

Analiza mutacji p14 i p16 w czerniaku skóry

Analysis of the p14 and p16 mutations in cutaneous melanoma

Lidia Fątowicz¹, Waldemar Placek¹, Tadeusz Tadrowski¹, Wojciech Biernat²

¹Katedra i Klinika Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i Immunodermatologii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Waldemar Placek

²Katedra i Zakład Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Wojciech Biernat

Przegl Dermatol 2011, 98, 228–233

STRESZCZENIE

SŁOWA KLUCZOWE:
czerniak, CDKN2A, p16,
p14ARF, SSCP.

KEY WORDS:
melanoma, CDKN2A, p16,
p14ARF, SSCP.

Wprowadzenie. Czerniak jest nowotworem wywodzącym się z melanocytów występujących przede wszystkim w obrębie skóry, powstałym w wyniku długotrwałej ekspozycji na czynniki mutagenne i nieprawidłowego systemu naprawy DNA. Patogeneza tego nowotworu jest złożona, a w procesie kancerogenezy bierze udział gen *CDKN2A*, którego produkty białkowe uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego. Gen *CDKN2A* koduje dwa transkrypty: białko p16 będące inhibitorem kinaz cyklinozależnych (CDK4/CDK6) oraz białko p14ARF odpowiedzialne za stabilizację p53. Mutacje w genie *CDKN2A* mogą w sposób istotny zaburzyć funkcje biologiczne obu tych białek. Mogą się przyczynić do nadmiernej bądź niewystarczającej ich ekspresji, a w konsekwencji doprowadzić do powstania nowotworów. Liczne badania naukowe wskazują na związek mutacji p14 i p16 w genie *CDKN2A* z występowaniem czerniaka skóry.

Cel pracy. Analiza występowania mutacji p14 i p16 w czerniaku skóry w badanej grupie 40 guzów.

Materiał i metodyka. Materiał do badań stanowiły utrwalone w parafinie wycinki z rozpoznaniem czerniaka potwierdzonym histopatologicznie i immunomorfologicznie. W celu wykrycia mutacji zastosowano metodę PCR-SSCP.

Wyniki. W wyniku przeprowadzonej analizy molekularnej mutacje w genie *CDKN2A* białek p14 i p16 wykryto w 38 spośród 40 badanych wycinków z czerniaka, co stanowi 95% badanych przypadków. Mutacje wykryto we wszystkich trzech eksonach genu *CDKN2A*, największą częstość stwierdzono w eksonie 2 i 3.

Wnioski. Uzyskane wyniki badań wskazują, że mutacje p16 i p14 genu *CDKN2A* wiążą się z czerniakiem skóry.

ABSTRACT

Introduction. Cutaneous melanoma is a malignant tumour derived from melanocytes that occurs primarily in the skin. It is a result of prolonged exposure to mutagenic factors and an abnormal DNA repair system. The pathogenesis of this tumour is complex and depends to a large extent on inactivation of the *CDKN2A* gene, whose protein products are involved in cell cycle control. The *CDKN2A* gene encodes two transcripts – p16 protein, which is an inhibitor of cyclin-dependent kinases (CDK4/CDK6), and p14ARF protein, responsible for stabiliza-

ADRES DO KORESPONDENCJI:
mgr Lidia Fątowicz
Katedra i Klinika Dermatologii,
Chorób Przenoszonych
Drogą Płciową
i Immunodermatologii
Collegium Medicum
ul. Kurpińskiego 5
85-096 Bydgoszcz
e-mail: lidia_sylwia@o2.pl

tion of p53. Mutations in the *CDKN2A* gene can significantly impair the biological functions of these two proteins, and may contribute to their excessive or inadequate expression and consequently lead to malignancy. Numerous scientific studies have linked mutations in p14 and p16 in the *CDKN2A* gene with melanoma incidence.

Objective. Analysis of p14 and p16 mutations in cutaneous melanoma in a test group of 40 tumours.

Material and methods. The material consisted of paraffin-fixed biopsies with a diagnosis of melanoma confirmed histologically and immunomorphologically. In order to detect the mutation PCR-SSCP was used.

