

(36)

Podłoże genetyczne czerniaka złośliwego błony naczyniowej oka

Genetic abnormalities underlying formation of choroidal melanoma

Ewa Proniewska-Skrętek, Małgorzata Wojnar, Zofia Mariak, Renata Zalewska

Z Kliniki Okulistyki Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: dr hab. n. med. Zofia Mariak

Summary: Genetic mechanisms underlying formation of ocular and skin melanoma differ in many aspects, the former being still poorly understood. It has been suggested that choroidal melanoma can develop due to accumulation of genetic alterations in the DNA of normal melanocytes. Neoplastic transformation in the chorioidea can be triggered as a consequence of the following genetic alterations:

- deletions and/or amplifications in the genetic material, usually in the chromosome 3, 6, 8, 9, 11, and 18;
- point mutations, especially within some exons, which leads to monosomia or loss of heterozygosity of the chromosome.

As a consequence of the above alterations a number of false codons can appear resulting in formation of defective enzymatic proteins. Some of these proteins, like p16 and p14, normally play a role of suppressors of oncogenesis and defects in their structure may result in melanoma formation.

Słowa kluczowe: czerniak błony naczyniowej, genetyka.

Key words: melanoma malignum choroideae, genetics.

Błona naczyniowa oka jest miejscem najczęstszej lokalizacji czerniaka złośliwego w gałce ocznej oraz drugim co do częstości miejscem występowania czerniaka w organizmie człowieka w ogóle (9). Nawet jeśli w niektórych populacjach, np. u osób rasy kaukaskiej, częstość zachorowania na ten nowotwór jest niewielka – 6 osób na milion ludności w ciągu roku – to śmiertelność w tych przypadkach pozostaje bardzo wysoka, sięgając 50% (11). Czerniak jest jednym z najagresywniejszych nowotworów, dających liczne przerzuty, zwłaszcza do wątroby i płuc (1,8). Rokowanie, dotyczące średniego przeżycia od chwili rozpoznania przerzutów, waha się zazwyczaj od 2 do 7 miesięcy, natomiast tylko mniej niż połowa osób (46%), u których rozpoznano czerniak pierwotny, przeżywa okres 15-letni (2).

Stan wiedzy na temat mechanizmów genetycznych, warunkujących powstawanie czerniaka gałki ocznej, jest wciąż niepełny, wręcz wycinkowy, fragmentaryczny. Mutacje, stanowiące przyczynę transformacji nowotworowej w oku, wydają się odmienne od tych, które występują w czerniaku skóry (9). Stosowanie więc uproszczonych analogii w interpretowaniu wyników badań, dotyczących tych różnych struktur, jest wysoce niewłaściwe. Podejmowane tak chętnie próby wykorzystania danych, odnoszących się do czerniaków skóry, w badaniach nad czerniakiem oka, podyktowane były zazwyczaj powszechnym i łatwym dostępem do tkanek nowotworowych skóry, podczas gdy guzy wewnątrzgałkowe nie stwarzają takich możliwości i są trudno dostępne. Stąd każda informacja uzyskana na ich temat jest niezwykle cenna.

Czerniak błony naczyniowej oka wywodzi się na ogół z prawidłowych melanocytów, które w wyniku mutacji genetycznej ulegają trans-

formacji nowotworowej. Istnieją też dowody na to, że dopiero melanocyty, zmienione dysplastycznie, mogą być prekursorami nowotworu (4). W procesie indukowania do powstania czerniaka złośliwego oka biorą udział przede wszystkim onkogeny. W 6-25% przypadków są to geny wrodzonej predyspozycji do zachorowania na czerniaka. Dziesięć procent tych onkogenów zlokalizowanych jest na chromosomach: 3., 9., 11. i 18. Najczęstszym odchyleniem, wykrywanym w początkowym stadium rozwoju czerniaka, są zmiany na ramieniu krótkim chromosomu 9. (12). Jest to zjawisko typowe zwłaszcza dla czerniaka skóry. Uważa się, że transformacja nowotworowa, przez którą należy rozumieć utratę kontroli nad cyklem komórkowym, zależy od delecji lub amplifikacji w materiale genetycznym, a także od mutacji punktowych, zwłaszcza w obrębie egzonów, co w efekcie prowadzi do utraty heterozygotyczności – LOH (*loss of heterozygosity*) lub nawet do monosomii, czyli utraty całego chromosomu, np. 3. lub 10. (7). Mechanizmem, leżącym u podłoża utraty heterozygotyczności, jest defekt w replikacji lub w naprawie komórkowego DNA. Utrata heterozygotyczności, występująca w czerniaku złośliwym, wiąże się z utratą funkcji genów, niezbędnych do właściwego funkcjonowania komórki. Do tej pory udowodniono występowanie LOH w przypadkach wielu nowotworów, między innymi jelita grubego, żołądka, endometrium, trzustki, szyjki macicy oraz skóry i gałki ocznej (7,4). Badania nad podłożem molekularnym powstawania czerniaka oraz badania cytogenetyczne wykazały charakterystyczne zmiany u chorych z czerniakiem, zlokalizowane na chromosomach 1p, 6q, 9p, 10, 11p, 17p, 5q i 18q. Najlepiej poznany jest gen CDKN, odpowiedzialny za kodowanie białek p16 (CDKN-21), p15

