

**Mgr Anna Przybyła**

Rozprawa doktorska

**„Analiza wariantów sekwencyjnych w odcinku 3’UTR  
genu CDKN2A u chorych na czerniaka”.**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Andrzej Mackiewicz

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę  
w latach 2009-2011 jako projekt badawczy

N N401 063637

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu  
Katedra Biotechnologii Medycznej  
Zakład Immunologii Nowotworów

**Poznań, 2010**



*Bardzo dziękuję mojemu promotorowi  
Panu Prof. dr hab.med. Andrzejowi Mackiewiczowi  
za naukową opiekę i cenne wskazówki  
w trakcie pisania pracy doktorskiej.*

*Składam serdeczne podziękowania  
Pani dr Katarzynie Lamperskiej  
za cierpliwość i życzliwość,  
oraz pomoc przy wykonywaniu i pisaniu pracy.*

*Bardzo dziękuję wszystkim Koleżankom i Kolegom  
z Zakładu Immunologii Nowotworów  
i Katedry Biotechnologii Medycznej  
za wszechstronną pomoc, wsparcie  
oraz wyjątkową atmosferę w pracy.*

## Spis treści

SKRÓTY:.....	7
1. WSTĘP .....	10
1.1. Czerniak .....	10
1.1.1. Epidemiologia czerniaka.....	11
1.1.2. Etiologia czerniaka.....	11
1.1.2.1. Czynniki środowiskowe .....	11
1.1.2.2. Predyspozycje dziedziczne.....	12
1.1.2.3. Predyspozycje genetyczne .....	13
1.1.3. Diagnostyka i czynniki prognostyczne .....	13
1.1.4. Leczenie czerniaka .....	14
1.1.4.1. Leczenie czerniaka we wczesnych fazach rozwoju.....	15
1.1.4.2. Leczenie czerniaka zaawansowanego. ....	15
1.2. Podłoże genetyczne czerniaka.....	17
1.2.1. CDKN2A.....	17
1.2.2. ARF .....	19
1.2.3. CDK4.....	20
1.2.4. MC1R .....	20
1.2.5. BRAF, NRAS, PTEN .....	21
1.2.6. Sekwencje niekodujące w patogenezie czerniaka .....	23
1.2.6.1. Mutacje w obrębie promotorów .....	23
1.2.6.2. Enhancery – sekwencje wzmacniające transkrypcję.....	24
1.2.6.3. Rejony nieulegające translacji (untranslated regions- UTR). ....	24
2. CEL PRACY .....	29
3. MATERIAŁY I METODY .....	30
3.1. Analiza zmian sekwencyjnych w genie <i>CDKN2A</i> .....	30
3.1.1. Grupa badana.....	30

## Spis treści

---

3.1.2. Izolacja DNA.....	30
3.1.3. Analiza PCR-SSCP .....	30
3.1.3.1. Przygotowanie starterów do reakcji PCR.....	31
3.1.3.2. PCR .....	33
3.1.3.3. Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym .....	33
3.1.4. Analiza sekwencji wykrytych zmian w genie <i>CDKN2A</i> . .....	34
3.1.4.1. Przygotowanie matryc do sekwencjonowania.....	34
3.1.4.2. Reakcja sekwencjonowania.....	35
3.1.5. Metody analiz statystycznych.....	36
3.2. Analiza funkcjonalna zmian sekwencyjnych w 3'UTR genu <i>CDKN2A</i> .....	36
3.2.1. Izolacja RNA .....	36
3.2.2. Odwrotna transkrypcja .....	37
3.2.3. Reakcja PCR.....	37
3.2.4. Ligacja insertu 3'UTR do wektora pCR-Blunt-TOPO.....	38
3.2.5. Transformacja bakterii.....	39
3.2.6. Izolacja plazmidowego DNA w skali mini (3 ml hodowli).....	39
3.2.7. Analiza restrykcyjna .....	40
3.2.8. Klonowanie do wektora phRL-CMV .....	40
3.2.8.1. Przygotowanie wektora phRL-CMV.....	41
3.2.8.2. Ligacja insertu 3'UTR do wektora phRL-CMV.....	41
3.2.8.3. Transformacja bakterii .....	42
3.2.8.4. Izolacja plazmidowego DNA w skali mini (3 ml hodowli).....	42
3.2.8.5. Analiza restrykcyjna klonów .....	42
3.2.9. Izolacja plazmidowego DNA w skali maxi (100 ml hodowli) .....	43
3.2.10. Analiza ekspresji wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR .....	43
3.2.10.1. Hodowle komórkowe .....	43
3.2.10.2. Transfekcja komórek.....	44
3.2.10.3. Pomiar aktywności lucyferazy .....	44
3.2.10.4. Analiza statystyczna.....	45

## Spis treści

---

4. WYNIKI .....	46
4.1. Analiza zmian sekwencyjnych w genie <i>CDKN2A</i> .....	46
4.1.1. Analiza danych klinicznych .....	46
4.1.2. Analiza genu <i>CDKN2A</i> metodą PCR-SSCP .....	49
4.1.3. Korelacja wykrytych zmian genetycznych z parametrami klinicznymi.....	51
4.2. Analiza funkcjonalna .....	52
4.2.1. Konstrukcja wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR genu <i>CDKN2A</i> .....	52
4.2.1.1. Przygotowanie wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR .....	52
4.2.1.2. Przygotowanie wektora transferowego pCR-Blunt-TOPO- 3'UTR .....	54
4.2.2. Przygotowanie wariantów sekwencyjnych konstruktów phRL-CMV-3'UTR .....	55
4.2.3. Analiza ekspresji wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR genu <i>CDKN2A</i> .....	58
5. DYSKUSJA .....	62
6. WNIOSKI .....	70
7. STRESZCZENIE .....	71
8. SUMMARY .....	73
9. LITERATURA.....	75

## SKRÓTY:

**ARE** (AU-rich elements) – sekwencje bogate w adeninę i uracyl

**ARF** (alternative reading frame) – alternatywna ramka odczytu

**BRAF** (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) – protoonkogenna kinaza serynowo-treoninowa

**BRCA1** (breast cancer-1) – ludzki gen supresorowy leżący na chromosomie 17

**BRCA2** (breast cancer-2) – ludzki gen supresorowy leżący na chromosomie 13

**CDK4** (cyclin-dependent kinase 4) – cyklino-zależna kinaza 4

**CDK6** (cyclin-dependent kinase 6) – cyklino-zależna kinaza 6

**CDKN2A** (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) – gen supresorowy, inhibitor kinazy cyklino-zależnej, leżący na chromosomie 9

**cDNA** (complementary DNA) – komplementarny DNA

**CMM** (cutaneous malignant melanoma) – czerniak złośliwy

**CMV** (cytomegalovirus) – wirus cytomegalii

**CTLA-4** (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) – antygen 4 związany z cytotoksycznymi limfocytami T

**ddNTP** (dideoxynucleotide tri-phosphate) – dwudeoksynukleotydy trójfosforanu

**DFS** (disease-free survival) – czas wolny od choroby

**DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) – modyfikowana pożywka hodowlana Eagla

**DMSO** (dimethyl sulfoxide) - dwumetylosulfotlenek

**DNA** (deoxyribonucleic acid) – kwas deoksyrybonukleinowy

**DNS** (dysplastic nevus syndrome) – zespół znamion dysplastycznych

**DTT** - ditiotretitol

***E. coli*** (*Escherichia coli*) – pałeczka okrężnicy

**EGF** (epidermal growth factor) – naskórkowy czynnik wzrostu

**FAMMM** (familial atypical multiple mole-melanoma syndrome) – rodzinny zespół znamion dysplastycznych związanych z czerniakiem

**FAMMM-PC** (familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrom) – rodzinny zespół znamion dysplastycznych związanych z czerniakiem, z dodatkowo występującym rakiem trzustki

- FBS** (foetal bovine serum) – płodowa surowica bydlęca
- Flk-1** (receptor tyrosine kinase) – receptor dla kinazy tyrozynowej
- FMM** (familial melanoma malignum) – czerniak rodzinny
- HSK MEC.1** (human skin microvascular endothelial cells) – ludzkie komórki endotelialne skóry
- LB** (Luria-Broth medium) – pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii
- m7G cap** – struktura na 5'końcu mRNA zwana czapeczką, guanozyna metylowana w pozycji 7.
- MC1R** (melanocortin-1 receptor) – receptor dla melanokortyny typu pierwszego
- mda-7** (melanoma differentiation-associated gene-7) – czynnik odpowiedzialny za różnicowanie melanocytów
- MeWo** - ustalona linia komórkowa ludzkiego czerniaka
- Mich2** – ustalona linia komórkowa ludzkiego czerniaka
- MPM** (multiple primery melanomas) – mnogie pierwotne ogniska czerniaka
- mRNA** (messenger RNA) – informacyjny RNA
- NRAS** (neuroblastoma ras viral oncogene homolog) – onkogen (neuroblastoma RAS)
- OS** (overall survival) – całkowity czas przeżycia
- PBS** (phosphate-buffered saline) – fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami
- PCR** (polymerase chain reaction) – łańcuchowa reakcja polimerazy
- PTEN** (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) – ludzkie białko supresorowe, fosfataza kinazy PI3K, indukujące apoptozę
- pz**– pary zasad
- RNA** (ribonucleic acid) – kwas rybonukleinowy
- RNase H** – endonukleaza, degradowuje nić RNA w hybrydach typu RNA-DNA
- RT-PCR** (reverse transcription polymerase chain reaction) – reakcja odwrotnej transkrypcji
- S.O.C.** (Super Optimal Catabolite repression) – kompletna, bogata pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii
- SSCP** (single strand conformation polymorphism) – polimorfizm konformacji pojedynczych nici
- 3'UTR** (3' untranslated region) – region nieulegający translacji 3'
- 5'UTR** (5' untranslated region) – region nieulegający translacji 5'



## Skróty

---

**VEGF** (vascular endothelial growth factor) – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

**WM 35** – ustalona linia komórkowa ludzkiego czerniaka

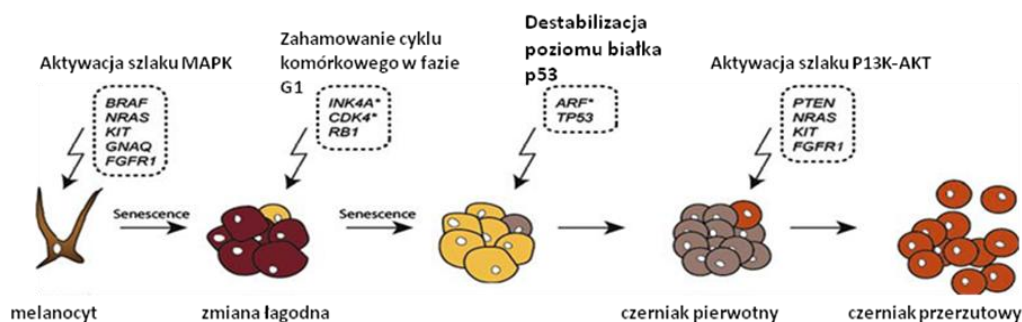
**WM 902B** - ustalona linia komórkowa ludzkiego czerniaka

# 1. WSTĘP

## 1.1. Czerniak

Czerniak (łac. *melanoma malignum*) jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z melanocytów, komórek barwnikowych skóry wytwarzających melanicę. Może występować w obrębie skóry, naczyniówki oka, błon śluzowych oraz w oponach mózgowych (Chin i wsp., 2006; Szczeklik A. 2005). Charakteryzuje się dużą złośliwością z powodu szybkiego wzrostu, wczesnych i licznych przerzutów oraz niewielkiej podatności na leczenie. W związku z powyższym, w wielu krajach położono duży nacisk na szeroko pojętą profilaktykę, badania przesiewowe i rozwój metod diagnostycznych. Jednak w dalszym ciągu, pozostając na czołowym miejscu pod względem agresywności, czerniak stanowi poważne wyzwanie dla lekarzy i badaczy wielu specjalności.

Na przestrzeni wielu lat udało się zidentyfikować szereg czynników ryzyka rozwoju czerniaka, jednak nadal daleko jest do pełnego zrozumienia etiologii na poziomie molekularnym. Na poziomie zmian klinicznych obowiązuje nadal model zaproponowany przez Clarka i wsp. (Clark i wsp., 1969), który zakłada stopniowe przekształcenie się melanocytów w komórki dysplastyczne, a następnie w komórki atypowe o pełnym fenotypie złośliwym. Znamię nabyte zwykle lub znamię wrodzone zmienia się w znamię dysplastyczne, które jako czerniak pierwotny wchodzi w fazę wzrostu powierzchniowego (radialnego), następnie penetruje głębsze warstwy tkanki (wzrost wertykalny), aż w końcu tworzy formę przerzutową (Pawlak W.Z. i wsp. 2003).



Rys.1. Rozwój czerniaka z komórki melanocyta (Damm Meyle K. i wsp. 2009 - zmienione)

### **1.1.1. Epidemiologia czerniaka**

Od kilkunastu lat obserwuje się istotny wzrost zachorowalności na czerniaka złośliwego zarówno wśród kobiet jak i mężczyzn (Lens MB. i wsp. 2004). Pomiedzy poszczególnymi rejonami świata notuje się duże różnice w odniesieniu do samej zachorowalności jak i dynamiki jej wzrostu. Najwyższy współczynnik stwierdzono w Australii i Nowej Zelandii – od 40 do 60 zachorowań rocznie na 100 tys. mieszkańców, w USA natomiast wynosi on 10-20 zachorowań na 100 tys. mieszkańców. W krajach europejskich najczęściej zachorowań notuje się w Skandynawii (15 na 100 tys. przypadków rocznie), a najmniej w krajach śródziemnomorskich - ok. 5-7 zachorowań na 100 tys. mieszkańców w ciągu roku (Garbe C., Blum A., 2001). W Polsce, podobnie jak w innych częściach świata, pod koniec XX wieku obserwuje się wzrost zachorowalności na czerniaka. Wynosił on dla mężczyzn 2,6% rocznie, a dla kobiet 4,4% (Didkowska J. i wsp. 2002). W 2008 roku odnotowano 2286 zachorowań na czerniaka (1052 mężczyzn i 1234 kobiet), co stanowiło 1,6% wszystkich nowotworów złośliwych wśród mężczyzn i 1,9% wśród kobiet. Zmarły 1162 osoby: 607 mężczyzn i 555 kobiet. Zachorowalność na czerniaka skóry w regionie Wielkopolski wynosiła w 2008 roku 6.3/100 tys. u mężczyzn i 5.6/100 tys. u kobiet (Krajowa Baza Danych Nowotworowych, 2008).