Results. Molecular mutations of p14 and p16 proteins in the *CDKN2A* gene were detected in 38 out of 40 examined tissues. This represents 95% of melanoma biopsies. Mutations were detected in all three exons of the *CDKN2A* gene, with the greatest frequency in the second and third exon.

Conclusion. Our results indicate that mutations in p16 and p14 of the *CDKN2A* gene are associated with cutaneous melanoma.

WPROWADZENIE

Czerniak skóry jest nowotworem wywodzącym się z melanocytów występujących przede wszystkim w obrębie skóry [1, 2], powstałym w wyniku długotrwałej ekspozycji na czynniki mutagenne i nieprawidłowego systemu naprawy DNA [3–5]. Transformacja nowotworowa to wynik zmian powstałych w obrębie 4 różnych klas genów, m.in. w obrębie genów supresorowych [6, 7]. W piśmiennictwie opisano ponad 100 genów supresorowych. Brak kontroli nad przebiegiem cyklu komórkowego sprzyja transformacji nowotworowej i dlatego w większości nowotworów człowieka występują mutacje w co najmniej jednym z genów regulujących cykl, czyli RB, TP53, CDK4 i *CDKN2A* [6].

Kompletny gen inhibitora kinazy cyklozależnej 2A (*CDKN2A*) zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 9 w prążku cytogenetycznym 21.3. Gen ten ma niezwykłą zdolność kodowania całkowicie różnych białek z dwóch transkryptów splicingu alternatywnego [8]. Transkrypt α obejmuje eksony 1 α , 2 i 3, kodując białko p16INK4A, podczas gdy mniejszy transkrypt β zawierający eksony 1 β , 2 i 3 koduje białko p14ARF. Jest to wynik translacji sekwencji eksonu 2 jako alternatywnej ramki odczytu w stosunku do eksonu 2 białka p16INK4A [8].

Białko p14ARF odgrywa rolę supresora nowotworowego, regulując cykl komórkowy podczas przejścia fazy G1 i G2 poprzez inhibicję HDM2 (ang. *human double minute*) [9]. Białko p16 należy do rodziny białek INK4, które blokują aktywność zależnych od kinaz cyklin D (CDK) oraz odgrywa-

ją istotną rolę w kontroli cyklu komórkowego w fazie G1/S [10–12].

Od wielu lat wiele zespołów badawczych analizuje podłoże genetyczne czerniaków [13]. W liniach hodowlanych tego nowotworu w 90% stwierdzono nieprawidłowości w zmutowanym genie. Do najczęstszych mutacji zalicza się delecje fragmentu genu bądź *locus* (50% czerniaków), hipermetylację wysp CpG w odcinku promotorowym (20–75% czerniaków), mutacje punktowe (9% czerniaków) i niestabilność odcinków mikrosatelitarnych [13, 14]. Większość nieprawidłowości w genie *CDKN2A* stanowi substytucję pojedynczych par zasad. Mutacje w *loci* tego genu dotyczą obu białek przez nie kodowanych – p14 i p16 [15]. Innym typem mutacji *CDKN2A* są mutacje w rejonach niekodujących. Należą do nich: 5'UTR, miejsca splicingowe, sekwencje intronowe oraz 3'UTR. W genie *CDKN2A* występują również polimorfizmy, do których najczęściej zalicza się 148Ala/Thr oraz dwa w odcinku 3'UTR 500 C/G i 540 C/T [13].

CEL PRACY

Celem pracy była analiza występowania mutacji białek p16 i p14 genu *CDKN2A* w czerniaku złośliwym.

MATERIAŁ I METODYKA

Materiał do badań stanowiły zarchiwizowane, utrwalone w parafinie wycinki skóry z rozpozna-

niem czerniaka potwierdzonym w badaniu histopatologicznym i immunomorfologicznym. Materiał otrzymano z Katedry i Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Próbkę poddano badaniom pochodzący od 40 chorych.

