoma, methylation, CpG islands, p16 gene, p15 gene.

Analiza metylacji wysp CpG w odcinkach promotorowych genów p16 i p15

w czerniaku złośliwym skóry i gałki ocznej

Investigation of methylation CpG islands in p16 and p15 genes in cutaneous and uveal malignant melanoma

Grzegorz Gmyrek, Eliza Kwiatkowska,
Katarzyna Lamperska, Andrzej Mackiewicz

Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej w Poznaniu,
Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań

WSTĘP

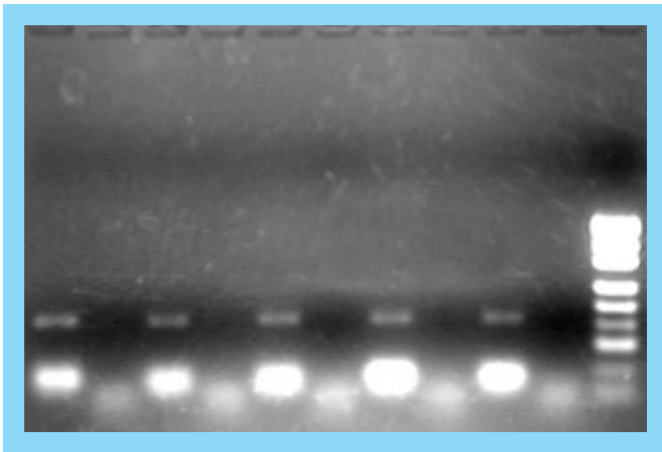
Rocznie w Polsce wykrywa się ok. 2 tys. nowych przypadków zachorowań na czerniaka, z których znaczna część występuje w zaawansowanym stadium klinicznym. Wg danych statystycznych większość wszystkich umiejscowień czerniaka złośliwego stanowi skóra, drugim miejscem występowania jest gałka oczna [1, 2].

Etiologia czerniaka nie jest jeszcze w pełni poznana, ale uważa się, że jest on wypadkową szeregu czynników zewnętrznych oraz osobniczych. Kluczowym czynnikiem determinującym rozwój czerniaka są zmiany w DNA jego komórki prekursorowej – melanocyta. W komórkach czerniaka obserwuje się często aneuploidię oraz zaburzenia w replikacji genomowego DNA. Typowy profil aberracji (rearanżacje, duplikacje czy delecje) w czerniaku złośliwym skóry obejmuje chromosomy: 1, 6, 7, 9, 10 i 11. Z kolei dla czerniaka gałki ocznej charakterystyczne są zmiany w obrębie chromosomów: 3, 6, 8 oraz 9. Szczegółne zainteresowanie w przypadku obu czerniaków budzi region p21-22 chromosomu 9 [1]. W tym obszarze zlokalizowane są 2 geny supresorowe: p16 (zwany też CDKN2A, INK4A lub MTS1) oraz położony ok. 25 kb od jego 5' końca – gen p15 (CDKN2B, INK4B). Kodowane przez te geny białka wykazują duże podobieństwo strukturalne i funkcjonalne, odrywając istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego [3]. P16 i P15 są inhibitorami kinaz zależnych od cyklin, w szczególności CDK4 i CDK6, biorących udział w fosforylacji Rb [4, 5]. P16 może kontrolować cykl komórkowy także poprzez bezpośrednią regulację transkrypcji. W tym przypadku CDKN2A, wiążąc się z C-końcową domeną polimerazy RNA II unie-

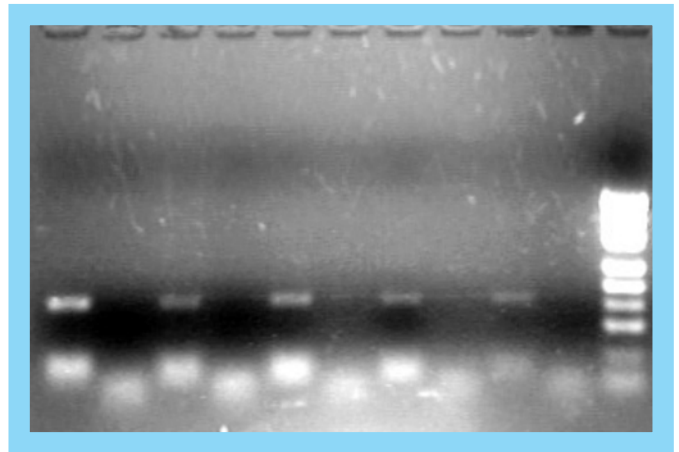
możliwia fosforylację tego fragmentu przez czynnik transkrypcyjny TFIIH [6]. Dodatkowo okazało się, że dzięki unikalnej organizacji eksonu 1 genu p16 w tym samym locus oprócz P16 kodowane jest także białko P14ARF. Poprzez wiązanie się z MDM2 zapobiega degradacji białka P53, wpływając w ten sposób na jego stabilizację. Tym samym P16 stanowi istotne ogniwo łączące 2 najważniejsze szlaki regulacji cyklu komórkowego [7].