### **1.1.2. Etiologia czerniaka**

Etiopatologia czerniaka, podobnie jak innych nowotworów, jest wypadkową działania czynników środowiskowych oraz predyspozycji genetycznych (Jhappan Ch., i wsp. 2003). Ta korelacja częściowo tłumaczy różny odsetek chorych z rodzinną historią czerniaka w różnych populacjach. Z drugiej strony różny procent zachorowań można tłumaczyć narażeniem na różne czynniki środowiskowe, bądź ich zmienne natężenie.

#### *1.1.2.1. Czynniki środowiskowe*

Głównym środowiskowym czynnikiem etiologicznym jest ekspozycja na promieniowanie UV, a zwłaszcza promieniowanie ultrafioletowe UVB o długości fali 280-320 nm (Elwood J.M. i wsp. 1997; Jhappan Ch., i wsp. 2003). Absorbacja fotonów

UVB, głównie przez komórki naskórka, prowadzi do powstania cyklobutanowych dimerów pirymidynowych lub 6,4-fotoproduktów, których obecność w DNA aktywuje system naprawy uszkodzonego DNA. Powstają charakterystyczne dla UV mutacje: tranzycje C→T lub CC→TT i rzadziej C→A oraz G→T (Cleaver J.E. i wsp. 2002). Jeśli uszkodzenia nie zostaną naprawione, dochodzi do nagromadzenia trwałych zmian w genomie melanocytów i w konsekwencji nabycia przez komórki fenotypu złośliwego tzn.: (i) utraty kontroli wzrostu, (ii) zdolności do indukcji angiogenezy, (iii) oporności na apoptozę, (iv) zdolności do nieograniczonego namnażania, (v) zdolności do inwazji tkanek sąsiednich i tworzenia przerzutów (Campisi J. 2003, Satyamoorthy K. 2002, Gruber F. 2008).

Inne czynniki środowiskowe – chemiczne i biologiczne, zdają się być pomijane przy określaniu ryzyka zachorowania na czerniaka. Zaobserwowano częstsze występowanie tego nowotworu wśród pracowników narażonych na działanie chlorku winylu oraz pracowników przemysłu naftowego, a także u osób zakażonych niektórymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego (Langård S. i wsp. 2000; Wong O. i wsp. 2000; Miracco C. i wsp. 2001).

### *1.1.2.2. Predyspozycje dziedziczne*

Istotnym czynnikiem ryzyka jest rodzinna historia choroby (Damm Meyle i wsp. 2009; Newton Bishop J.N. i wsp. 2007). Około 10% chorych na czerniaka podaje w wywiadzie zachorowanie na ten typ nowotworu wśród krewnych pierwszego lub drugiego stopnia (Berwick M. i wsp. 2006). Czerniak jest związany z czterema zespołami dziedzicznymi: czerniakiem rodzinnym (FMM OMIM#155600), który charakteryzuje się występowaniem przynajmniej dwóch czerniaków w rodzinie; z zespołem znamion dysplastycznych (DNS lub FAMMM OMIM#155600), w którym czerniak występuje w powiązaniu z obecnością wielu atypowych znamion; czerniakiem rodzinnym z rakiem trzustki (FAMMM-PC OMIM#606719) i czerniakiem z gwiaździakiem lub innym nowotworem centralnego układu nerwowego (MA OMIM#155755). W ostatnich latach zwrócono także uwagę na współistnienie czerniaka z innymi nowotworami, najczęściej z gruczolakiem trzustki (Newton Bishop J.N. i wsp. 2007; Parker J.I. i wsp. 2003) oraz rakiem piersi (Anderson H., i wsp. 2000). Segregację raka piersi z czerniakiem w populacji polskiej opisano w 2005 roku (Dębniak T., i wsp.

2005). Także w Zakładzie Immunologii Nowotworów w Poznaniu przeprowadzono podobne analizy. W badanej grupie 285 pacjentów chorych na czerniaka 59 podawało występowanie nowotworu w rodzinie. W tej grupie najczęściej, bo w 23,7%, współwystępował rak płuc. W 16,9% rodzin występował rak piersi i żołądka. Czerniak występował w 13,5% grupy wykazującej nowotwory w rodzinie, co stanowiło tylko 2,8% wszystkich badanych pacjentów. W rodzinach podających w wywiadzie występowanie raka piersi wykonano również badanie genu BRCA1, jednak mutacji w badanych przypadkach nie stwierdzono (Lamperska K.M. i wsp. 2007). Na związek czerniaka z rakiem piersi może wskazywać fakt, że na 8 chorych na czerniaka i inny nowotwór, aż w 5 przypadkach był to rak piersi. Korelacja pomiędzy rakiem piersi a czerniakiem u tych samych pacjentów została opisana przez Goggins W. i wsp. (Goggins W. i wsp. 2004).

### *1.1.2.3. Predyspozycje genetyczne*

Melanocyty to komórki barwnikowe umiejscowione w warstwie podstawnej naskórka, które wytwarzają melaninę – pigment nadający kolor skórze i włosom. Są to także komórki, z których wywodzą się komórki czerniaka skóry. Aby prawidłowy melanocyt przekształcił się w komórkę nowotworową musi dojść do szeregu zmian (mutacji) w genomie melanocyta i nabycia przez niego fenotypu złośliwego. Odkryto kilka zmian genetycznych, które odgrywają kluczową rolę w molekularnym szlaku kancerogenezy czerniaka. Cechy osobnicze takie jak: jasna karnacja skóry, jasne lub rude włosy, niebieskie oczy, piegi, tendencja do oparzeń słonecznych i znamiona pigmentowe uwarunkowane są genetycznie i uważane są za sprzyjające powstaniu tego nowotworu (Ruka W. 2006; Thompson J.F. i wsp. 2005, Evans R.D. i wsp. 1998).

### **1.1.3. Diagnostyka i czynniki prognostyczne**

Diagnostyka czerniaka skóry polega na klinicznej ocenie wyglądu zmian skórnych na podstawie charakterystycznych objawów sklasyfikowanych w dwóch systemach: ABCD (Hazen i wsp., 1999; Benelli i wsp., 2001) i Glasgow (MacKie i wsp., 1986). W systemie ABCD, A (asymetry) określa asymetrię zmiany, B (border) oznacza brzeg, C (color)- kolor, D (diameter) – średnicę zmiany. Oznaczenie E informuje o wzroście

guzowatym i uszkodzeniu naskórka. W siedmiostopniowym systemie Glasgow 1 stopień oznacza zmianę rozmiaru, 2- zmianę kształtu, 3- zmianę koloru, 4- stan zapalny, 5- sączenie, krwawienie, 6- zmianę czucia, 7- zmianę większą niż 7 mm. Ustalenie dokładnego stopnia zaawansowania klinicznego wymaga oprócz badania klinicznego i histopatologicznego, zastosowania uzupełniających technik obrazowania: USG, jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR), pozytonowej emisyjnej tomografii (PET).

Do najważniejszych czynników prognostycznych czerniaka należą: (i) pomiar głębokości penetracji zmiany pierwotnej (skala Breslow), (ii) obecność owrzodzenia zmiany pierwotnej, (iii) obecność zmian przerzutowych „in transit”, (iv) zajęcie węzłów chłonnych, oraz (v) obecność przerzutów odległych. Czerniaki skóry w radialnej fazie wzrostu można wyleczyć poprzez chirurgiczne usunięcie zmian i postępowanie uzupełniające, natomiast już u chorych z czerniakiem o umiarkowanej grubości (2-4 mm), zazwyczaj pojawiają się wznowy i przerzuty (Chin i wsp., 2006). Wśród innych czynników prognostycznych wymieniane są: wiek zachorowania, lokalizacja zmiany pierwotnej, poziom naciekania i płeć. Młodszy wiek zachorowania uznaje się za czynnik niekorzystny; kobiety mają lepsze rokowania niż mężczyźni. Wykazano gorsze rokowania dla czerniaków zlokalizowanych na tułowie, głowie i szyi niż na kończynach. Istotna jest również liczba zajętych węzłów chłonnych. W grupie chorych z przerzutami do odległych narządów najdłuższe przeżycia obserwowano w przypadkach przerzutów do skóry, tkanki podskórnej i węzłów chłonnych. Źle rokują chorzy z przerzutami do narządów wewnętrznych (Balch C.M., i wsp. 2004). Przerzuty czerniaka mogą pojawić się natychmiast lub nawet po 30 latach (najczęściej 2-5 lat). Około 50% chorych ze zmianami w lokalnych węzłach chłonnych przeżywa 5 lat. Chorzy na czerniaka z odległymi przerzutami rokują bardzo niepomyślnie (średnia przeżycia 6-9 miesięcy) (Balch i wsp., 2001).

### **1.1.4. Leczenie czerniaka**

Głównym problemem związanym z leczeniem czerniaka jest jego inwazyjność, tym samym zdolność tworzenia przerzutów nawet w przypadku tzw. „cienkich” zmian pierwotnych o głębokości naciekania  $<2$  mm wg Breslow. Mediana przeżycia w stadium uogólnienia choroby wynosi 7 miesięcy (Kirkwood J.M. i wsp. 1996).

Dotychczas stosowane metody leczenia ogólnoustrojowego chorych na czerniaka są niezadowolające.

### *1.1.4.1. Leczenie czerniaka we wczesnych fazach rozwoju.*

Standardową metodą leczenia czerniaka jest chirurgiczne usunięcie zmiany pierwotnej z odpowiednim marginesem otaczającej skóry. Zakres zabiegu chirurgicznego zależy od głębokości naciekania skóry wg Breslowa. Od kilkunastu lat stosuje się biopsję węzła wartowniczego (sentinel node biopsy- SNB). Zabieg ten zastąpił profilaktyczne wycinanie węzłów chłonnych (Elective Lymph Node Dissection- ELND) i pozwala na zachowanie niezmiennych węzłów chłonnych u blisko 80% chorych. Metoda SNB cechuje się minimalną inwazyjnością, gdyż obejmuje węzeł wartowniczy, który jest pierwszym w obrębie spływu chłonki z regionu objętego procesem nowotworowym (Kycler W. i wsp. 2006; Scott i wsp., 1993).

### *1.1.4.2. Leczenie czerniaka zaawansowanego.*

W przypadku wznowy miejscowej czy stwierdzenia przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych zasadniczą metodą leczenia jest wycięcie chirurgiczne z ewentualnym zastosowaniem radioterapii pooperacyjnej. Czerniak przez wiele lat uznawany był za nowotwór promieniooporny (Hellriegel W. 1963; Wideł M. 1996). Rozwój radiobiologii i określenie współczynnika wrażliwości tkanek na zmianę wysokości dawki frakcyjnej dla różnych linii komórkowych czerniaka wykazały heterogenność komórek czerniaka z koniecznością indywidualizacji dawki frakcyjnej (Skowronek J. i wsp. 1999). Aktualnie radioterapię stosuje się między innymi: w razie dyskwalifikacji chorego z zabiegu chirurgicznego, przy braku zgody chorego na leczenie operacyjne, w przypadku wznowy miejscowej lub jako wspomaganie radykalnego leczenia chirurgicznego i jako terapię paliatywną (Wideł M. 1996; Skowronek J. i wsp., 1999). W przypadku rozsiewu czerniaka w obrębie kończyny, bez klinicznie uchwytanych objawów rozsiewu ogólnego, można stosować izolowaną perfuzję kończyny w hipertermii. Metoda ta wymaga chirurgicznej otwartej kaniulacji dużych naczyń kończyny i zastosowania krążenia pozaustrojowego. W uproszczonej wersji możliwa jest również izolowana infuzja kończyny. Podaje się wtedy leki

cytotoksyczne w temp. 40-41.5<sup>0</sup>C (Thompson i wsp., 1997; Vrauenrates i wsp., 1996). Obie metody uznaje się za skuteczne i zaleca się ich stosowanie w przypadkach rozsiewu lokalnego w obrębie kończyny, kiedy nie ma możliwości chirurgicznego wycięcia zmian nowotworowych.

Chemioterapia wykazuje niski stopień odpowiedzi klinicznych. Stosuje się ją jako leczenie paliatywne, w celu złagodzenia objawów choroby oraz poprawy jakości życia, a także w ramach kontrolowanych badań klinicznych. Terapia ogólnoustrojowa w zaawansowanym czerniaku opierała się początkowo na lekach alkilujących, przede wszystkim dakarbazynie (DTIC) i karmustynie (BCNU) (Kycler W. i wsp. 2006). Obecnie stosowany jest również temozolamid, który jest aktywnym metabolitem DTIC. Lek ten przenika barierę krew-mózg, przez co stwarza możliwość oddziaływania na zmiany przerzutowe w CSN (O'Day S.J. i wsp. 2001). W przypadku wznowy miejscowej czy przerzutów *in transit* w obrębie kończyny, stosuje się izolowaną perfuzję lub infuzję dotętniczną chemioterapeutyków (Vrouenraets i wsp., 1999). Prowadzone są również badania kliniczne nad skutecznością łączenia hormonów (tamoksyfen) z dakarbazyną oraz leków biologicznych (IFN- $\alpha$ 2, IL-2) z dakarbazyną (Falkson i wsp. 1998; Hoffmann i wsp. 1998). Wstępne doniesienia o skuteczności łączenia bioterapii chemioterapią nie zostały jednak potwierdzone w wielośrodkowych randomizowanych badaniach klinicznych w porównaniu z monoterapią DTIC. W związku z tym nie wprowadzono do standardowego leczenia czerniaka żadnego z powyższych schematów (Kycler W. i wsp. 2006).

Nieprzewidywalny przebieg czerniaka, obserwowane spontaniczne remisje (głównie zmiany pierwotnej) wskazujące na jego immunogenność, stały się przyczyną intensywnego rozwoju badań nad immunologią i immunoterapią czerniaka (Jakóbisiak M. 2003). Immunoterapię czerniaka można w uproszczeniu podzielić na dwa rodzaje: (i) immunoterapię bierną oraz (ii) immunoterapię czynną, a każda może mieć charakter swoisty lub nieswoisty (Mackiewicz J. i wsp. 2010; Galus Ł. [www. hylostet.pl](http://www.hylostet.pl)).