W celu detekcji mutacji *CDKN2A* zastosowano metodę polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (ang. *polymerase chain reaction – single strand conformation polymorphism – PCR-SSCP*). W pierwszym etapie dokonano odparafinowania wycinków czerniaka w sposób typowy jak w przypadku przygotowania preparatu histopatologicznego, a następnie przeprowadzono izolację DNA przy użyciu zestawu Genomic Mini firmy A&A Biotechnology według załączonego protokołu.

Metoda PCR-SSCP

Technika ta polegała na amplifikacji wyizolowanego materiału genetycznego klasyczną metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*

– PCR). Skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbkę jest następujący: Polimeraza Taq 100 U/μl 0,2 μl, jony magnezu 10 mM 1,2 μl, bufor reakcyjny 4 μl, dNTP 0,4 μl, starter F 2 μl, starter R 2 μl, woda 9,2 μl i DNA pacjenta 1 μl. Wykorzystano następujące pary starterów: 1) dla eksonu 1: 1/16F 5'-GGG AGC AGC ATG GAG CCG-3', 1/16R 5'-AGT CGC CCG CCA TCC CCT-3'; 2) dla eksonu 2: 2A/16F 5'-AGC TTC CTT TCC GTC AGT-3' dla formy dzikiej DNA, 2A/16R 5'-CCA GGT CCA CCG GCA GA-3' dla formy dzikiej DNA, 2B/16F 5'-AGC CCA ACT GCG CCG AC-3', 2B/16R 5'-CCA GGT CCA CCG GCA GA-3', 2C/16F 5'-TGG ACG TGC GCG ATG C-3', 2C/16R 5'-GGA AGC TCT CAG GGT ACA AAT TC-3'; 3) dla eksonu 3: 3/13F 5'-CCG GTA GGG ACG GCA AGA GA-5', 3/16R 5'-CTG TAG GAC CCT CGG TGA CTG ATG A-3'. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μl. Reakcja PCR obejmowała 3 cykliczne, powtarzające się 35 razy etapy poprzedzone wstępną denaturacją DNA w temperaturze 94°C. Uzyskany produkt amplifikacji był denaturowany termicznie w buforze obciążającym z dodatkiem formamidu do jednoniciowego ssDNA, a następnie poddawany 10-godzinnej elektroforezie w 10% żelu poliakrylamidowym, w temperaturze 8°C, przy napięciu 200 V w warunkach niedenaturujących.

Barwienie srebrem

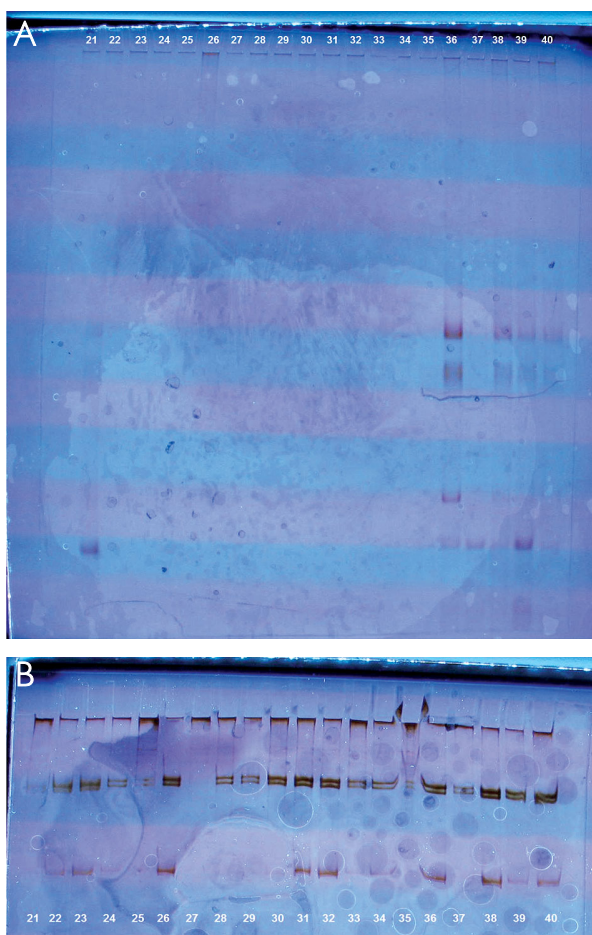
Żel inkubowano w azotanie srebra (0,2-procentowy roztwór, 30 minut) z dodatkiem formaldehydu, a następnie płukano w wodzie dejonizowanej. W celu uwidocznienia uzyskanych prążków żel inkubowano w 3-procentowym roztworze węglanu sodu. Po wybarwieniu żelu reakcję zatrzymywano 200 ml 10-procentowego roztworu kwasu octowego. Wyniki wstępnie odczytywano, analizowano i archiwizowano przy zastosowaniu oprogramowania Doc-ItLS.