Zmiany w obrębie 9p21-22 pojawiają się w szeregu typów nowotworów z różną częstotliwością, a do najczęściej występujących należą homo- i heterozygotyczne delecje, obejmujące przede wszystkim gen p16 wraz z przyległym do niego genem p15 [8, 9]. Duża zawartość 2-nukleotydów CpG (67 proc.) w genach p15 i p16 wskazywała, że innym rodzajem regulacji ekspresji może być metylacja wysp CpG w odcinkach promotorowych [10, 11]. Metylację cytozyny genu p16 stwierdzono m.in. w raku głowy i szyi, piersi, okrężnicy, pęcherza czy w glejakach [8]. Z kolei w schorzeniach obejmujących szpiczaka mnogiego [12], zespół mielodysplastyczny [13] oraz w pierwotnej ostrej białaczce [14] wystąpiła metylacja w genie p15. Metylację wysp CpG wykazano także w czerniaku złośliwym skóry i gałki ocznej.

W Zakładzie Diagnostyki i Immunologii Nowotworów poddano badaniu 110 preparatów tkankowych, z których 80 pochodziło od chorych na czerniaka złośliwego gałki ocznej. W 30 przypadkach materiał pochodził od chorych na czerniaka złośliwego skóry. Jako standardową metodę badawczą wybrano MSP (*methylation specific PCR*). W analizie tej zmodyfikowany chemicznie DNA służy jako matryca w reakcji



Fot. 1. Analiza metylacji promotora genu p15 w czerniaku złośliwym skóry



Fot. 2. Analiza metylacji promotora genu p15 w czerniaku złośliwym gałki ocznej

PCR z zastosowaniem 2 rodzajów starterów umożliwiających rozróżnienie formy zmetylowanej od niemetylowanej.

MATERIAŁY I METODY

Izolacja genomowego DNA

DNA było izolowane z zamrożonych tkanek nowotworowych. Izolację przeprowadzano wg standardowej metody z zastosowaniem proteinazy K, następnie stosowano kilkakrotną ekstrakcję fenolem (pH 8.0) i chloroformem. Oczyszczony DNA był wytrącany przy pomocy 5M NaCl oraz etanolu. Osady były suszone, a następnie rozpuszczane w H₂O. Stężenia mierzono spektrofotometrycznie, a jakość wyizolowanego DNA sprawdzano stosując elektroforezę agarozową.

Analiza metylacji wysp CpG w odcinkach promotorowych genów p16 i p15

DNA o stężeniu 1 µg poddawano modyfikacji chemicznej przy pomocy 3 M podsiarczynu sodowego i 10 nM hydrochinonu zgodnie z opisem podanym przez Herman i wsp. [15]. Następnie DNA oczyszczano przy pomocy zestawu Wizard[®] DNA Clean-up (Promega) wg instrukcji podanej przez producenta. Modyfikację chemiczną kończono przez dodanie 3M NaOH. W końcowym etapie DNA precypitowano etanolem; tak

przygotowane stanowiło matrycę w reakcji MSP z odpowiednio dobranymi starterami. Reakcja była przeprowadzana w objętości 10 µl w następującym profilu termicznym: wstępna denaturacja 95°C/12'; 95°C/45'; 60°C/45'; 72°C/60'. Całość zamykała się w 35 cyklach, po których następowała końcowa elongacja w temp. 72°C przez 5 min. Po reakcji MSP produkty amplifikacji sprawdzano w 2-procentowym żelu agarozowym.

WYNIKI

W przypadku genu p15 oraz p16 produkty reakcji PCR otrzymano jedynie w reakcji z zastosowaniem starterów pozwalających na powielenie fragmentów niemetylowanych. W żadnym ze 110 przypadków, zarówno dla genu p15, jak i p16 nie stwierdzono metylacji w odcinkach promotorowych.