Wielokrotnie podejmowano próby czynnej immunoterapii zaawansowanego czerniaka za pomocą różnych form terapii komórkowej (Wysocki P. i wsp. 2003). Obecnie w trakcie rejestracji są przeciwciała anty-CTLA4 (Ipilimumab), które w terapii drugiego rzutu wydłużyły całkowity czas przeżycia chorych (Hodi F.S. i wsp. 2010). Obserwowany szybki rozwój biotechnologii, a co za tym idzie- wprowadzenie na rynek nowych biofarmaceutyków, daje nadzieję na stworzenie efektywnej terapii czerniaka. Możliwość genetycznej modyfikacji komórek zaangażowanych w procesy



immunologiczne oraz tworzenie rekombinowanych wektorów jako nośników genów terapeutycznych, przyczyniły się w głównej mierze do podejmowania coraz liczniejszych prób immunoterapii lub/i terapii genowej tego nowotworu.

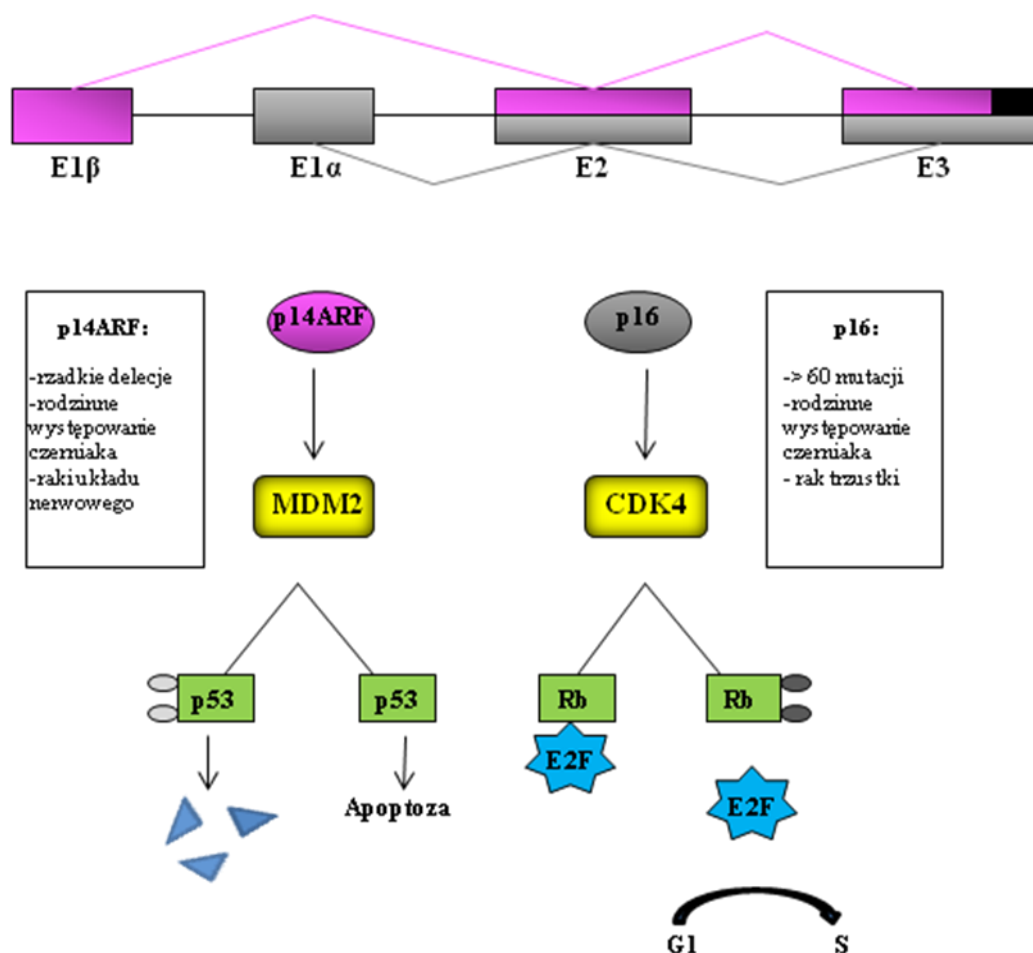
### 1.2. Podłoże genetyczne czerniaka

Genetyka czerniaka od wielu lat jest przedmiotem intensywnych badań. Dotychczas udało się zidentyfikować kilka genów, których mutacje bądź inaktywacje są przyczyną powstania choroby. Z jednej strony są to zmiany w genach supresorowych, biorących udział w regulacji cyklu komórkowego (rodzina białek Rb, cykliny, kinazy zależne od cyklin, inhibitory CDK oraz białko p53), z drugiej – mutacje aktywujące kaskadę przekazywania sygnału pojawiające się w onkogenach *BRAF* i *Ras* (Nelson A.A. i wsp. 2009; Harland M. i wsp. 2001; Kamijo T. i wsp. 1998; Thomas N.E. i wsp. 2006; Demunter A. i wsp. 2001).

#### 1.2.1. CDKN2A

Gen *CDKN2A* (cyklin- dependent kinase inhibitor 2A, zależny od cyklin inhibitor kinazy 2A, OMIM \*600160) jest jednym z pierwszych genów supresorowych intensywnie analizowanych w poprzedniej dekadzie. Zainteresowanie tym genem wiąże się z wysokim odsetkiem mutacji znajdujących w liniach komórkowych, w tym w 90% linii czerniakowych (Gray-Schopfer. V.C. i wsp. 2005). Gen *CDKN2A* znajduje się na chromosomie 9p21 i koduje dwa białka: p16 (zawierające ekson 1 $\alpha$ , 2 i 3) i p14ARF (produkt alternatywnej ramki odczytu zawierający ekson 1 $\beta$ , 2 i 3) (Palmieri G. i wsp. 2009; Stott F.J. i wsp. 1998). Pomimo, że oba białka są produktem jednego genu i wykazują wysoką homologię na poziomie nukleotydowym to różnią się na poziomie aminokwasowym (Harland M. i wsp. 2005) i działają w niezależnych szlakach komórkowych: retinoblastomy Rb i szlaku p53 (Nelson A.A. i wsp. 2009). Białko p16 jest inhibitorem kinaz cyklozależnych (*CDK4* i *CDK6*), które odpowiadają za fosforylację białka Rb. Aktywne (zdefosforylowane) białko Rb wiąże kompleks transkrypcyjny E2F i dezaktywuje go. Kompleks ten jest niezbędny do przejścia komórki z fazy G1 cyklu komórkowego w fazę S. Efektem działania p16 jest więc uniemożliwienie transkrypcji kluczowych genów i zatrzymanie komórek w punkcie G1 (Nelson A.A. i wsp. 2009; Lilischkis R. i wsp. 1996). Białko p14ARF, będąc również supresorem cyklu komórkowego, stabilizuje białko p53 poprzez asocjację z białkiem

MDM2 (Bothner B. i wsp. 2001), ale hamując CDK4 i CDK6 pełni również funkcje podobne do p16 (Pawlak W.Z. i wsp. 2003). Jeden gen nadzoruje zatem dwa punkty kontrolne cyklu komórkowego: G1-S oraz G2-M.



Rys. 2. Struktura genu *CDKN2A* oraz udział transkryptów p16 i p14ARF w regulacji cyklu komórkowego (Damm Meyle K. i wsp. 2009 - zmienione).

Mutacje genów supresorowych stwierdzano głównie w komórkach zarodkowych, dlatego też są one związane z zespołami nowotworów dziedzicznych. Mutacje genu *CDKN2A* są najprawdopodobniej odpowiedzialne za 10-30% przypadków rodzinnego występowania czerniaka na świecie (Gruber F. i wsp. 2008). Zakres częstości wykrywanych zmian wynosi od 5-50% i zależy od badanej populacji (Goldstein A.M. i wsp. 2000). Wskazuje to pośrednio na ścisły związek czynników środowiskowych (promieniowanie UV) z etiologią czerniaka (Palmieri G. i wsp. 2009).

Po przeanalizowaniu wielu historii rodzinnych nosicieli mutacji w genie *CDKN2A* okazało się, że mutacje te predysponują także do zachorowania na raka trzustki (Borg A. i wsp. 2000; Goldstein A.M. i wsp. 1995). Sugerowane jest również zwiększone ryzyko zachorowania na raka piersi, stercza, jelita grubego i płuc (Hayward N.K 2003; Vasen H.F. i wsp. 2000). Mutacje w *CDKN2A* pojawiają się częściej w rodzinach z wieloma (powyżej trzech przypadków) zachorowaniami na czerniaka w historii rodziny (Goldstein A.M. i wsp. 2004), u osób z MPM (*multiple primary melanoma*) (Gruber F. i wsp. 2008) oraz u pacjentów z MPM z rodzinną historią zachorowania na czerniaka i w przypadku więcej niż dwóch ognisk pierwotnego czerniaka (Puig S. i wsp. 2005). Wśród charakterystycznych dla populacji tzw. mutacji założycielskich należy wymienić 19-nukleotydową delecję w eksonie 2 genu, prowadzącą do powstania chimerycznego białka zawierającego N-koniec białka p16 i C-region białka p14ARF. Mutacja ta określana jako *p16-Leiden* została zidentyfikowana w populacji holenderskiej (van der Velden P.A. i wsp. 1999). Innymi mutacjami są: insR113 - szwedzka (Borg A. i wsp. 1996), M53I -szkocka (MacKie R.M. i wsp. 1998), V126D –północnoamerykańska (Goldstein A.M. i wsp. 2001) oraz G101W – liguryjska, zwana też celtycką, odnaleziona w populacji włoskiej (Ciotti P. i wsp. 2000). W populacji polskiej mutacje dziedziczne w *CDKN2A* są niezwykle rzadkie (nie znaleziono dziedzicznej mutacji patogennej), stwierdzono natomiast częstsze występowanie polimorfizmu Ala148Thr w eksonie 2 w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wykazano także jego asocjację z rakiem piersi i czerniakiem (Dębniak T. i wsp. 2005; Lamperska K. i wsp. 2002). Pomimo przypisywania istotnej roli zmianom w genie *CDKN2A*, w dziedzicznej predyspozycji zachorowania na czerniaka znaleziono stosunkowo niewiele mutacji w odcinkach kodujących tego genu. W związku z tym w literaturze dotyczącej czerniaka coraz więcej miejsca poświęca się odcinkom niekodującym, które regulują ekspresję materiału genetycznego.

### 1.2.2. ARF

*P14/ARF* jest alternatywnym wariantem *CDKN2A locus*. Locus genu *CDKN2A* jest unikatowy w ludzkim genomie ponieważ koduje dwa zupełnie różne białka. Ze względu na wspólnie z p16 wykorzystywaną sekwencją eksonów 2 i 3 mutacje w tych miejscach mają wpływ na obydwa białka. Mutacje w specyficznym dla p14 eksonie 1β są natomiast rzadkie i niezależnie predysponują do zachorowania na czerniaka oraz

nowotwory układu nerwowego (Hewitt C. i wsp. 2002; Randerson-Moor J.A. i wsp. 2001).

### 1.2.3. CDK4

Gen *CDK4* znajduje się na chromosomie 12p13.6 i koduje białko- cyklinozależną kinazę 4. Kompleks białka formowany z cyklinami typu D umożliwia fosforylację białka Rb i jest hamowany przez białko p16 (Polsky D. i wsp. 2003). Pomimo wykrywania mutacji w tym genie w liniach komórkowych czerniaka, jedynymi zidentyfikowanymi i potwierdzonymi zmianami dziedzicznymi są Arg24Cys oraz Arg24His (Soufir N. i wsp. 1998; Zuo L. i wsp. 1996). Mutacja Arg24Cys znajduje się w domenie wiążącej p16 uniemożliwiając przyłączenie białka, natomiast zdolność *CDK4* do wiązania z cykliną D1 jest zachowana. Mutacja ma więc charakter dominujący a zmutowany *CDK4* posiada wszystkie cechy onkogenu (Palmieri G. i wsp. 2009). Ze względu na fakt, że jedynie w trzech rodzinach na świecie udokumentowano wystąpienie takich zmian ( u 2 rodzin amerykańskich i 1 francuskiej) (Palmieri G. i wsp. 2009; Piepkorn M. 2000), wydaje się, że *CDK4* nie ma szerszego znaczenia dla genetycznego podłoża czerniaka.

### 1.2.4. MC1R

Czynnikami sprzyjającymi rozwojowi czerniaka są: jasne lub rude włosy, jasna karnacja skóry, niebieskie oczy, piegi, tendencja do oparzeń słonecznych i liczne znamiona barwnikowe (Ruka W. 2006). Jednym z genów o niskiej penetracji jest gen regulujący kolor skóry - receptor *MC1R* (melanocortin-1 receptor) (Kennedy C. i wsp. 2001). Pigmentacja skóry jest uwarunkowana występowaniem w niej melaniny, która występuje w dwóch formach: jako barwnik czarnobrazowy – eumelanina, oraz barwnik żółtopomarańczowy – feomelanina. Fenotyp barwnikowy skóry zależy od proporcji obu form (Jhappan C. i wsp. 2003). Eumelanina ma charakter fotoprotekcyjny, feomelanina natomiast uwrażliwia tkanki na działanie promieni UV i uwalnianych wolnych rodników. Po ekspozycji na światło słoneczne i poprzez bezpośrednie działanie promieniowania na melanocyt, w skórze dochodzi do pobudzenia melanogenezy (Rouzaud F. i wsp. 2005). Produkt białkowy genu *MC1R* wiąże się z hormonem stymulującym melanocyty ( $\alpha$ -MSH;  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone) i wraz z

adrenokortykotropiną (ACTH) pobudza proces produkcji melaniny (Pho L. i wsp. 2006; Rees J.L. 2003). Gen *MC1R* jest wysoce polimorficzny, a do tej pory udało się ustalić ok. 65 jego wariantów sekwencyjnych (Rees J.L. 2004; Flanagan N. i wsp. 2000). Przeprowadzone badania wykazały, że dany wariant genu *MC1R* ma istotny wpływ na fenotyp barwnikowy (Valverde P. i wsp. 1995). Na przykład warianty Arg151Cys, Arg160Trp i Asp249His są odpowiedzialne za występowanie fenotypu określanego jako *red hair color (RHC)* (Nelson A.A. i wsp. 2009; Palmer J.S. i wsp. 2000). Przeprowadzone badania wykazały, że niektóre z wariantów polimorficznych są liczniej reprezentowane u chorych na czerniaka (Valverde P. i wsp. 1996), a badania prowadzone na populacji australijskiej wskazały na zależność pomiędzy fenotypem RHC a zwiększoną zachorowalnością na czerniaka skóry (Palmer J.S. i wsp. 2000). Należy zatem w tym miejscu podkreślić zależność udziału czynnika genetycznego od promieniowania UV.