(CDKN-2B) i p21. Ten ostatni rodzaj genu zlokalizowany jest na chromosomie 9p21 (9,13). Jego mutacja występuje w 65% przypadków czerniaka skóry i w około 20% przypadków czerniaka gałki ocznej.

Zasadniczą rolę w regulacji poziomu kinaz cyklozależnych (CDK), niezbędnych do prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego, odgrywają białka hamujące ich funkcje, należące do grupy p16 (białko INK 4a – inhibitor kinazy cyklozależnej CDKN 2A), oraz grupy białek: CIP i KIP (3,14). W procesie transformacji nowotworowej te białkowe inhibitory zostają uszkodzone, podobnie jak struktury, zależne od ich aktywności. Tak więc na skutek zmian kodowania kinaz cyklozależnych CDKN 2A lub kinaz regulatorowych (enzymów fosforylujących), będących następstwem nasilonej metylacji wiązania pentozowego par zasad cytozyna-guanina (CpG) i represji translacji w regionie 5' chromosomu 9p21, w blisko $\frac{1}{3}$ przypadków czerniaka stwierdza się obniżenie ekspresji białka p16. Białko to, pobudzone przez enzymy CDK 4 i CDK 6, blokuje przejście komórki z fazy G_1 do fazy S. Większość linii komórkowych czerniaka zawiera inaktywowane białko p16. Stwierdzono bezspornie, że zmniejszona zawartość tego białka przyczynia się do gorszego rokowania co do życia chorych oraz zwiększa skłonność do tworzenia przerzutów.

W sąsiedztwie genu p16 (INK 4a), kodującego białko p16 INK 4a na chromosomie 9p, znajduje się również *locus* genu dla białka p14 ARF (alternative reading frame). Ramki odczytu tych obu genów alternatywnie nakładają się na siebie, sugerując podobieństwo między nimi czy wręcz zależność. Ze względu na częstą delecję tego regionu podejrzewa się, że białko p14 ARF, podobnie jak białko p16, może równorzędnie pełnić funkcję supresora nowotworowego, a jego brak może być jedną z bezpośrednich przyczyn rozwoju raka. Uważa się, że w patogenezie czerniaka mogą odgrywać rolę także trzy inne geny, będące homologami białka p16: p15 INK 4b, p18 INK 4c oraz p19 INK 4d. Znaczenie tych genów jest jednak gorzej zidentyfikowane. Jak już stwierdzono powyżej, białko p16 pośredniczy w hamowaniu cyklu komórkowego, indukowanego w procesie nowotworowym, m. in. przez czynnik TGF- β (tumor growth factor). Wykryto, że w komórkach czerniaka, opornych na hamowanie TGF- β , występuje delecja w chromosomie 9p21, czyli gen ten wykazuje bezpośredni związek z hamowaniem procesu tworzenia białka p16 przez czynnik TGF- β . Rola pozostałych genów, odpowiedzialnych za prawidłowe powstawanie białek p18 i p19, nie została jeszcze dokładnie określona (6).