WYNIKI

W preparatach DNA izolowanego ze zmian czerniakowych pochodzących od 40 pacjentów zaobserwowano różnice migracji konformerów w elektroforezie SSCP (ryc. 1.-3.). W 38 z 40 badanych wycinków (95%) stwierdzono mutacje w genie *CDKN2A*. W 2 tkankach (5%) nie ujawniono żadnej mutacji w obrębie tego genu.

U 8 z 40 badanych pacjentów (20%) zaobserwowano mutacje tylko w eksonie 1, 26 chorych (65%) miało mutacje w eksonie 2 – wariant A, u 8 (20%) wystąpiły mutacje w eksonie 2 – wariant B, a u 32 pacjentów (80%) wykryto mutacje w eksonie 3 (tab. I).

U 6 z 40 badanych osób (15%) obecne były mutacje w eksonie 1 i 2, a u 3 (7,5%) w eksonie 1 i 2B. Mutacje w eksonie 3 i 2A stwierdzono u 21 pacjen-



Ryc. 1. **A** – Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR-SSCP – ekson 1 genu p16, **B** – rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR-SSCP – ekson 2 genu p16

Fig. 1. **A** – Electrophoretic separation of PCR-SSCP products – p16 gene exon 1, **B** – electrophoretic separation of PCR-SSCP products – p16 gene exon 2

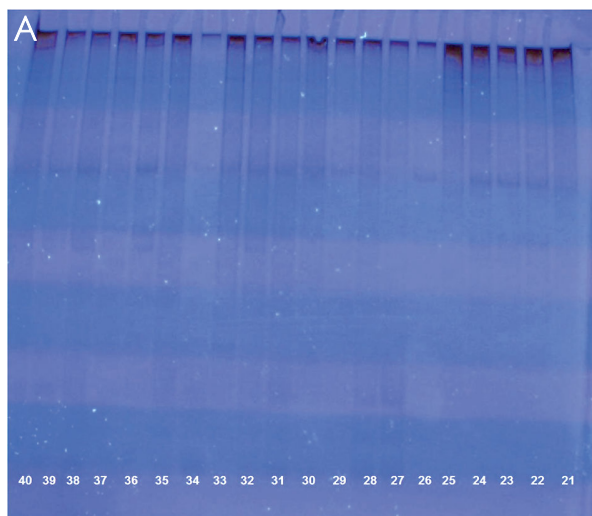
tów (52,5%), w eksonie 3 i 2B u 8 chorych (20%), a w eksonie 1 i 3 u 8 badanych (20%) (tab. II). W niektórych guzach stwierdzono więc przynajmniej 2 mutacje (2A i 3), ale na pewno w części guzów mutacje były liczniejsze.

Spośród 40 (100%) badanych próbek rozpoznano czerniaka w 38 (95%) zaobserwowano mutacje w genie *CDKN2A*. W 2 tkankach (5%) nie wykazano żadnej mutacji w obrębie tego genu.

OMÓWIENIE

Czerniak stanowi około 2% wszystkich nowotworów i jest przyczyną około 1% ogółu zgonów z przyczyn nowotworowych. Udział genu *CDKN2A* w regulacji cyklu komórkowego jest znaczący. Prawidłowy przebieg tego cyklu kontrolują białka p16 i p14ARF. Mutacje obecne w genie *CDKN2A* mogą w sposób istotny zaburzyć funkcje biologiczne tych białek, powodować ich nadmierną bądź niewystarczającą ekspresję.