DYSKUSJA

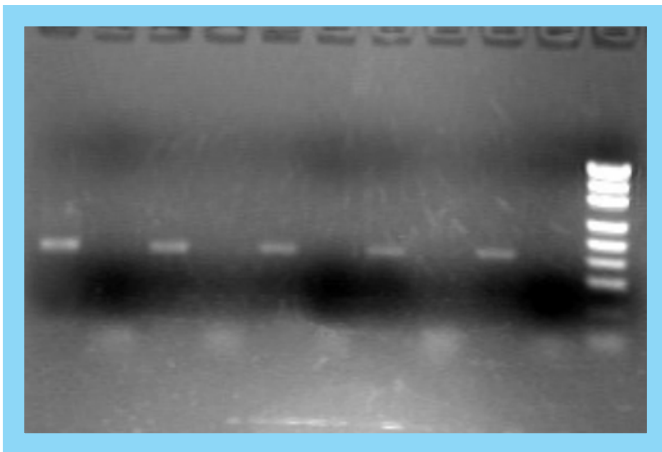
Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że metylacja wysp CpG nie jest odpowiedzialna za utratę ekspresji białek P16 i P15 w czerniaku złośliwym skóry i gałki ocznej. Wyniki te są zgodne z rezultatami uzyskanymi przez innych badaczy. Gonzalgo i wsp. [16] badali 30 przypadków czerniaka skóry. Przy zastosowaniu takich metod jak: MSP, Ms-NuPE oraz Southern-blott w 3 przypadkach (10 proc.) stwierdzono metylację

promotora p16. Z kolei Merbs i Sindransky [17] analizowali za pomocą MSP występowanie metylacji w 33 przypadkach czerniaka naczyniówkowo-rzęskowego. W 2 przypadkach (6,1 proc.) wykazano obecność metylacji promotora w genie p16. W badaniach autorów nie wykazano obecności metylacji w p16 ani w p15. Podsumowując całą analizę 110 przypadków czerniaka wydaje się, że proces metylacji odcinków promotorowych jest zjawiskiem rzadkim i nie ma większego wpływu na obniżanie ekspresji białek P16 i P15.

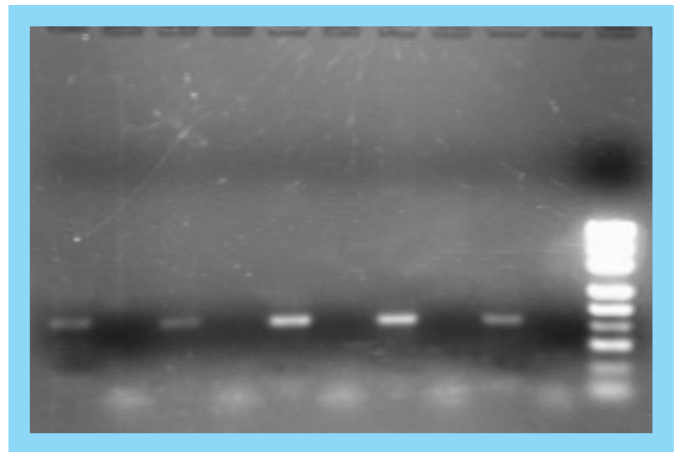
Powstaje więc pytanie, jakie inne mechanizmy mogą być zaangażowane w inaktywację genów p16 i p15 w obu typach czerniaków. Dotychczas stwierdzono, że inaktywację w ww. genach oprócz metylacji mogą powodować [18, 19, 20]:

- ▶ homozygotyczne delecje,
- ▶ LOH,
- ▶ mutacje punktowe w części kodującej,
- ▶ niestabilność odcinków mikrosatelitarnych.

Najwięcej przykładów opisujących wpływ ww. mechanizmów na ekspresję p16 i p15 dotyczy czerniaka złośliwego skóry. Większość zmian zlokalizowana jest w obrębie genu p16. Dominującym mechanizmem inaktywacji genu p15 wydaje się być homozygotyczna delecja, która obejmuje zasięgiem równocześnie p16. Istnieją również przypadki, w których