Inne badania, przeprowadzone w 1998 roku przez Sannatha i wsp. (9,5), wykazały, że najczęściej spotykaną mutacją w przebiegu czerniaka błony naczyniowej oka jest utrata całego chromosomu bądź całego ramienia chromosomu 3., obserwowana aż w 50% przypadków. Patologia ta często, bo w blisko połowie przypadków, współistnieje ze zwiększoną liczbą kopii chromosomu 8. Drugą co do częstości mutacją, według tych samych autorów, jest mikrodelecja na długim ramieniu chromosomu 6., dokonująca się w różnych *loci* tego chromosomu (65% przypadków), oraz chromosomu 13., a dopiero w dalszej kolejności LOH chromosomu 9., zachodząca w 46-62% wszystkich przypadków czerniaka skóry. Wyniki tych badań mogą sugerować obecność innego genu, odpowiedzialnego za powstawanie czerniaka, niż CDKN na chromosomie 9p21. Te wartości procentowe mogą wskazywać, że geny, odpowiedzialne za powstawanie czerniaka oka, znajdują się w innych *loci* niż geny odpowiedzialne za rozwój czerniaka skóry.

Podobne wnioski wynikają z doniesień Scholesa i wsp. z Royal Liverpool University Hospital w Wielkiej Brytanii (11). Autorzy ci wykry-

wali monosomię chromosomu 3. jako najczęstszą patologię w porównaniu ze zmianami innych chromosomów, bo pojawiała się ona aż w 53% badanych przez nich guzów oka, oraz udowodnili związek jej występowania z tworzeniem się komórek nabłonkopodobnych (epithelioid cells) oraz pętli włośniczkowych (microvascular loops). Zjawisko to wykazuje bezpośrednie przełożenie na jakość rokowania co do czasu przeżycia chorych i tworzenia się u nich przerzutów. Panuje bowiem powszechne i dość trwale zakorzenione przekonanie, że rozsiew czerniaka, wywodzącego się z gałki ocznej, dokonuje się drogą krwi, nie zaś chłonki, jak w przypadku większości nowotworów inwazyjnych. Nie ustalono jednak do tej pory, czy współistnienie pętli włośniczkowych oraz monosomii chromosomu 3. jest jedynie przypadkowe, czy też pętle te powstają w wyniku mutacji lub delecji genów, znajdujących się na tym chromosomie.

Według jeszcze innych autorów, Metzelaara-Bloka i wsp. z Leiden University Medical Center w Holandii (10), do utraty heterozygotyczności na ramieniu krótkim chromosomu 6. dochodzi ogółem w 65% przebadanych guzów, w tym w 55% w *locus* D6S105, w 40% w *locus* D6STNFa oraz w 35% w *locus* D6S291. Przypuszcza się, że nieprawidłowości struktury chromosomu 6. mogą mieć pewne działanie ochronne w przypadkach czerniaka, czyli paradoksalnie powodują złagodzenie procesu, nawet jeśli współistnieje monosomia chromosomu 3. oraz zwiększona jest liczba kopii chromosomu 8. Pacjenci z aberracją na chromosomie 6. często wykazują upośledzoną prezentację antygenów powierzchniowych klasy HLA-A i HLA-B. Od nasilenia ich ekspresji uzależnione jest rozprzestrzenianie się nowotworu, a tym samym zwiększona jest śmiertelność z powodu przerzutów. Związek ten jednak nie okazał się znamieny statystycznie.

Ciekawe są doniesienia, dotyczące chromosomu 13., które potwierdzają znaczenie genu *retinoblastoma* RB1 w patogenezie czerniaka złośliwego (11). RB1 jest genem supresji nowotworowej siatkówczaka, najczęstszego nowotworu złośliwego gałki ocznej u dzieci. Gen ten ulega mutacji w wielu typach guzów, jednak w czerniakach występuje w niezmięnionej postaci. Podczas transformacji nowotworowej często dochodzi do zjawiska hiperfosforylacji wspomnianych wyżej kinaz: CDK 4 oraz CDK 2, w następstwie czego produkt genu *retinoblastoma* RB1 – białko pRb – zostaje unieczynniony. Fosforylacja białka pRb zrywa połączenie pomiędzy tym białkiem a czynnikiem transkrypcyjnym E2F, który po uwolnieniu może aktywować transkrypcję genów, a tym samym powodować zakończenie cyklu komórkowego. Białka *retinoblastoma*: RBP 1 i RBP 2 także podlegają regulacji przez inhibitory kinaz cyklozależnych CDK i tym samym mogą być supresorami guza nowotworowego.