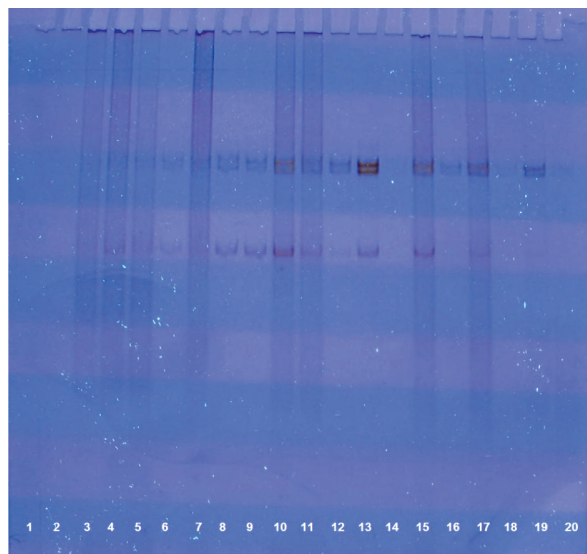
Rola białka p16 jako inhibitora kinaz cyklu komórkowego oraz udział białka p14ARF w stabilizacji białka p53 sugerują, że zmiany w budowie lub funkcji tych białek będące wynikiem mutacji mogą się przyczynić do powstania różnych nowotworów.



Ryc. 2. A – Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR-SSCP – ekson 2 genu p16, **B** – rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR-SSCP – ekson 2 genu p16, starter dla formy dzikiej

Fig. 2. A – Electrophoretic separation of PCR-SSCP products – p16 gene exon 2, **B** – electrophoretic separation of PCR-SSCP products – p16 gene exon 2, the starter for the wild DNA

W wielu przeprowadzonych badaniach molekularnych, których celem była analiza zależności pomiędzy mutacjami w genie *CDKN2A* a różnymi nowotworami, wykazano ich związek z nowotworami żołądka, trzustki, jelit, skóry, układu nerwowego, głowy, szyi, jajnika oraz piersi. Autorzy badań wśród przyczyn inaktywacji genu *CDKN2A* wymieniają: utratę *locus* p21, hipermetylację wysp CpG w odcinku promotorowym, homozygotyczne delekcje, mutacje w obrębie części kodującej genu, niesta-



Ryc. 3. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR-SSCP – ekson 3 genu p16

Fig. 3. Electrophoretic separation of PCR-SSCP products – p16 gene exon 3

Tabela I. Liczba pacjentów mających mutacje w eksonach *CDKN2A*

Table I. Number of patients with mutations in *CDKN2A* exons

Ekson	Liczba mutacji
1	8/40 (20%)
2	A 26/40 (65%) B 8/40 (20%)
3	32/40 (80%)

Tabela II. Liczba pacjentów mających mutacje w kilku eksonach *CDKN2A*

Table II. Numbers of patients with mutations in multiple *CDKN2A* exons

Ekson	Liczba mutacji
1 i 2A	6/40 (15%)
1 i 2B	3/40 (7,5%)
2A i 3	21/40 (52,5%)
2B i 3	8/40 (20%)
1 i 3	8/40 (20%)