### 1.2.5. BRAF, NRAS, PTEN

Niezwykłe ciekawe są doniesienia na temat mutacji w genach *BRAF*, *NRAS* i *PTEN* w hodowlach komórek czerniaka. Produkty tych genów należą do wspólnej rodziny białek ras, biorącej udział w przekazywaniu sygnałów mitogennych wewnątrz komórki i wydają się być ściśle ze sobą powiązane (Brudnik U. i wsp. 2006).

Bardzo ważnym dla powstawania czerniaka genem jest *BRAF*. Zlokalizowano go na chromosomie 7q34 i koduje on kinazę serynowo-treoninową (Gruber F. i wsp. 2008; Brose M.S. i wsp. 2002). Somatyczne mutacje w tym genie zostały zidentyfikowane w 60-70% guzów (Platz A. i wsp. 2007). Najczęściej pojawiającą się mutacją jest substytucja Val600Glu, która stanowi aż 90% wszystkich mutacji genu *BRAF* znalezionych w czerniaku (Platz A. i wsp. 2007; Davies H. i wsp. 2002). Mutacje w tym genie znaleziono także w 80% łagodnych znamion barwnikowych (Kumar R. i wsp. 2004; Pollock P. i wsp. 2003), co może sugerować, że pojawienie się mutacji w genie *BRAF* jest krytycznym zdarzeniem w najwcześniejszych etapach transformacji nowotworowej (Greene V.R. i wsp. 2009).

Gen *NRAS* zlokalizowany jest na chromosomie 1p13. Mutacje w tym genie powodują aktywowanie dwóch konserwatywnych szlaków przekazywania sygnału: RAF-MEK-ERK oraz PI3-Akt-NF-KappaB i kilku innych (Bhatt K.V. i wsp. 2005; Czajkowski R. i wsp. 2009). Częstość mutacji w rodzinie genów *RAS* w komórkach

czerniaka została oszacowana na 10-20% przypadków (Dahl C. i wsp. 2007) i najczęściej dotyczy substytucji w jednym z trzech kodonów: 12, 13 i 61 (Goydos J.S. i wsp. 2005) oraz rzadziej w pozycjach 59 i 63 (Omholt K. i wsp. 2003). Mutacje w tych miejscach powodują aktywację *RAS* niezależnie od czynnika stymulującego i najczęściej odnajdywane są w czerniakach z obszarów ciała eksponowanych na słońce (Bennett D.C. 2008). Wykazano, że mutacje w genie *NRAS* występują częściej w rodzinnych niż sporadycznych czerniakach. Mutacje w kodonie 61 genu *NRAS* wykryto w 95% przypadków czerniaka z mutacją terminalną genu *CDKN2A* (Eskandarpour M. i wsp. 2003). Porównywalnie dużą częstość mutacji (80%) w genie *NRAS* odnotowano u osób z wrodzonymi znamionami melanocytowymi (Bauer J. i wsp. 2007). Większość autorów jest zgodna co do tego, że mutacje w *NRAS* i *BRAF* wzajemnie się wykluczają (Davies H. i wsp. 2002), jednakże badanie przeprowadzone przez Goel i wsp. nie potwierdza teorii wzajemnego wykluczania się mutacji w obu genach (Goel V.K. i wsp. 2006).

Od wczesnych lat 90-tych wiadomo, że zmiany w genomie czerniaka są między innymi spowodowane utratą materiału genetycznego w rejonie q23-24 chromosomu 10. W 1997 roku trzy niezależne laboratoria sklonowały gen *PTEN* i wskazały na jego inaktywację w różnych nowotworach (Wu H. i wsp. 2003; Dahl C. i wsp. 2007).

Białko kodowane przez *PTEN* działa jako białko supresorowe regulujące podziały komórkowe, ale także wpływa na rozwój embrionalny, wzrost i różnicowanie komórek macierzystych, migrację i apoptozę, co chroni komórkę przed gwałtownym i niekontrolowanym wzrostem (Penninger J.M. i wsp. 2001; Tamura M. i wsp. 1998). Produkt tego genu pełni dwie ważne biochemiczne funkcje: jest odpowiedzialny za fosforylację lipidów oraz fosforylację białek (Palmieri G. i wsp. 2009). Pierwszą przesłanką do udziału szlaku PI3-Akt w progresji czerniaka było stwierdzenie utraty ekspresji *PTEN* w tym nowotworze (Stahl J.M. i wsp. 2004). Pierwsze badania wykazały, że mutacje w *PTEN* pojawiają się w 30-40% linii komórkowych czerniaka i w ok. 10% czerniaków pierwotnych (de Snoo F.A. i wsp. 2005; Guldborg P. i wsp. 1997). Sugeruje to hipotezę, że aktywacja szlaku PI3-Akt może być istotna w późniejszych etapach rozwoju czerniaka np. tworzenia przerzutów (Damm Meyle K. i wsp. 2009).

### 1.2.6. Sekwencje niekodujące w patogenezie czerniaka

Przez długi czas badania nad genetyką różnych chorób skupiały się wyłącznie na mutacjach w regionach kodujących genów odpowiedzialnych za daną jednostkę chorobową. Jednak ostatnio w literaturze światowej coraz więcej miejsca poświęca się sekwencjom, które nie kodują bezpośrednio sekwencji aminokwasów w białkach, a które pełnią funkcję regulacyjną praktycznie na każdym etapie ekspresji materiału genetycznego. Takie niekodujące sekwencje, znajdujące się na końcach mRNA, zawierają liczne elementy regulatorowe, które w kluczowy sposób wpływają na wydajność translacji. Występująca na 5' końcu wszystkich mRNA struktura nazywana *czapeczką* (m7G cap) zabezpiecza mRNA przed degradacją oraz ułatwia alternatywne składanie, transport do cytoplazmy i translację (Chatterjee S. i wsp. 2009). Inne niekodujące sekwencje, tworząc stabilne kompleksy z białkami w pobliżu 5'-końca mRNA stwarzają przestrzenną przeszkodę blokującą inicjację translacji. Biorąc pod uwagę w jak wielu istotnych etapach potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów biorą udział rejony 5'UTR i 3'UTR oraz ich wpływ na kluczowe procesy dla transformacji nowotworowej (prolifercja, dojrzewanie i różnicowanie komórek), zainteresowano się nimi w kontekście czerniaka i genów związanych z jego patogenezą (Kwinta Ł. 2008).

#### 1.2.6.1. Mutacje w obrębie promotorów

W 2000 roku opublikowano wyniki analizy mutacji w rejonie promotora genu *CDKN2A* wśród członków 107 rodzin z FMM (Harland M. i wsp. 2000). Stwierdzono 3 warianty sekwencji zlokalizowane w obrębie promotora A-191G (zamiana adeniny na guaninę 191 nukleotydów przed startem transkrypcji), A-493T oraz G-735A. Wariant A-191G uznano za polimorfizm o bardzo małym prawdopodobieństwie patogenności. Natomiast zmiana G-735A, mimo, iż występowała w preparatach kontrolnych, może mieć wpływ na ontogenezę czerniaka. Ponadto zaobserwowano, że wariant A-493T jest w nierównowadze sprzężeń z poznanym już wcześniej polimorfizmem Ala148Thr rejonu kodującego genu *CDKN2A*, a ten z kolei związany jest z większym ryzykiem zachorowania na czerniaka (Dębniak T. i wsp. 2005). Inna grupa badawcza zajęła się także analizą rejonu promotorowego genu *CDKN2A* ale 1116 par zasad powyżej kodonu start (Pollock P.M. i wsp. 2001). Oparto się na badaniach sugerujących, że obszar krytyczny pod względem aktywności promotora tego genu sięga 869 par zasad

powyżej sekwencji kodującej (Hara E. i wsp. 1996). Poza zmianami, o których informował Harland i wsp. (Harland M. i wsp. 2000), badaczom udało się zidentyfikować inne takie miejsca: A-252T, G-347C oraz G-981T. Kwestii patogenności zmiany G-981T nie udało się w pełni wyjaśnić, a dwie pozostałe uznano za nieistotne.

### *1.2.6.2. Enhancery – sekwencje wzmacniające transkrypcję*

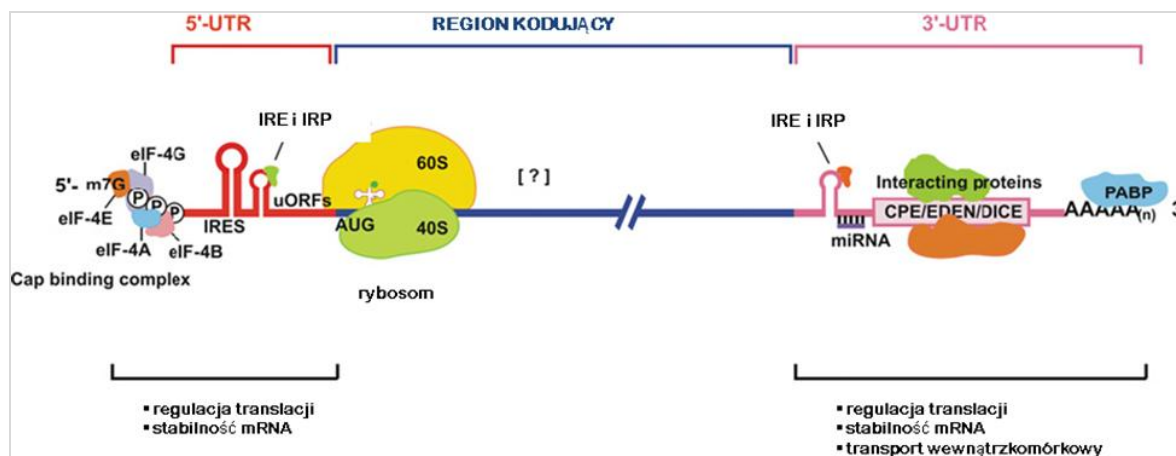
Enhancery to sekwencje wpływające na wzrost podstawowego poziomu transkrypcji genów. Zidentyfikowano enhancery, które poprzez modyfikację ekspresji odpowiednich genów wpływają na procesy związane z różnymi aspektami rozwoju czerniaka, w tym na angiogenezę. Kluczową rolę w rozwoju naczyń zaopatrujących guzy odgrywa VEGF (naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu) i jego receptor – kinaza tyrozynowa Flk-1. Receptor ten ulega ekspresji w czasie rozwoju naczyń i jest wykrywany w śródbłonku naczyń zaopatrujących guzy nowotworowe, w tym guzy czerniaka (Heidenreich R. i wsp. 2000; Plate K. i wsp. 1993). Udowodniono, że dla aktywacji genu Flk-1 bardzo ważny jest fragment obejmujący 939 par zasad powyżej kodonu startu transkrypcji oraz enhancer tego genu. Wykazano też, że są one aktywne *in vivo* w czasie angiogenezy w guzie czerniakowym (w modelu mysim) (Heidenreich R. i wsp. 2000). Znany jest także enhancer odpowiedzialny za nadekspresję jednego z antygenów związanych z czerniakiem – melanotransferyny i jest odpowiedzialny za wzmacnianie jego ekspresji w komórkach czerniaka (Duchange N. i wsp. 1992). Delecja tego enhancera znacznie upośledza ekspresję melanotransferyny.

### *1.2.6.3. Rejony nieulegające translacji (untranslated regions- UTR).*

W potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów kluczową rolę odgrywają sekwencje mRNA zlokalizowane w odcinkach niekodujących i nieulegających translacji po stronie 5' i 3'. Mechanizmy potranskrypcyjne wpływają na wydajność syntezy białka między innymi poprzez regulację jądrowo-cytoplazmatycznego transportu mRNA oraz stabilności cząsteczki mRNA, kierowanie lokalizacją mRNA w obrębie komórki czy wydajnością translacji. Regulacja ta odbywa się dzięki obecności struktur takich jak: 5'cap, drugorzędowa struktura przestrzenna, otwarte ramki odczytu (ORFs), kodon



startu translacji AUG, sekwencje IRES, sygnał poliadenylacji (poly A) oraz motywy takie jak IREs (Chatterjee S. i wsp. 2009).