Podsumowując: wydaje się, że cykliny i kinazy cyklozależne CDK, regulujące aktywność białka pRb, pełnią funkcję protoonkogenów melanotycznych, ponieważ transformacja nowotworowa ma ścisły związek ze wzrostem aktywności kinaz cyklozależnych, często na skutek utraty własnych inhibitorów. Inaczej mówiąc, białka pRb są ciągle inaktywowane przez te inhibitory, co powoduje wymknięcie się cyklu komórkowego spod kontroli.

Scholes i wsp. w swoich badaniach wykazali obecność LOH na chromosomie 13q14.2, gdzie znajduje się *locus* genu RB1, w 21% badanych przypadków. Może to oznaczać, że powstanie nowotworu jest m. in. zależne od mutacji w obrębie tego genu lub genów sąsiadujących, takich jak np. gen BRCA2, który jest odpowiedzialny za powstawanie nowotworu piersi. W tym kontekście interesująca jest obserwacja, że zachorowanie na czerniaka gałki ocznej występuje statystycznie częściej w rodzinach z wywiadem nowotworu piersi, zależnie od

genu BRCA2 (11). Konkludując, można by stwierdzić, że są po prostu osoby, obciążone wyraźnie większą predyspozycją nowotworową od innych, a czerniak oka nie stanowi tu wyjątku.

W badaniach, dotyczących czerniaka skóry, wykazano nieprawidłowości funkcji supresora guza nowotworowego, którym jest białko p21 (6). Rola tego białka w powstawaniu czerniaka błony naczyniowej oka nie została jeszcze dokładnie poznana. Białko p21 jest negatywnym regulatorem cyklu komórkowego, co oznacza, że ma hamujący wpływ na kinazę CDK. Bierze ono także udział w procesach różnicowania, starzenia się oraz apoptozy komórek i tkanek. Toteż w komórkach z homozygotyczną delecją białka p21 nie następuje zatrzymanie cyklu komórkowego. Zbliżoną rolę w regulacji cyklu komórki pełnią białka p27 i p57. Ich zawartość w guzach inwazyjnych ocenia się na 70% przypadków, podczas gdy w guzach wczesnych, czyli przedinwazyjnych, oba białka występują tylko w blisko 20% przypadków. Zaburzenie funkcjonowania tych inhibitorów białkowych wiąże się prawdopodobnie ze zwiększoną metylacją chromatyny jądrowej, co prowadzi do jej unieczynnienia.

W diagnostyce czerniaka obiecujące wydają się również dane na temat tzw. czynnika transkrypcji mikroftalmii, czyli MiTF (microphthalmia transcription factor). Czynniki te reguluje geny, odpowiedzialne za uwalnianie enzymów melanogenezy. Oznaczenie poziomu tego czynnika mogłoby być pomocne w diagnostyce, dotyczącej powstawania przerzutów.

Bardzo ważnym i dość dobrze poznany markerem czerniaka jest białko p53 o udokumentowanej roli w patogenezie nowotworów złośliwych. Białko p53 blokuje czynniki transkrypcji: EF2-4 i EF2-5. W połączeniu z tymi czynnikami wywiera wpływ na przeprogramowanie sygnałów regulacji cyklu komórkowego i apoptozy.

Protoonkogeny, biorące udział w rozwoju czerniaka skóry oraz oka, to N-ras oraz c-myc. Stwierdzono, że ekspresja protoonkogenu N-ras w komórkach czerniaka złośliwego skóry zwiększa proliferację komórek, zmniejsza ich przyleganie, ogranicza działanie czynnika TGF- β , zwiększa migrację i przyspiesza wzrost komórek nowotworowych (10). Protoonkogen c-myc jest natomiast głównym regulatorem różnicowania komórek oraz procesu apoptozy. W czerniaku występuje zwiększona liczba kopii protoonkogenu c-myc. Te kopie mogą łączyć się z różnymi białkami, np. z białkiem p107, białkiem α -tubuliny, białkami adaptorowymi Bin1, mm1, Pam, TRRAP i AM4-1 oraz czynnikami translacji, takimi, jak: BCRA-1, AP-2, YY-1, TFII-1 oraz Miz-1. Takie powielone protoonkogeny, po połączeniu z białkami, uzyskują zdolność koordynacji procesów transkrypcji, skutkującej utrzymaniem ciągłości cyklu komórkowego, a także mogą hamować apoptozę. Podczas onkogenezy amplifikacja protoonkogenu c-myc jest zjawiskiem dość częstym, jednak jej prawdziwa rola w transformacji nowotworowej pozostaje niewyjaśniona (6).