bilność odcinków promotorowych oraz polimorfizmy genetyczne [11, 12, 16–23]. Według Piepkorna [24] zmiany dotyczące p16 są powszechne w hodowli czerniaka i dotyczą około 70% badanych komórek. Delecje p16 występują znacznie częściej niż mutacje punktowe. Z kolei Kaczmarek i wsp. [22] badali mechanizmy inaktywacji p16 w czerniakach skóry i oka. Stosując technikę PCR-SSCP, stwierdzili w dwóch przypadkach substytucję C/T, która nie powoduje jednak zmiany kodowanego aminokwasu. Chin i wsp. [25] wskazują na występowanie intragenicznych mutacji u krewnych osób chorych na czerniaka rodzinnego, w szczególności p16INK4A, przy zachowaniu prawidłowej funkcji p14ARF. Sugerują ponadto, że u 25–40% rodzin podatnych na czerniaka oraz 0,2–2% chorych na czerniaka sporadycznego występują mutacje INK4A w regionach kodujących oraz polimorfizm 5' i 3' UTR. Straume i wsp. [26] badali mutacje w *CDKN2A* czerniaka skóry. Tylko w 2 spośród 50 przypadków, tj. u 4%, wystąpiły zmiany sekwencji genu, wszystkie w eksonie 2. Monzon i wsp. [27] analizowali występowanie mutacji w genie *CDKN2A* u osób z czerniakiem wielopostaciowym. Stosując analizę SSCP, zaobserwowali różnice migracji konformerów u 5 spośród 33 pacjentów (15%), 2 mutacje zlokalizowali w eksonie 1 α oraz 2 w eksonie 2. Freedberg i wsp. [28], badając mechanizmy zaburzenia ekspresji p14ARF i p16 w liniach komórkowych czerniaka, wykazali, że głównym mechanizmem inaktywującym oba białka jest delecja obejmująca region między eksonem 1 β ARF a eksonem 1 α p16. Oceniając częstość zmian p16 i p14ARF, ci sami badacze wykorzystali guzy przerzutowe czerniaka i wykazali, że 68% guzów ma delecję obejmującą eksony 1 α , 1 β i 2, 58% guzów charakteryzuje się trwałą utratą eksonu 1 β , natomiast 31% ma całkowicie nieaktywne regiony kodujące p16. Metylacja promotora ARF wystąpiła w 57% guzów, metylacja odcinka promotorowego p16 w 27%, natomiast 12% przypadków charakteryzowało się metylacją promotorów obu białek.

W badaniu własnym wszystkie tkanki pochodziły od 40 chorych na czerniaka. Mutację stwierdzono u 38 pacjentów, co stanowi 95% wszystkich badanych. Zastosowana metoda PCR-SSCP nie pozwoliła jednoznacznie określić częstości występowania poszczególnych mutacji p16 i p14, gdyż w badaniu nie użyto markerów dla analizowanych mutacji.

Rola p16 w rozwoju czerniaka skóry jest dobrze poznana i opisana w piśmiennictwie, jednak udział w tym procesie ARF w dalszym ciągu pozostaje kontrowersyjny. Aby rozwiązać ten problem, w różnych ośrodkach nadal trwają badania nad zmianami genetycznymi i epigenetycznymi w *locus* 9p21 oraz poszukiwania genów zaangażowanych w transformację nowotworową czerniaka.

WNIOSKI

W badaniach własnych odsetek czerniaków skóry, w których występują mutacje p16 i p14 genu *CDKN2A*, jest bardzo duży i wynosi 95%. Świadczy to o dużej swoistości mutacji w obrębie białek strażników genomu p14 i p1 genu *CDKN2A*.