Rys.3. Strukturalna organizacja eukariotycznego mRNA (Chatterjee S. i wsp. 2009 – zmienione)

### ▪ 5'UTR

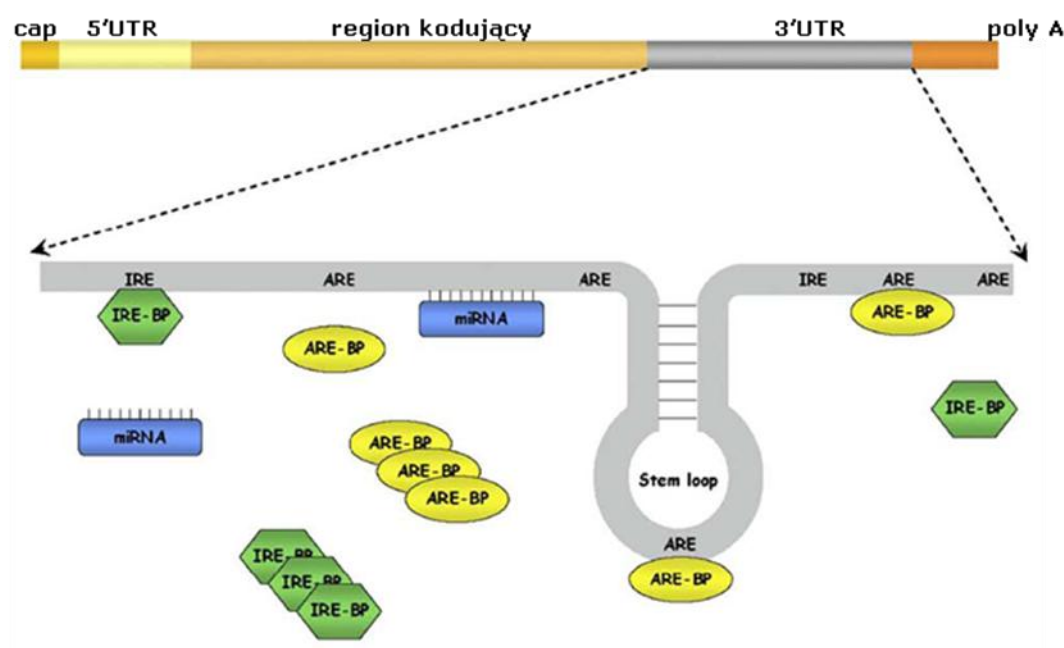
Najważniejszym etapem regulującym translację jest proces inicjacji, w którym kluczową rolę odgrywa odcinek 5'UTR. Wiązanie się czynników białkowych inicjujących translację jest ściśle uzależnione od motywów drugorzędowej struktury znajdujących się w tym rejonie. Ponadto lokalizacja kodonu startu translacji (AUG) wpływa decydująco na rozpoczęcie syntezy białka, a wszelkie zmiany w obrębie tego rejonu prowadzi do modyfikacji przebiegu translacji (Kozak M. 1989). Poszukiwania mutacji w odcinkach niekodujących genu i ich ewentualnego wpływu na proces nowotworowy doprowadziły do zidentyfikowania kilku zmian i pozwoliły odpowiedzieć na wiele pytań dotyczących patogenezy czerniaka. Właśnie w odcinku 5'UTR w pozycji 61 genu naskórkowego czynnika wzrostu *EGF* (*epidermal growth factor*) zlokalizowany jest polimorfizm A>G, a jego występowanie koreluje z głębszym naciekaniem tkanek przez nowotwór (ocenianym w skali Breslow) u badanych pacjentów (Randerson-Moor J.A. i wsp. 2004). Dowiedziono również, że całkowity czas przeżycia (tzw. OS) oraz czas przeżycia wolny od choroby (DFS) są krótsze w przypadku występowania wariantu G, a także wyższe było ryzyko wystąpienia przerzutów u nosicieli polimorfizmu (Okamoto I. i wsp. 2006). Wszystkie te

sposprzeżenia wskazują na wariant 61A/G w 5'UTR genu *EGF* jako potencjalny marker złośliwości czerniaka i wcześniejszej progresji choroby (Kwinta Ł. 2008).

Zdecydowana większość badań i doniesień traktująca o mutacjach w odcinkach niekodujących i ich związku z patogenezą czerniaka, dotyczy analiz wspomnianego już genu *CDKN2A*. Przykładem jest mutacja założycielska, położona 34 pary zasad powyżej kodonu *start* (transwersja -34G/T) i skutkująca powstaniem nowego kodonu AUG (kodonu startu translacji). Mutacja ta została stwierdzona w Wielkiej Brytanii i segreguje się wraz z chorobą (Liu L. i wsp. 1999). Częsta w populacji brytyjskiej jest również tranzycja IVS2-105A/G w genie *CDKN2A*, skutkująca powstaniem błędnego miejsca donorowego w pozycji 105 od strony 5' eksonu 3 (Harland M. i wsp. 2001; Loo J.C. i wsp. 2003). Z kolei Bisio A. i wsp. przeprowadzili analizę funkcjonalną najczęściej występujących mutacji w regionie 5'UTR genu *CDKN2A* w populacji włoskiej. Badania te dowiodły, że jedynie tranzycja -21C/T segregowała się z zachorowaniem na czerniaka i nie była obserwowana w grupie kontrolnej, natomiast zmiany -25C/T, -180G/A i -56G/T, powinny być przedmiotem dalszych analiz (Bisio A. i wsp. 2010)

### ▪ 3'UTR

Za stabilność cząsteczki mRNA odpowiada w dużej mierze ogon polyA, znajdujący się na końcu 3'. W obrębie odcinka 3'UTR znajdują się też sekwencje bogate w adeninę i uracyl – ARE (ang. AU-rich elements), których obecność reguluje degradację mRNA przez wpływ na skracanie polyA (Xu N. i wsp. 1997). Zaburzenia w obrębie ARE umożliwiają syntezę większej liczby białek na matrycy danego mRNA, co może prowadzić do utraty kontroli nad proliferacją i do transformacji nowotworowej (Kwinta Ł. 2008). Ważną cechą nowotworów jest zaburzenie architektury histologicznej oraz utrata biegunowości komórek. Udowodniono, że przestrzenna struktura drugorzędowa 3'UTR rozpoznawana jest przez czynniki pośredniczące w wiązaniu mRNA z cytoszkieletem, co wraz z selektywną degradacją mRNA odpowiada za nierównomierne rozmieszczenie tych cząsteczek. Skutkuje to utrzymywaniem komórkowej asymetrii, istotnej przy rozwoju, dojrzewaniu i proliferacji komórek (St Johnson D. 1995).



Rys. 4. Region 3'UTR oraz cis-elementy w jego obrębie tj.: IRE, ARE i struktura drugorzędowa (Lopez de Silanes I. i wsp. 2007 – zmienione).

Do najczęściej opisywanych zmian w odcinku 3'UTR u chorych na czerniaka należą polimorfizmy 500C/G oraz 540C/T w genie *CDKN2A* (Kumar R. i wsp. 2001). Grupa Kumar i wsp. udowodniła, że allel T w pozycji 540 występuje znacznie częściej wśród chorych ze sporadyczną postacią czerniaka. Zmiana 500C/G jest związana z kolei ze zwiększonym ryzykiem zachorowania u osób z rodzin FMM (Aitken J. i wsp. 1999). Mówi się także o zależności pomiędzy występowaniem 500C/G i 540C/T a krótszym czasem przeżycia (tzw. DFS) po remisji czerniaka (Sauroja I. i wsp. 2000). Przeprowadzono również badania mające na celu korelację pomiędzy występowaniem polimorfizmu 500C/G a klinicznym przebiegiem czerniaka (Lamperska K. i wsp. 2007). Nie wykazano jednak związku pomiędzy lokalizacją zmiany pierwotnej, wiekiem zachorowania czy czasem przeżycia, a występowaniem zmian w odcinku 3'UTR. Stwierdzono natomiast istotną zależność występowania polimorfizmu genu *mda-7* (*melanoma differentiation associated factor 7*) (Medireddi M.T. i wsp. 2000). Produkt tego genu bierze udział w procesie różnicowania melanocytów poprzez wpływ na strukturę chromatyny, co z kolei reguluje ekspresję odpowiednich genów.

Do zaburzeń ekspresji genu *mda-7* dochodzi na poziomie potranskrypcyjnym poprzez znaczne zmniejszenie stabilności mRNA. W obrębie 3'UTR mRNA genu *mda-7* zidentyfikowano motyw, który odpowiada za tę zmianę stabilności. Jest to sekwencja AUUUA, jedna z sekwencji ARE, które wpływają na okres półtrwania mRNA (Kwinta Ł. 2008; Medireddi M.T. i wsp. 2000).

## 2. CEL PRACY

W populacji polskiej mutacje dziedziczne w genie *CDKN2A* są niezwykle rzadkie. Natomiast częściej u chorych na czerniaka wykrywane są polimorfizmy w porównaniu z populacją osób zdrowych. W związku z tym, celem ogólnym pracy była analiza najczęściej występujących zmian polimorficznych w genie *CDKN2A* i w regionie 3'UTR tego genu u chorych na czerniaka oraz próba analizy funkcjonalnej zmian sekwencyjnych w odcinku 3'UTR genu *CDKN2A*.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Analizę polimorfizmów genu *CDKN2A* oraz jego regionu 3'UTR u 285 chorych na czerniaka.
2. Korelację uzyskanych wyników z przebiegiem klinicznym czerniaka.
3. Konstrukcję wektorów zawierających 3'UTR genu *CDKN2A* z 3 wariantami sekwencyjnymi: 500C>G, 540C>T oraz wariant bez polimorfizmu (tzw. formę „dziką”).
4. Transfekcję czerniakowych linii komórkowych wektorami zawierającymi poszczególne warianty sekwencyjne odcinka 3'UTR.
5. Ocenę poziomu ekspresji genu reporterowego w modelowych liniach komórkowych czerniaka.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Analiza zmian sekwencyjnych w genie *CDKN2A*

##### 3.1.1. Grupa badana

Analizę genu *CDKN2A* oraz odcinka 3'UTR przeprowadzono u 425 chorych na czerniaka, pacjentów Wielkopolskiego Centrum Onkologii. Zbierano informacje dotyczące wieku zachorowania na czerniaka, lokalizacji zmiany pierwotnej, współistnienia innego nowotworu, długości życia od momentu postawienia diagnozy, wieku w chwili zgonu (jeśli wystąpił) oraz historii zachorowań na nowotwory w rodzinie.

##### 3.1.2. Izolacja DNA

DNA izolowano z krwi obwodowej pacjentów z użyciem zestawu firmy Promega według zaleceń producenta. Krew pobierano na antykoagulant – EDTA. W pierwszym etapie do probówek zawierających 300µl krwi dodawano bufor do lizy erytrocytów (*Cell Lysis Solution*), inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej i wirowano przy 12000 obr. przez 1 minutę. Osad limfocytów zawieszano w buforze do lizy jąder (*Nuclei Lysis Solution*) i inkubowano przez 15 minut w 37°C. Białka wytrącano dodając bufor *Protein Precipitation Solution*. Następnie próby wirowano przy 12000 obr. przez 8 minut, a supernatanty przenoszono do nowych probówek. DNA wytrącano izopropanolem, płukano 70% etanolem, suszono, a następnie rozpuszczano w wodzie. Jakość preparatów sprawdzano na 1% żelu agarozowym.

##### 3.1.3. Analiza PCR-SSCP

Ze względu na konieczność przeprowadzenia analiz u dużej grupy chorych, wykorzystano metodę wstępnej selekcji - PCR-SSCP, która pozwala wykryć punktowe zmiany w DNA. Materiałem wyjściowym były produkty PCR, które denaturowano termicznie w buforze obciążającym z dodatkiem formamidu. W warunkach natywnej elektroforezy w żelu poliakryloamidowym cząsteczki DNA tworzą wewnętrzne sparowania, przez co przyjmują określoną konformację

przestrzenną zależną od sekwencji nukleotydów. Szybkość migracji jednoniciowych fragmentów DNA zależy od ich wielkości i konformacji. Fragmenty o takiej samej długości i sekwencji nukleotydów przyjmują takie same konformacje i wykazują taką samą ruchliwość elektroforetyczną. Fragment z mutacją tworzy odmienny od prawidłowych wzór prążków.

### 3.1.3.1. Przygotowanie starterów do reakcji PCR

W Tab.1. przedstawiono sekwencje starterów użytych do analizy genu *CDKN2A* oraz jego fragmentu 3'UTR. Startery znakowano radioaktywnym izotopem  $\gamma$ -<sup>32</sup>P (3000 Ci/mmol, Amersham) z użyciem enzymu T4 Polynucleotide Kinase (Promega), który przenosi radioaktywną grupę fosforanową z  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]ATP na koniec 5' startera. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

- 50 $\mu$ M starter forward - 2 $\mu$ l
- 50 $\mu$ M starter rewers - 2 $\mu$ l
- 10X bufor dla T4 Kinase - 1 $\mu$ l
- $\gamma$ ATP (1mCi/ml) - 2 $\mu$ l
- T4 Kinase (10U/ $\mu$ l) - 1 $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O – 2 $\mu$ l

Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 40 minut, a następnie enzym inaktywowano w 80°C przez 5 minut. Tak przygotowaną ilość starterów użyto do analizy PCR-SSCP serii składającej się z 50 preparatów.

Tab.1. Startery wykorzystywane w reakcji PCR-SSCP

<b>nazwa</b>	<b>sekwencja</b>
<b>1/16F</b>	5' ggg AgC AgC ATg Gag CCg 3'
<b>1/16R</b>	5' AgT CgC CCg CCA TCC CCT 3'
<b>2a/16F</b>	5' AgC TTC CTT TCC gTC ATg 3'
<b>2a/16R</b>	5' gCA gCA CCA CCA gCg Tg 3'
<b>2b/16F</b>	5' AgC CCA ACT gCg CCg AC 3'
<b>2b/16R</b>	5' CCA ggT CCA CCg gCA gA 3'
<b>2c/16F</b>	5' Tgg ACg TgC gCg ATg C 3'
<b>2c/16R</b>	5' ggA AgC TCT CAg ggT ACA AAT TC 3'
<b>3/16F</b>	5' CCg gTA ggg ACg gCA AgA gA 3'
<b>3/16R</b>	5' CTg Tag Gac CCT Cgg TgA CTg ATg 3'
<b>3R1</b>	5' CTg Tag Gac CTT Cgg TgA CTg ATg 3'
<b>3F2</b>	5' gAC ATC CCC gAT TgA AAg AAC 3'
<b>3R2</b>	5' TTT ACg gTA gTg ggg gAA gg 3'
<b>3F3</b>	5' gTC CTg CCT TTT AAC gTA gA 3'
<b>3R3</b>	5' CCT Gag CTT CCC TAg TTC AC 3'
<b>3F4</b>	5' CgC CCT AAg CgC ACA TTC AT 3'
<b>3R4</b>	5' TTT TgA gTg AAT gAA TgA AAA TT 3'



### 3.1.3.2. PCR

Reakcje PCR prowadzono z użyciem polimerazy aTaq (Promega), w obecności 7% DMSO (Sigma). Jednorazowo analizowano 50 preparatów. Objętość jednostkowej reakcji wynosiła 5 $\mu$ l. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

- 10X bufor - 30 $\mu$ l
- 25mM MgCl<sub>2</sub> - 30 $\mu$ l
- 27% DMSO - 78 $\mu$ l
- 10mM dNTP - 6 $\mu$ l
- aTaq polimeraza (5U/ $\mu$ l) - 3 $\mu$ l
- mieszanina kinazowanych starterów - 10 $\mu$ l
- DNA 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l - 50x 1 $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O – 93 $\mu$ l

Profil amplifikacji:

- denaturacja wstępna: 95°C / 2min
  - denaturacja: 95°C / 30sek
  - przyłączanie starterów: 58°C / 30sek
  - elongacja: 72°C / 30sek
  - elongacja końcowa: 72°C / 7min
- } **35x**

### 3.1.3.3. Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym

Produkty PCR analizowano w natywnym 6% żelu poliakryloamidowym (stosunek akryloamidu do bisakryloamidu wynosił 19:1), w obecności 10% glicerolu (Sigma). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze 1xTBE (Sigma), przez noc, przy stałej mocy prądu elektrycznego 15W/cm<sup>2</sup>. Następnie żel przenoszono na bibułę Whatmann (PoCh), suszono i poddawano autoradiografii. Prążki wykazujące inną niż pozostałe migrację, wycinano z żelu i przygotowywano do sekwencjonowania.