Fot. 3. Analiza metylacji promotora genu p16 w czerniaku złośliwym skóry



Fot. 4. Analiza metylacji promotora genu p16 w czerniaku złośliwym gałki ocznej

stwierdzano występowanie mutacji punktowych w p15 niezależnie od p16. Matsumura i wsp. [20] analizował 44 pierwotne i 10 przerzutowych przypadków czerniaka skóry. W jednym przypadku wykazano mutację punktową w genie p15 występującą niezależnie od p16. Z kolei w 10 przerzutowych czerniakach stwierdzono po jednej mutacji, występującej zarówno w p15 jak i w p16. Jednym z wniosków Matsumura i wsp. [20] było stwierdzenie, że mutacje mogą być charakterystyczne dla późniejszych etapów rozwoju czerniaka. Słuszność tej tezy wydają się potwierdzać wyniki otrzymane przez Platza i wsp. [21], który analizował 25 przypadków czerniaka złośliwego, będącego w stadium przerzutowości. U 3 pacjentów (12 proc.) zespół ten wykazał obecność mutacji w p16. W Zakładzie Diagnostyki i Immunologii Nowotworów również przeprowadzono analizę mutacyjną genu p16. Łącznie przeanalizowano 160 przypadków, z czego 144 stanowili chorzy ze zdiagnozowanym czerniakiem – *melanoma malignum*. W sumie wykryte mutacje somatyczne wystąpiły w 10 proc. przypadków. Nie stwierdzono żadnej zmiany o charakterze dziedzicznym. Podobna analiza została przeprowadzona dla czerniaka naczyńiówki. W analizowanym materiale wykryto substytucję w kodonie 84 GAC/GAT, która nie powodowała zmiany kodowanego aminokwasu (*Współczesna Onkologia*, 6: 1999).

Innym sposobem inaktywacji p16 i p15 są homo- i heterozygotyczne delecje. Fujimoto i wsp. [22] badali 46 przypadków pierwotnego czerniaka skóry. LOH została stwierdzona w 11 przypadkach. Ta sama liczba przypadków była przedmiotem analizy metylacji w genie p16. Przeprowadzono także analizę immunohistochemiczną. W 6 z 39 przypadków (15 proc.) wykazano całkowitą utratę ekspresji białka. W jednym z nich stwierdzono równocześnie LOH. Najwyraźniej związek pomiędzy LOH a utratą ekspresji P16 został pokazany przez Funka i wsp. [23]. Zespół ten badał 92 przypadki czerniaka skóry. W 5 z 7 analizowanych przypadków, w których nie stwierdzono ekspresji P16 wykazano LOH. Ponadto w jednym z nich obserwowano także metylację w zachowanym allelu p16. W innych badaniach Ohta i wsp. [24] analizowali m.in. częstość występowania LOH oraz heterozygotycznych delecji w 66 przypadkach czerniaka skóry o charakterze przerzutowym i w 19 pierwotnych czerniakach gałki ocznej. Utratę heterozygotyczności wykazano odpowiednio w 40 (63 proc.) i 6 (32 proc.) przypadkach, natomiast występowanie heterozygotycznych delecji w 19 (30 proc.) i 5 (26 proc.) przypadkach. Wyniki tych badań wydają się wskazywać, że LOH jest charakterystyczne dla bardziej zaawansowanych form czerniaka. Niestety, autorzy nie przeprowadzili równoległej analizy immunohistochemicznej, stąd nie można jednoznacznie stwierdzić czy LOH mogła mieć związek z utratą ekspresji P16. W innych badaniach Eggeling i wsp. [25] analizowali 11 przypadków czerniaka skóry o charakterze

przerzutowym. Utrata heterozygotyczności i heterozygotyczności była wykrywana w 9 (82 proc.) przypadkach. W 36 proc. przypadków wykazano heterozygotyczną delecję markera D9S1748. Wskazuje to, zdaniem Eggelinga i wsp. [25], że w sąsiedztwie p15 lub p16 może znajdować się inny gen supresorowy związany z progresją czerniaka.

Wydaje się, że dla czerniaka skóry najbardziej charakterystyczny mechanizm inaktywacji to homo- i heterozygotyczne delecje. Nie jest także wykluczone, że mogą się do tego przyczyniać również mutacje punktowe, metylacje czy niestabilność odcińków mikrosatelitarnych.

W przypadku czerniaka gałki ocznej sprawa jest znacznie bardziej skomplikowana. Nowotwór ten nie był tak intensywnie badany jak czerniak skóry. Jednak i tutaj występuje wysoki odsetek LOH i heterozygotycznych delecji. Podobnie jak w czerniaku skóry utrata ekspresji P16 wydaje się mieć związek z progresją molekularną. Brakuje do tej pory danych pokazujących związek pomiędzy LOH a utratą ekspresji P16. Niektórzy badacze [26] zmniejszają rolę 9p21 w powstawaniu czerniaka oka. Większe znaczenie wydaje się mieć w tym przypadku monosomia chromosomu 3 [27]. Należy mieć nadzieję, że prace trwające nad sekwencjonowaniem ludzkiego genomu wskażą inne geny, w których zmiany mogą mieć związek z powstawaniem czerniaka złośliwego.