Piśmiennictwo

1. **Bień S.:** Czerniak złośliwy w obrębie głowy i szyi. *Otolaryngol Pol* 2005, 4, 113-120.
2. **Iżycki D.:** Współczesne poglądy na czynniki ryzyka i profilaktykę czerniaka złośliwego. Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu.
3. **Kordek R.:** Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy. Via Medica, Gdańsk, 2007.
4. **Starska K., Łukomski M.:** Rola limfocytów Th i Tc w powstawaniu i progresji nowotworów głowy i szyi. *Otolaryngol Pol* 2005, 4, 59-63.
5. **Wideliński M.S., Wideł M.:** Mechanizmy przerzutowania i markery progresji nowotworów złośliwych. I. Rak jelita grubego. *Post Hig Med Dośw* 2006, 60, 453-470.
6. **Domagała W.:** Molekularne podstawy karcynogenezy i ścieżki sygnałowe niektórych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. *Pol Przegl Neurol* 2007, 3, 127-141.
7. **Pławski A., Podralska M., Krokowicz P., Paszkowski J., Lubiński J., Słomski R.:** Rodzinna polipowatość gruczolakowata jelita grubego. *Post N Med* 2008, 7, 463-471.
8. **Laud K., Marian C., Avril M.F., Barrois M., Chompred A., Goldstein A.M.:** Comprehensive analysis of *CDKN2A* (p16INK4A/p14ARF) and *CDKN2B* genes in 53 melanoma index cases considered to be at heightened risk of melanoma. *J Med Genet* 2006, 43, 39-47.
9. **Soufir N., Lacapere J.J., Bertrand G., Matichard E., Meziani R., Mirebeau D. i inni:** Germline mutations of the *INK4A-ARF* gene in patients with suspected genetic predisposition to melanoma. *Br J Cancer* 2004, 90, 503-509.
10. **Rhind N., Russell P.:** Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds. *Curr Biol* 2000, 10, R908-R911.
11. **Robertson K.D., Jones P.A.:** Tissue-specific alternative splicing in the human *INK4A/ARF* cell cycle regulatory locus. *Oncogene* 1999, 18, 3810-3820.
12. **Rocco J.W., Sindransky D.:** p16 (MTS-1/CDKN2/INK4A) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001, 264, 42-55.
13. **Lamperska K., Przybyła A., Kaczmarek A., Leporowska E., Mackiewicz A.:** Podłoże genetyczne czerniaka – badania własne i przegląd piśmiennictwa. *Współ Onkol* 2006, 10, 297-302.
14. **Sekulic A., Haluska P., Miller A.J., Genebriera De Lamo J., Ejadi S., Pulido J.S. i inni:** Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc* 2008, 83, 825-846.
15. **Harland M., Goldstein A.M., Kukulicz K., Taylor C., Hogg D., Puig S. i inni:** A comparison of *CDKN2A* mutation detection within the Melanoma Genetics Consortium. *Eur J Cancer* 2008, 44, 1269-1274.
16. **Ayrault O., Andrique L., Larsen C.J., Seite P.:** Human Arf tumor suppressor specifically interacts with chromatin containing the promoter of rRNA genes. *Oncogene* 2004, 23, 8097-8104.
17. **Bartsch D.K., Sina-Frey M., Lang S., Wild A., Gerdes B., Barth P. i inni:** *CDKN2A* germline mutations in familial pancreatic cancer. *Ann Surg* 2002, 236, 730-737.

18. **Eymin B., Karayan L., Seite P., Brambilla C., Brambilla E., Larsen C.J. i inni:** Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene* 2001, 20, 1033-1041.
19. **Eymin B., Leduce C., Coll J.L., Brambilla E., Gazzeri S.:** p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene* 2003, 22, 1822-1835.
20. **Karayan L., Riou J.F., Seite P., Migeon J., Cantereau A., Larsen C.J.:** Human ARF protein interacts with topoisomerase I and stimulates its activity. *Oncogene* 2001, 20, 836-848.
21. **Lamperska K., Karazewska A., Kwiatkowska E., Mackiewicz A.:** Analysis of mutation in the p16/CDKN2A gene in sporadic and familial melanoma in the Polish population. *Acta Biochim Pol* 2002, 49, 369-376.
22. **Kaczmarek A., Romanowska B., Kwiatkowska E., Heitzman J., Mackiewicz K., Lamperska K. i inni:** Analiza ekspresji białka oraz mutacji i metylacji wysp CpG p16 w komórkach pierwotnego sporadycznego czerniaka oka. *Współcz Onkol* 1999, 6, 231-233.
23. **Peters G.:** Tumor suppression for ARF: the relative contributions of p16INK4A and p14ARF in melanoma. *JNCI* 2008, 100, 757-759.
24. **Piepkorn M.:** Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressor. *J Am Acad Dermatol* 2000, 42, 705-726.
25. **Chin L., Garraway L.A., Fisher D.E.:** Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 2006, 20, 2149-2182.
26. **Straume O., Smeds J., Kumar R., Hemminki K., Akslen L.A.:** Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* 2002, 161, 229-237.
27. **Monzon J., Liu L., Brill H., Goldstein A.M., Tucker M., From L. i inni:** CDKN2A mutations in multiple primary melanoma. *N Engl J Med* 1998, 338, 879-887.
28. **Freedberg D., Rigas S.H., Russak J., Gai W., Kaplow M., Osman I. i inni:** Frequent p16-independent inactivation of p14ARF in human melanoma. *JNCI* 2008, 100, 784-795.

Otrzymano: 25 III 2011 r.

Zaakceptowano: 26 IV 2011 r.