### 3.1.4. Analiza sekwencji wykrytych zmian w genie *CDKN2A*.

Kolejność występowania poszczególnych zasad analizowano stosując sekwencjonowanie metodą cykliczną (zmodyfikowana metoda Sanger). Stosuje się w niej termostabilną polimerazę Taq, wyznakowany starter oraz cztery specyficzne dideoksynukleotydy (ddNTP) do zatrzymania replikacji jednoniciowej (denaturowanej) matrycy. Procedura obejmowała trzy etapy: przygotowanie matryc, reakcję sekwencjonowania i elektroforezę.

#### 3.1.4.1. Przygotowanie matryc do sekwencjonowania

W celu przygotowania matryc do sekwencjonowania, DNA wycięty z żelu poliakrylamidowego (pkt 3.1.3.3.) amplifikowano przeprowadzając reakcję PCR z użyciem polimerazy aTaq ze starterami odpowiednimi dla danego fragmentu genu *CDKN2A*. Sekwencje starterów przedstawiono w Tab.1. Reakcję prowadzono w objętości 30 $\mu$ l, a skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

- 10X bufor - 3 $\mu$ l
- 25mM MgCl<sub>2</sub> - 3 $\mu$ l
- 27% DMSO – 7.8 $\mu$ l
- 10mM dNTP - 0.6 $\mu$ l
- aTaq polimeraza (5U/ $\mu$ l) – 0.3 $\mu$ l
- 50 $\mu$ M starter forward – 0.5 $\mu$ l
- 50 $\mu$ M starter rewers – 0.5 $\mu$ l
- DNA 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l - 5 $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O – 9.3 $\mu$ l

Profil amplifikacji przedstawiono w pkt. 3.1.3.2.

Po reakcji PCR DNA rozdzielano w 1% preparatywnym żelu agarozowym i oczyszczano stosując zestaw do ekstrakcji z żelu (Qiagen). W tym celu wycięty fragment żelu umieszczano w próbówce i dodawano 3 objętości buforu QG, po czym inkubowano z wytrząsaniem w temperaturze 50°C do całkowitego rozpuszczenia się

żelu. Następnie dodawano izopropanol (1 objętość), наносzono na kolumnę i wirowano przez 1 minutę w temp. pokojowej przy 12000 obr. Kolumnę przemywano następnie buforem PE z dodatkiem 70% etanolu, po czym eluowano DNA wodą.

### 3.1.4.2. Reakcja sekwencjonowania

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzano przy użyciu zestawu *fmol* DNA Cycle Sequencing System (Promega). Reakcję kinazowania starterów dla jednej matrycy wykonywano wg następującego schematu:

- 1  $\mu$ M starter forward lub 1  $\mu$ M starter rewers - 1  $\mu$ l
- 10X bufor dla T4 Kinase - 1  $\mu$ l
- $\gamma$ ATP (1mCi/ml) - 2  $\mu$ l
- T4 Kinase (10U/ $\mu$ l) – 0.5  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O – 5.5  $\mu$ l

Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 40 minut, a następnie enzym inaktywowano w 80°C przez 5 minut.

Wyznakowane startery użyto do reakcji sekwencjonowania przeprowadzanej przy użyciu Taq DNA Seq Polymerase zgodnie z zaleceniami producenta. Mieszanina reakcyjna zawierała:

- 5X bufor dla Taq DNA Seq - 5  $\mu$ l
- 0.33  $\mu$ M starter forward/rewers - 1  $\mu$ l
- Taq DNA Seq (5U/ $\mu$ l) - 1  $\mu$ l
- Matryca 1ng/ $\mu$ l - 3  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O - 8  $\mu$ l

Do próbek zawierających już 2  $\mu$ l odpowiednich ddNTP (A,C,G,T) dodawano 4  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej i przeprowadzano reakcję PCR stosując profil temperaturowy opisany w pkt. 3.1.3.2. Terminacja reakcji następowała poprzez dodanie buforu *Sequencing Stop Solution*. Rozdział produktów sekwencjonowania prowadzono w 5% denaturującym żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 7.5M mocznika (Urea – Fluka).

Elektroforezę prowadzono przy napięciu 2000V przez 2 godziny. Następnie żel przenoszono na bibułę Whatmann, suszono i poddawano autoradiografii.

### 3.1.5. Metody analiz statystycznych

W celu analizy statystycznej uzyskanych w reakcji PCR-SSCP wyników zastosowano następujące testy: Shapiro–Wilk i Lilliefors, oraz test t-studenta, test chi kwadrat z modyfikacją Yates’at i dokładny test Fishera. Do oceny istotności statystycznej analizowanych parametrów klinicznych wybrano nieparametryczny test U-Manna-Whitneya. Wartość  $P < 0.05$  przyjmowano jako statystycznie znamienne. Do analiz zastosowano program Statistica 6.0.

## 3.2. Analiza funkcjonalna zmian sekwencyjnych w 3’UTR genu *CDKN2A*

W celu uzyskania wektorów niosących poszczególne warianty sekwencyjne regionu 3’UTR genu *CDKN2A* potrzebnych do przeprowadzenia analiz funkcjonalnych, wykonano szereg procesów obejmujących: izolację RNA z krwi obwodowej, odwrotną transkrypcję, reakcję PCR mającą na celu syntezę poszczególnych wariantów sekwencji odcinka 3’UTR, przygotowanie plazmidów, transformację bakterii kompetentnych plazmidem z wprowadzonym konstruktem, namnożenie odpowiednich klonów, izolację plazmidowego DNA, analizę restrykcyjną oraz reakcję sekwencjonowania.

### 3.2.1. Izolacja RNA

Całkowity RNA izolowano z krwi obwodowej za pomocą odczynnika TRI Reagent (Sigma) według zaleceń producenta. Do 750  $\mu$ l TRI Reagent zawierającego 20  $\mu$ l 5 N kwasu octowego dodawano 200  $\mu$ l krwi. Po dokładnym wymieszaniu dodawano 200  $\mu$ l chloroformu (POCh) i intensywnie wytrząsano. Po 10 minutach wirowania przy 12 000 obr., w 4°C pobierano fazę wodną i przenoszono do nowych probówek. RNA wytrącano poprzez dodanie izopropanolu (POCh) w proporcji 1:1+50 $\mu$ l i wirowano j.w. Próby mieszano, wirowano przez 10 minut przy 12 000 obr. w 4°C, przemywano 70% etanolem i wirowano jak wyżej. RNA rozpuszczano w wodzie dejonizowanej, wolnej od RNaz. Stężenie RNA oznaczano

spektrofotometrycznie, a stopień zanieczyszczenia białkiem obliczano na podstawie stosunku absorbancji  $A_{260}/A_{280}$ .

### 3.2.2. Odwrotna transkrypcja

Całkowity RNA przepisywano na komplementarny DNA (cDNA) przy pomocy zestawu SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta. W pierwszym etapie mieszaninę zawierającą 3.5 $\mu$ l (2 $\mu$ g) RNA, 1 $\mu$ l 50 $\mu$ M oligo(dT), 1 $\mu$ l 10mM dNTP oraz 4.5 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> inkubowano przez 5 minut w 65°C i przekładano na lód. Następnie dodawano mieszaninę transkrypcyjną zawierającą 10Xbufor (2 $\mu$ l), 25mM MgCl<sub>2</sub> (4 $\mu$ l), 0.1M DTT (2 $\mu$ l), RNaseOUT 40U/ $\mu$ l (1 $\mu$ l) oraz enzym SuperScript III RT 200U/ $\mu$ l (1 $\mu$ l) i inkubowano przez 50 minut w 50°C po czym enzym inaktywowano termicznie przez 1 minutę w 85°C. W celu usunięcia RNA z próby dodawano enzym RNase H 2U/ $\mu$ l (1 $\mu$ l) i inkubowano przez 20 minut w 37°C. cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

### 3.2.3. Reakcja PCR

Wykorzystując polimerazę Platinum Pfx DNA (Invitrogen), wykazującą aktywność egzonukleazy 3'-5' oraz specjalnie zaprojektowane startery (Tab.2.), otrzymano wymagane warianty sekwencyjne odcinka 3'UTR, zawierające określone miejsca restrykcyjne. Skład mieszaniny restrykcyjnej przedstawiał się następująco:

- 10X bufor do polimeazy - 5 $\mu$ l
- 10mM dNTP mix – 1.5 $\mu$ l
- 50mM MgSO<sub>4</sub> -1 $\mu$ l
- 10mM startery - 2x po 1.5 $\mu$ l
- 10X enhancer - 5 $\mu$ l
- Pfx polimeraza 2.5U/ $\mu$ l – 0.5 $\mu$ l
- cDNA 0.1 $\mu$ g - 2 $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O - 32 $\mu$ l

Profil temperaturowy :

- denaturacja wstępna: 95°C / 2min
  - denaturacja: 95°C / 15sek
  - przyłączanie starterów: 55°C / 30sek
  - elongacja: 68°C / 1min
  - elongacja końcowa: 68°C / 7min
- } **35x**

Poprawność reakcji kontrolowano za pomocą rozdźwięku elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym w obecności buforu TAE (Tris-octan, EDTA) względem znacznika masy cząsteczkowej DNA (Promega). Rozdzielone fragmenty wycinano z żelu i oczyszczano stosując zestaw do ekstrakcji z żelu (Qiagen, pkt. 3.1.4.1.).

Tab.2. Startery wykorzystywane w reakcji PCR

<b>nazwa</b>	<b>sekwencja</b>
3.2F Xba	5' ggT CTA Gac ATC CCC gAT TgA AAg AAC 3'
3R BamHI	5' CTg ggA TCC TTT TgA gTg AAT gAA Tg 3'
F 500G/C	5' TCT gag AAA CCT Cgg gAA ACT T 3'
R 500G/C	5' AAg TTT CCC gAg gTT TCT CAg A 3'
F 540C/T	5' gTC CTA CAg ggC TAC AAC TgC CC 3'
R 540C/T	5' ggg CAg TTg Tag CCC TgT Agg AC 3'

### **3.2.4. Ligacja insertu 3'UTR do wektora pCR-Blunt-TOPO.**

W pierwszym etapie klonowania odpowiedni wariant 3'UTR ligowano do wektora pCR-Blunt-TOPO przy użyciu zestawu Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen). Plazmid ten w formie linearnej jest gotowy do klonowania, umożliwiając

szybką i wydajną ligację. Reakcję ligacji prowadzono według wskazań producenta, przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Skład mieszaniny ligacyjnej był następujący:

- pCR II-Blunt-TOPO - 1 $\mu$ l
- Salt Solution - 1 $\mu$ l
- Product PCR - 2 $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O - 2 $\mu$ l

### 3.2.5. Transformacja bakterii

W celu namnożenia konstruktu (TOPO-3'UTR) prowadzono transformację bakterii kompetentnych *E.coli* One Shot MAX Efficiency DH5 $\alpha$ -T1 (Invitrogen) według procedury zalecanej przez producenta. Do 50 $\mu$ l zawiesiny bakterii dodawano 2 $\mu$ l mieszaniny ligacyjnej i inkubowano na lodzie przez 30 minut. Następnie przeprowadzano szok temperaturowy („heat-shock”), przenosząc mieszaninę do 42°C na 30 sekund i kolejno na lód. W dalszym etapie dodawano 250 $\mu$ l medium S.O.C. (Invitrogen) i inkubowano z wytrząsaniem w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Następnie bakterie posiewano na pożywkę stałą LB (Luria Broth – Sigma Aldrich) zawierającą kanamycynę (10mg/ml) jako czynnik selekcyjny i hodowano przez noc w temperaturze 37°C. Kolejnego dnia z płytki hodowlanej pobierano klony bakteryjne, przenoszono do 3 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem i namnażano przez noc w 37°C z wytrząsaniem.

### 3.2.6. Izolacja plazmidowego DNA w skali mini (3 ml hodowli)

Wykorzystując metodę lizy alkalicznej i stosując zestaw Miniprep Kit firmy Qiagen, izolowano plazmidowy DNA z namnożonych klonów bakteryjnych. Bakterie, po uprzednim odwirowaniu (8000 obr./min., 5 min.) i usunięciu pożywki, zawieszano w buforze *P1* (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100 $\mu$ g/ml RNase A). Następnie przeprowadzano lizę bakterii inkubując roztwór przez 5 minut w temperaturze pokojowej w obecności buforu *P2* (200mM NaOH, 1% SDS). Zdenaturowane białka wytrącano buforem neutralizującym *P3* (3M octan potasu, pH 5.5) i inkubowano mieszaninę na lodzie przez 5 minut. Po wirowaniu (10 min./12000obr./4°C),

supernatant zbierano, a plazmidowy DNA wytrącano stosując 0.7 objętości izopropanolu. Po kolejnym wirowaniu osad przemywano 70% etanolem, suszono i rozpuszczano w H<sub>2</sub>O. Stężenie plazmidów oznaczano na podstawie pomiaru absorbancji roztworu przy długości fali 260 nm. Obecność zanieczyszczeń, m.in. białek, określano na podstawie wartości ilorazu A<sub>260/280</sub>.

### 3.2.7. Analiza restrykcyjna

W celu sprawdzenia poprawności klonowania prowadzono reakcję trawienia wyizolowanych plazmidów enzymami restrykcyjnymi XbaI i BamHI, w obecności buforu Multicore (Promega) przez 1.5 godziny w temperaturze 37°C. Mieszanina reakcyjna (dla pojedynczej reakcji) zawierała:

- DNA 0.5µg - 3µl
- 10X bufor Multicore - 1µl
- enzym XbaI - 0.5µl
- enzym BamHI – 0.5µl
- RNaza A – 0.5µl
- H<sub>2</sub>O – 4.5µl

Następnie produkty reakcji trawienia rozdzielano w 1% żelu agarozowym w warunkach jak w punkcie 3.1.4.1.