PIŚMIENNICTWO

- Skowronek J, Mackiewicz A, Żygulska-Mach H. Wstęp. W: Skowronek J, Mackiewicz A, Żygulska-Mach H. (red.) *Czerniak złośliwy*. Wydawnictwa Medyczne Termedia 1998; 13. oraz: Mackiewicz K, Mackiewicz A. *Fazy progresji molekularnej czerniaka złośliwego*. W: Skowronek J, Mackiewicz A, Żygulska-Mach H. (red.) *Czerniak złośliwy*. Wydawnictwa Medyczne Termedia 1998; 28-29;
- Garner A, Klintworth GK. *Pathobiology of ocular disease: a dynamic approach*. Marcel Dekker Inc, New York 1994.
- Bogenrieder T, Landthaler M, Stolz W. *p16^{INK4A}/MTS1/CDKN2 – das „Melanomgen“?* Hautarzt 1998; 49: 91-100.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature 1993; 366: 704-707.
- Hannon GJ., Beach D. *p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-β-induced cell cycle arrest*. Nature 1994; 371: 257-260.
- Serizawa H. *Cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a inhibits phosphorylation of RNA polymerase II by general transcription factor TFIIF*. The Journal of Biological Chemistry 1998; 273: 5427-5430.
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough G. W. *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways*. Cell 1998; 92: 725-734.
- Liggett H. W, Sidransky D. *Role the p16 tumor suppressor gene in cancer*. Journal of Clinical Oncology 1998; 16: 1197-1206.
- Wagner SN, Wagner C, Bredigkeit L. *Homozygous deletion of the p16INK4a and the p15INK4b tumor suppressor genes in a subset of human sporadic cutaneous malignant melanoma*. British Journal of Dermatology 1998; 138: 13-21.

- Merlo A, Herman JG, Mao L. *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nature Medicine 1995; 1: 686-692.
- Herman JG, Jen J, Merlo A. *Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15^{INK4B}*. Cancer Research 1996; 56: 722-727.
- Ng LHM, Chung FY, Lo WK. *Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma*. Blood 1997; 89: 2500-2506.
- Uchida T, Kinoshita T, Nagai H. *Hypermethylation of the p15 gene in myelodysplastic syndromes*. Blood 1997; 90: 1403-1409.
- Cameron EE, Baylin BS, Herman JG. *p15^{INK4B} CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogenous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing*. Blood 1999; 94: 2445-2451.
- Herman GJ, Graff RJ, Myöhänen S. *Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 9821-9826.
- Gonzalzo LM, Bender MCh, You HE. *Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors*. Cancer Research 1997; 57: 5336-5347.
- Merbs LS, Sidransky D. *Analysis of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) alterations in primary sporadic uveal melanoma*. IOVS 1999; 40: 779-783.
- Hirama T, Koeffler PH. *Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer*. Blood 1995; 86: 841-854.
- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y. *Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours*. Nature Genetics 1995; 11.
- Matsumura Y, Nishigori Ch, Yagi T. *Mutations of p16 and p15 tumor suppressor genes and replication errors contribute independently to the pathogenesis of sporadic malignant melanoma*. Arch Dermatol Res 1998; 290: 175-180.
- Platz A, Ringborg U, Lagerlöf B. *Mutational analysis of CDKN2 gene in metastases from patients with cutaneous malignant melanoma*. British Journal of Cancer 1996; 73: 344-348.
- Fujimoto A, Morita R, Hattori K, Takehara K, Takata M. *p16^{INK4B} inactivation is not frequent in uncultured sporadic primary cutaneous melanoma*. Oncogene 1999; 18: 2527-2532.
- Funk JO, Schiller PI, Barret MT. *p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma*. J Cutan Pathol 1998; 25: 291-296.
- Ohta M, Berd D, Shimizu M. *Deletion mapping of chromosome region 9p21-p22 surrounding the CDKN2 locus in melanoma*. Int J Cancer 1996; 65: 762-767.
- Eggeling von F, Werner G, Theuer C. *Analysis of the tumor suppressor gene p16^{INK4A} in microdissected melanoma metastases by sequencing, and microsatellite and methylation screening*. Arch Dermatol Res 1999; 291: 474-477.
- Singh AD, Wang MX, Donoso LA. *Genetics aspects of uveal melanoma: brief review*. Seminars in Oncology 1996; 23: 768-772.
- Prescher G, Bornfeld N, Hirsch H. *Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma*. Lancet 1996; 347: 1222-1225.

ADRES DO KORESPONDENCI

dr n. med. **Katarzyna Lamperska**
Wielkopolskie Centrum Onkologii
Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów
ul. Garbary 15, 61-866 Poznań
e-mail: paman@melanoma.efis2000.pl