Dokładne zdefiniowanie podłoża genetycznego czerniaka błony naczyniowej oka mogłoby rozwiązać wiele problemów, zarówno diagnostycznych, jak też – a może przede wszystkim – terapeutycznych oraz prognostycznych. Manipulacje genowe jako metoda leczenia budzą ostatnio coraz więcej emocji, ale i uzasadnionych, realnych nadziei. Złamanie szyfru genowego czerniaka błony naczyniowej oka stanowić będzie niewątpliwie przełom w terapii tej strasznej i nieuleczalnej, jak dotąd, choroby.

PIŚMIENNICTWO:

- Diener-West M., Hawkins B. S., Markowitz J. A., Schachat A. P.: *A Review of Mortality from Chorioidal Melanoma II. A Meta – Analysis of 5 year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988.* Arch. Ophthalmol., 1992, 110, 245-250.
- Egan K. M., Seddon J. M., Glynn R., Gragoudas E. S., Albert D. M.: *Epidemiologic aspects of uveal melanoma.* Surv. Ophthalmol., 1988, 32, 239-251.
- Gomez L. E., Liegeois N. J., Zhang P.: *Cyclin D-and E-dependent kinases and the p57 (KIP-2) inhibitor: cooperative interactions in vivo.* Moll. Cell. Biol., 1999, 19, 353-363.
- Metzelaar-Blok J. A. W., Jager M. J., Moghaddam P. H., van der Silk A. R., Giphart M. J.: *Frequent loss of heterozygosity on chromosome 6p in uveal melanoma.* Hum. Immunol., 1999, 60, 962-969.
- Naus N. C., Verhoeven A. C., van Drunen E., Slater R., Mooy C. M., Pariadaens D. A., Luyten G. P., de Klein A.: *Detection of genetic prognostic markers in uveal melanoma biopsies using fluorescence in situ hybridization.* Clin. Cancer Res., 2002, 8, 534-539.
- Palmieri G., Cossu A., Ascierto P. A., Botti G., Strazzullo M., Lissia A., Colombino M., Casula M., Tanda F., Pirastu M., Castello G.: *Definition of the role of chromosome 9p21 in sporadic melanoma through genetic analysis of primary tumors and their metastases.* Br. J. Cancer, 2000, 83, 1707-1714.
- Peris K., Keller G., Chimenti S., Amantea A., Kerl H., Hoffer H.: *Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma.* J. Invest. Dermatol., 1995, 105, 625-628.
- Rajpal S., Moore R., Karakousis C. P.: *Survival in metastatic ocular melanoma.* Cancer, 1983, 52, 334-336.
- Shannath L., Sidransky M. D.: *Analysis of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) alterations in primary sporadic uveal melanoma.* IOVS, 1999, 40, 779-783.
- Schlomit H., Gilcherst B. A.: *Aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów genetycznych w patogenezie czerniaka.* Curr. Opin. Oncol., 2001, 13, 129-136.
- Scholes A. G. M., Liloglou T., Maloney P., Hagan S., Nunn J., Hiscott P., Damato B. E., Grieson I., Field J. K.: *Loss of Heterozygosity on Chromosomes 3, 9, 13, and 17, Including the Retinoblastoma Locus, in Uveal Melanoma.* IOVS, 2001, 11, 2472-2477.
- Smeds J., Kumar R., Rozell B. L., Hemminki K.: *Increased frequency of LOH on chromosome 9 in sporadic primary melanomas is associated with increased patient age at diagnosis.* Mutagenesis, 2000, 15, 257-260.
- Talwalkar V. R., Schneier M., Hedges L. K., Butler M. G., Schwartz H. S.: *Microsatellite instability in malignant melanoma.* Cancer Genet. Cytogenet., 1998, 104, 111-114.
- Zhang P., Wong C., Liu D., Finegold M., Harper J. W., Elledge S. J.: *p21 (CIP-1) and p57 (KIP-2) control muscle differentiation at the myogenin step.* Genes. Dev., 1999, 13, 213-224.

Praca wpłynęła do Redakcji 3.12.2003 r. (351).

Zakwalifikowano do druku 27.12.2004 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr n. med. Ewa Proniewska-Skrętek
Klinika Okulistyki Akademii Medycznej w Białymstoku
15-276 Białystok
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24 a