### 3.2.8. Klonowanie do wektora phRL-CMV

Pozytywny klon bakteryjny, zawierający plazmid 3'UTR z odpowiednim wariantem sekwencyjnym, trawiono enzymami restrykcyjnymi XbaI i BamHI jak w pkt. 3.2.7. Po trawieniu plazmid rozdzielano na preparatywnym 1% żelu agarozowym po czym oczyszczano stosując zestaw do ekstrakcji z żelu jak w pkt. 3.1.4.1.



### 3.2.8.1. Przygotowanie wektora *phRL-CMV*

W celu otwarcia wektora *phRL-CMV* przeprowadzono trawienie restrykcyjne enzymami *XbaI* i *BamHI* w obecności buforu Multicore (Promega). Reakcję trawienia prowadzono przez 1.5 godziny w temperaturze 37°C. Mieszanina reakcyjna zawierała:

- plazmid *phRL-CMV* 3μg - 3μl
- 10X bufor Multicore - 3μl
- enzym *XbaI* - 1μl
- enzym *BamHI* - 1μl
- RNaza A – 0.5μl
- H<sub>2</sub>O – 21.5μl

Następnie, w celu zapobiegnięcia zamykania się pustego plazmidu, otwarty wektor defosforylowano w temperaturze 37°C przez 30min. za pomocą alkalicznej fosfatazy (Promega). Skład mieszaniny reakcyjnej:

- otwarty wektor *phRL-CMV* - 30μl
- alkaliczna fosfataza - 1μl
- 10X bufor dla fosfatazy - 4μl
- H<sub>2</sub>O – 5μl

Po 30 minutowej inkubacji do mieszaniny reakcyjnej dodawano kolejny 1μl enzymu i inkubację kontynuowano przez kolejne 30min. w 37°C. Po przeprowadzeniu elektroforezy agarozowej, trawiony plazmid wycinano z żelu i oczyszczano przy użyciu zestawu do ekstrakcji (pkt. 3.1.4.1.).

### 3.2.8.2. Ligacja insertu 3'UTR do wektora *phRL-CMV*

W celu wklonowania fragmentu 3'UTR do wektora *phRL-CMV*, prowadzono reakcję ligacji z wykorzystaniem ligazy T4 (Promega) w obecności buforu zalecanego przez producenta. Reakcję prowadzono przez noc w temperaturze 16°C. Skład mieszaniny ligacyjnej był następujący:

- wektor phRL-CMV - 2 $\mu$ l
- insert - 4 $\mu$ l
- 10X bufor dla T4 ligazy - 1 $\mu$ l
- T4 ligaza - 1 $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O – 2 $\mu$ l

### 3.2.8.3. *Transformacja bakterii*

W celu namnożenia plazmidowego DNA, transformowano bakterie kompetentne *E.coli* One Shot MAX Efficiency DH5 $\alpha$ -T1 (Invitrogen) mieszaniną ligacyjną (10 $\mu$ l), zgodnie ze schematem w pkt. 3.2.5. Jako czynnik selekcyjny stosowano penicylinę (100 $\mu$ g/ml). Kolejnego dnia z płytki hodowlanej pobierano klony bakteryjne, przenoszono do 3 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem i namnażano przez noc w 37°C z wytrząsaniem.

### 3.2.8.4. *Izolacja plazmidowego DNA w skali mini (3 ml hodowli)*

Z namnożonych klonów bakteryjnych izolowano plazmidowy DNA metodą lizy alkalicznej przy zastosowaniu zestawu Miniprep Kit firmy Qiagen. Postępowano jak w punkcie 3.2.6.

### 3.2.8.5. *Analiza restrykcyjna klonów*

W celu sprawdzenia poprawności klonowania prowadzono reakcję trawienia wyizolowanych plazmidów enzymami restrykcyjnymi XbaI i BamHI. Reakcję prowadzono jak w punkcie 3.2.7.

### 3.2.9. Izolacja plazmidowego DNA w skali maxi (100 ml hodowli)

W celu uzyskania większej ilości plazmidowego DNA o wysokim stopniu czystości, prowadzono maxi izolację z wykorzystaniem zestawu JetStar (Genomed), zgodnie z procedurą producenta. W tym celu nocną hodowlę bakterii wirowano przez 30 min. w temp. pokojowej przy 5000 RPM. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w buforze E1 (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH=8), dodawano bufor E2 (200mM NaOH, 1% SDS), mieszano i inkubowano przez 5 minut w temp. pokojowej. Następnie dodawano bufor neutralizujący E3 (3.1M octan potasu, pH=5.5) i wirowano j/w. W międzyczasie równoważono kolumnę poprzez nałożenie na nią buforu E4 (600mM NaCl, 100mM octan sodu, 0.15% Triton-X100, pH=5). Supernatant ze zwirowanych prób nakładano na kolumnę, a następnie przemywano buforem E5 (800mM NaCl, 100mM octan sodu, pH=5). DNA eluowano z kolumny za pomocą buforu E6 (1500mM NaCl, 100mM octan sodu, pH=5). Do wytrącenia DNA używano izopropanolu (POCh), wirując próbę przy 5 600 RPM przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Supernatant usuwano, a osad przemywano 70% etanolem, suszono i rozpuszczano w wodzie.

### 3.2.10. Analiza ekspresji wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR

#### 3.2.10.1. Hodowle komórkowe

W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano linie komórkowe: Mich-2, MeWo, WM35, WM902B, które są ustalonymi liniami wyprowadzonymi z komórek ludzkiego czerniaka oraz linię HskMEC.1 –ludzkie, endotelialne komórki skóry. Wykorzystane linie komórkowe utrzymywane były w warunkach standardowych, tzn. w temperaturze 37°C oraz atmosferze wzbogaconej 5% CO<sub>2</sub> i nasyconej parą wodną. Podstawowe medium hodowlane stanowiła pożywka Dulbecco's Modified Eagle's Medium ( DMEM – Gibco Invitrogen) uzupełniona 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS – Foetal Bovine Serum, Gibco Invitrogen) oraz gentamycyną o stężeniu 80µg/ml (KRKA).

Komórki pasażowano po osiągnięciu około 90% konfluencji. W pierwszym etapie zbierano medium zawierające produkty metabolizmu komórek i za pomocą PBS (Phosphate Buffered Saline – fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami, Gibco Invitrogen) usuwano pozostałości pożywki. Następnie, w celu odklejenia

komórek dodawano 1x stężoną trypsynę (Gibco Invitrogen). W momencie odklejenia się komórek, enzym inaktywowano przez dodanie pożywki zawierającej FBS. Nadmiar komórek usuwano i uzupełniano świeżym medium.

### 3.2.10.2. Transfekcja komórek

Wybrane linie komórkowe transfekowano plazmidem phRL-CMV zawierającym gen lucyferazy oraz odpowiedni wariant sekwencyjny regionu 3'UTR, przy użyciu zestawu FuGene HD Transfection Reagent (Roche Diagnostics). W pierwszym etapie, zgodnie z zaleceniami producenta, dla każdej linii komórkowej przeprowadzono wstępny eksperyment w celu określenia optymalnej proporcji odczynnika FuGene HD do ilości plazmidowego DNA. Następnie na 24 godziny przed transfekcją komórki w ilości  $4 \times 10^5$  posiewano na płytkę 6-dółkową tak, by następnego dnia osiągnęły 90% konfluencji. Kolejnym etapem było przygotowanie kompleksu transfekcyjnego. W tym celu 2µg DNA rozpuszczano w 100µl pożywki DMEM, dodawano ustaloną wcześniej ilość odczynnika FuGene HD, całość inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej i dodawano do komórek. Wydajność transfekcji oceniano po 24 godzinach, na podstawie luminescencji emitowanej przez lucyferazę pochodzącą z żebroplawa (*Renilla reniformis*).

### 3.2.10.3. Pomiar aktywności lucyferazy

Badanie aktywności różnych wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR przeprowadzano z użyciem zestawu odczynników Dual Luciferase Reporter Assays System (Promega) przy pomocy luminometru (Hidex).

Po 24 godzinach inkubacji, transfekowane komórki poddawano lizie z użyciem 100 µl 1×PLB (*Passive Lysis Buffer*). Pomiar aktywności lucyferazy polegał na podaniu odpowiedniego substratu i pomiarze intensywności emitowanej luminescencji.

### 3.2.10.4. Analiza statystyczna.

Analizę statystyczną wyników wykonano przy pomocy programu GraphPad InStat v.3.05 (GraphPad Software) oraz Microsoft Excel 2007. Prezentowane wyniki doświadczeń stanowią średnią pomiarów uzyskanych z trzech oddzielnych powtórzeń każdego eksperymentu. Do oszacowania wpływu mutacji w odcinku 3'UTR na poziom aktywności lucyferazy zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA). Wszystkie wyniki analizowano również testem *post-hoc Student-Newman-Keuls*.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Analiza zmian sekwencyjnych w genie *CDKN2A*

#### 4.1.1. Analiza danych klinicznych

Izolację DNA przeprowadzono u 425 chorych na czerniaka, pacjentów Wielkopolskiego Centrum Onkologii. Zbierano dokumentację medyczną dotyczącą wieku zachorowania, lokalizacji zmiany pierwotnej, współistnienia innego nowotworu, wieku w chwili zgonu (jeśli wystąpił), długości życia od momentu postawienia diagnozy, historii zachorowań na nowotwory w rodzinie. Ze względu na niekompletne historie choroby powyższe dane udało się zgromadzić jedynie dla 285 pacjentów i tylko dla tej grupy przeprowadzono pełne analizy. W grupie badanej było 155 kobiet (54.39%) oraz 130 mężczyzn (45.61%). Średnia wieku w chwili zachorowania wynosiła 48.13 lat. W Tab.3. przedstawiono lokalizację zmiany pierwotnej.

Tab. 3. Lokalizacja zmiany pierwotnej u chorych na czerniaka w grupie badanej.

lokalizacja zmiany pierwotnej	liczba pacjentów
tułów	127
kończyna	112
głowa	27
oko	2
płytko paznokciowa	2
odbyt	1
lokalizacja nieznana	14

## Wyniki

U jednego pacjenta stwierdzono mnogie pierwotne ogniska czerniaka (MPM), u pięciu występował rak piersi, u jednego stwierdzono raka jelita grubego, u jednego raka macicy, stwierdzono jeden przypadek retinoblastomy oraz w jednym przypadku występowały dwa dodatkowe nowotwory: rak tarczycy i rak piersi. W czasie, w którym wykonywano badania, zmarło 132 pacjentów, w tym 104 – w ciągu 5 lat od postawienia diagnozy.

Wykorzystując test nieparametryczny U-Mann-Whitney analizowano znamienność statystyczną pomiędzy czasem przeżycia lub śmierci i parametrami klinicznymi (Tab.4).

Tab.4. Korelacja pomiędzy czasem przeżycia a parametrami klinicznymi ( U-Mann-Whitney).

Zmienne		0 (zgon)	1 (przeżycie)	P (wartość)
płeć	kobieta	68 51,51%	87 56,86%	NS
	mężczyzna	64 48,49%	66 43,14%	
wiek w chwili diagnozy		średni 48,14; SD 14,14, zakres 20-79	średni 48,11; SD 13,12, zakres 19-80	NS
lokalizacja zmiany pierwotnej				
tułów		60	67	NS
kończyna		53	59	NS
głowa		8	19	NS
płytko paznokciowa		2	0	NS
odbyt		1	0	NS
oko		2	0	NS
nieznana		6	8	NS

NS- non significant; nieistotne statystycznie;

## Wyniki

Występowanie nowotworów w rodzinie wskazało 59 pacjentów (20.7%). Czerniak występował w 12 rodzinach, dwa przypadki czerniaka zanotowano w 2 rodzinach, rak macicy - w 8 rodzinach, rak płuc – w 17, rak żołądka - w 9, rak jelita grubego – w 6, rak krtani – w 6, rak wątroby – w 4, rak trzustki- w 3 i nowotwór mózgu – w 3 rodzinach. Pojedyncze zachorowania na inny niż wymienione typ nowotworu wystąpiły w 10 rodzinach. Jednak tylko dwa przypadki mogą być zakwalifikowane jako zespół predysponujący do zachorowania na czerniaka: rodzinny zespół znamion dysplastycznych (FAMMM lub DSN) oraz FAMMM-PC (czerniak rodzinny z rakiem trzustki). W Tab.5. przedstawiono zależność pomiędzy występowaniem nowotworów w rodzinie, a czasem przeżycia chorych.

Tab.5. Korelacja pomiędzy czasem przeżycia chorych na czerniaka a występowaniem nowotworów w rodzinie pacjenta

zmienna	0 (zgon)	1 (przeżycie)	P (wartość)
Jeden przypadek czerniaka	1	9	Chi <sup>2</sup> <b>p=0,0191<sup>a</sup></b> Fisher: <b>p=0,0176<sup>a</sup></b>
	131	144	
Więcej niż jeden przypadek czerniaka	0	2	NS Chi <sup>2</sup> p=0,1874 Fisher: p=0,2873
	132	151	
DNS	0	2	NS Chi <sup>2</sup> p=0,1874 Fisher: p=0,2873
	132	151	
Jeden przypadek raka piersi	5	7	NS Chi <sup>2</sup> p=0,7414 Fisher: p=0,4892
	127	146	
Więcej niż jeden przypadek raka piersi	0	1	NS Chi <sup>2</sup> p=0,3521 Fisher: p=0,5368
	132	152	
Rak macicy	2	6	NS Chi <sup>2</sup> p=0,2200 Fisher: p=0,1947
	130	147	
Jeden przypadek raka płuc	7	7	NS Chi <sup>2</sup> p=0,7768 Fisher: p=0,4941
	125	146	
Więcej niż jeden przypadek raka płuc	3	0	NS Chi <sup>2</sup> p=0,0609 Fisher: p=0,0981
	129	153	
Rak krtani	4	2	NS Chi <sup>2</sup> p=0,3123 Fisher: p=0,2754
	128	151	
Rak żołądka	4	5	NS Chi <sup>2</sup> p=0,9089 Fisher: p=0,5913
	128	148	
Rak jelita grubego	1	1	NS Chi <sup>2</sup> p=0,1410 Fisher: p=0,1452
	131	152	



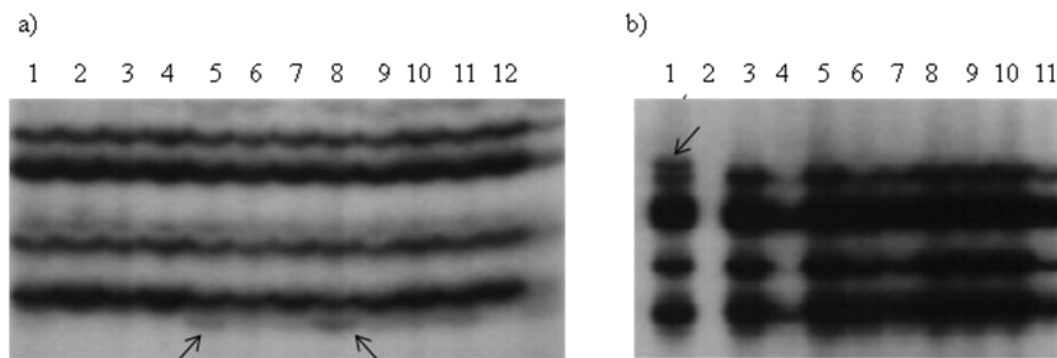
## Wyniki

Rak trzustki	2	2	NS Chi <sup>2</sup> p=0,4773 Fisher: p=0,4446
	130	151	
Rak wątroby	2	2	NS Chi <sup>2</sup> p=0,8817 Fisher: p=0,6314
	130	151	
Guz mózgu	1	2	NS Chi <sup>2</sup> p=0,6503 Fisher: p=0,5554
	131	151	
Inne nowotwory	4	6	NS Chi <sup>2</sup> p=0,6835 Fisher: p=0,4695
	128	147	

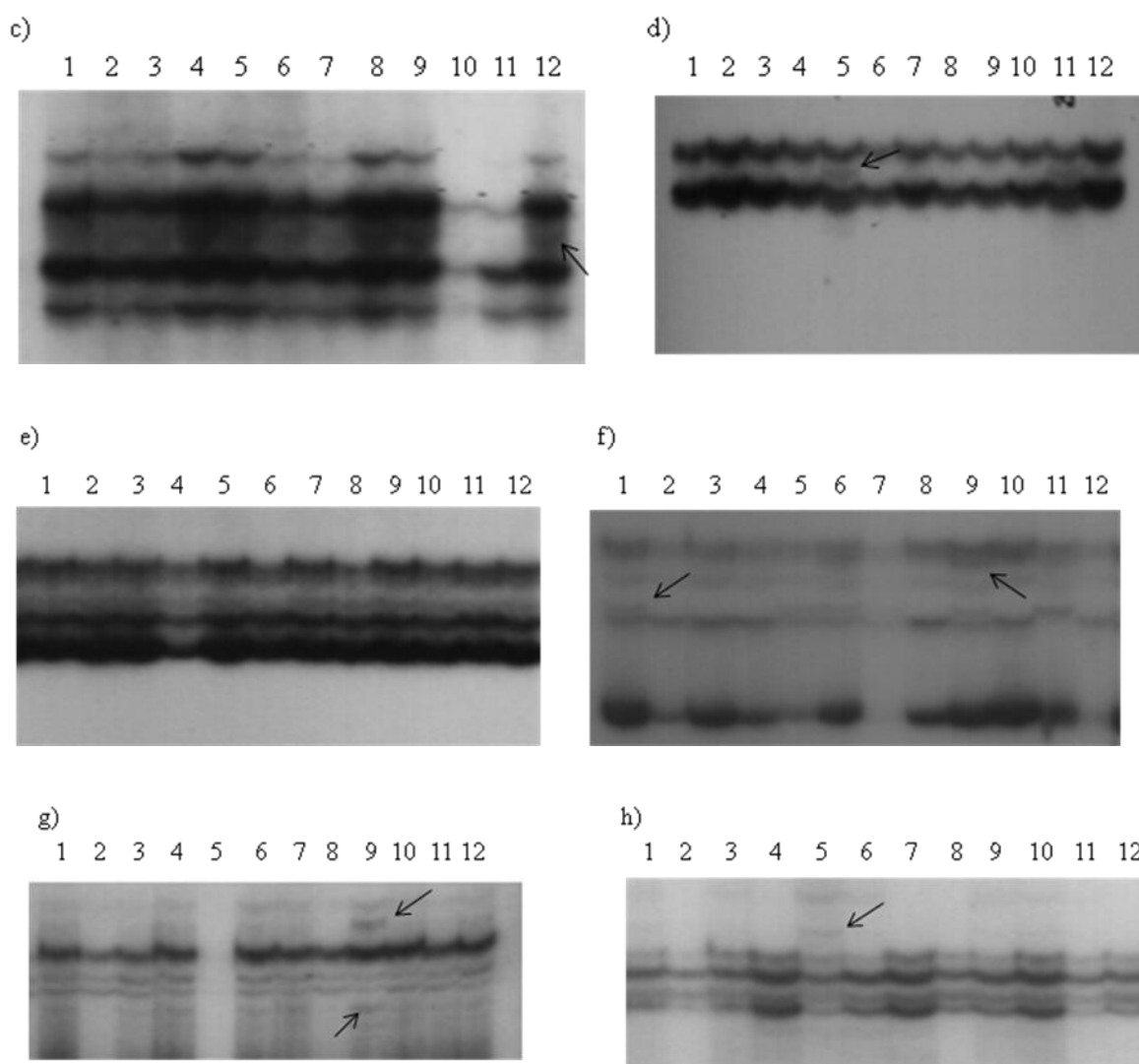
<sup>a</sup> - statystycznie znamienne; NS – non significant - nieznamienne statystycznie

### 4.1.2 Analiza genu *CDKN2A* metodą PCR-SSCP

Wykorzystując polimerazę aTaq, 7% DMSO oraz wyznakowane radioizotopem startery, przeprowadzono analizę PCR-SSCP dla 285 pacjentów chorych na czerniaka złośliwego, mającą na celu wykrycie mutacji punktowych i polimorfizmów DNA. Wyniki reakcji analizowano za pomocą rozdzielania elektroforetycznego w 6% żelu poliakrylamidowym, a następnie poddawano autoradiografii. Na Rys.5a i Rys.5b przedstawiono wzory rozkładu prążków podczas analizy poszczególnych fragmentów genu z odpowiednio dobranymi starterami (Tab. 1. pkt. 3.1.3.1.)



Rys. 5a. Analiza PCR-SSCP poszczególnych fragmentów genu *CDKN2A* oraz odcinka 3'UTR; Zdenaturowane produkty PCR rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym w obecności buforu 1X TBE ścieżki 1-12: numery preparatów, strzałkami zaznaczono przykładowe prążki o zmienionym wzorze migracji a) exon 1; b) exon 2a.



Rys. 5b. Analiza PCR-SSCP poszczególnych fragmentów genu *CDKN2A* oraz odcinka 3'UTR; Zdenaturowane produkty PCR rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym w obecności buforu 1X TBE ścieżki 1-12: numery preparatów, strzałkami zaznaczono przykładowe prążki o zmienionym wzorze migracji; c) exon 2b; d) exon 2c; e) exon 3; f) 3'UTR fragment 2; g) 3'UTR fragment 3; h) 3'UTR fragment 4.

W wyniku przeprowadzonych analiz wykryto 62 polimorfizmy 500C>G w odcinku 3'UTR oraz 7 polimorfizmów 148Ala/Thr w exonie 2. W 5 przypadkach wystąpiły obie zmiany jednocześnie (500C>G oraz 148Ala/Thr). Nie wykryto zmian 540C>T w odcinku 3'UTR. Nie stwierdzono mutacji w odcinkach kodujących genu *CDKN2A*. Nie poddawano analizie regionu 5'UTR. U pacjentów, którzy oprócz czerniaka chorowali także na raka piersi (5 pacjentów) oraz u tych, którzy wykazywali raka piersi jako nowotwór występujący w rodzinie, wykonano analizę genu *BRCA1* w kierunku trzech najczęściej występujących mutacji w populacji polskiej. Nie znaleziono żadnych zmian.

#### 4.1.3. Korelacja wykrytych zmian genetycznych z parametrami klinicznymi

Polimorfizm 500C>G wykryto u 9 pacjentów podających zachorowania na inne nowotwory w rodzinie jednak nie wykazano korelacji wystąpienia tego polimorfizmu z typem nowotworu. Zmiana 148Ala/Thr wystąpiła tylko u jednego pacjenta z zachorowaniem na raka w rodzinie, równocześnie z polimorfizmem 500C>G.

Polimorfizm 500C>G znaleziono u 26 żyjących i 37 zmarłych osób. Wykazano korelację pomiędzy wystąpieniem zmiany 500C>G a odsetkiem zgonów ( $P=0,0252$ ) oraz korelację pomiędzy wystąpieniem zmian 500C>G oraz 148Ala/Thr a odsetkiem zgonów ( $P=0,0509$ ). Nie wykazano korelacji pomiędzy wystąpieniem polimorfizmu 148Ala/Thr a odsetkiem zgonów. Wyniki zebrano w Tab.6.

Tab.6. Korelacja pomiędzy wystąpieniem zmian 500C>G i 148Ala/Thr a liczbą zgonów i przeżyć.

Zmienna	0 (zgon)	1 (przeżycie)	P (wartość)
500C>G	37	26	Chi <sup>2</sup> <b>P=0,0252<sup>a</sup></b>
	95	127	Fisher <b>P=0,0181<sup>a</sup></b>
500C>G+148Ala/Thr	37	28	Chi <sup>2</sup> <b>P=0,0509<sup>a</sup></b>
	95	125	Fisher <b>P=0,0352<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup> – statystycznie znamienne

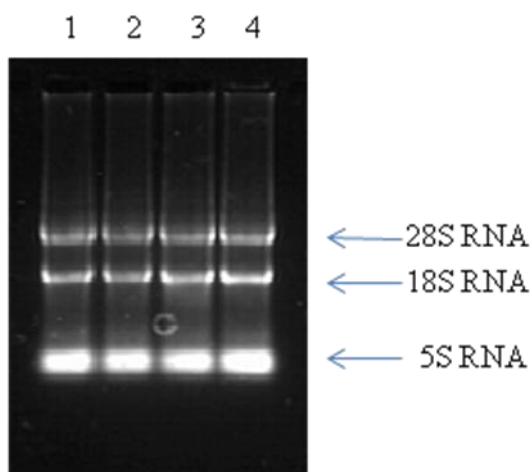
Średnia wieku w chwili postawienia diagnozy wynosiła 47 lat, a dla nosicieli polimorfizmu 500C>G wynosiła 50 lat. Nie wykazano jednak korelacji pomiędzy wiekiem zachorowania i nosicielstwem polimorfizmu 500C>G ( $P=0,5984$ ) oraz polimorfizmu 148Ala/Thr ( $P=0,2358$ ).

Ze względu na heterogenność badanej grupy analiza całkowitych czasów przeżycia dla pacjentów z polimorfizmami 500C>G lub 148Ala/Thr oraz dla pacjentów bez polimorfizmów, nie została przeprowadzona.

## 4.2. Analiza funkcjonalna

### 4.2.1. Konstrukcja wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR genu *CDKN2A*.

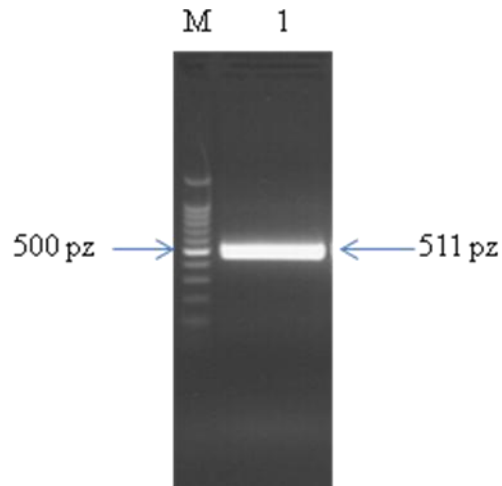
Pierwszym etapem badań prowadzących do analizy funkcjonalnej zmian sekwencyjnych w odcinku 3'UTR genu *CDKN2A* było przygotowanie wektorów z poszczególnymi wariantami sekwencyjnymi 3'UTR. W tym celu z limfocytów krwi obwodowej zdrowej osoby wyizolowano RNA, który posłużył jako materiał wyjściowy do syntezy cDNA. Stężenie RNA oznaczono spektrofotometrycznie a stopień zanieczyszczenia białkiem obliczono na podstawie stosunku absorbancji  $A_{260}/A_{280}$ . Jakość preparatów oceniono za pomocą rozdziału w 1% żelu agarozowym.



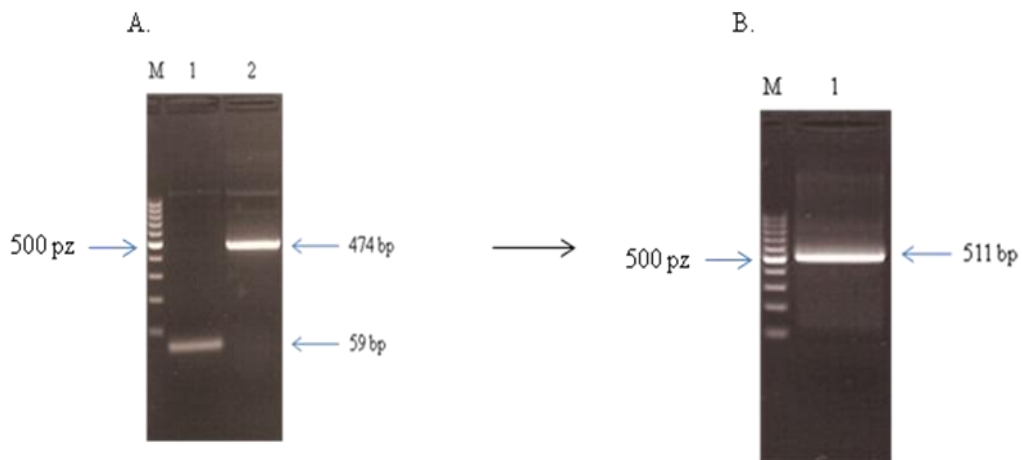
Rys.6. Rozdział elektroforetyczny całkowitego, komórkowego RNA z limfocytów krwi obwodowej dawcy w 1% żelu agarozowym. Ścieżki 1-4: RNA limfocytów krwi.

#### 4.2.1.1. Przygotowanie wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR

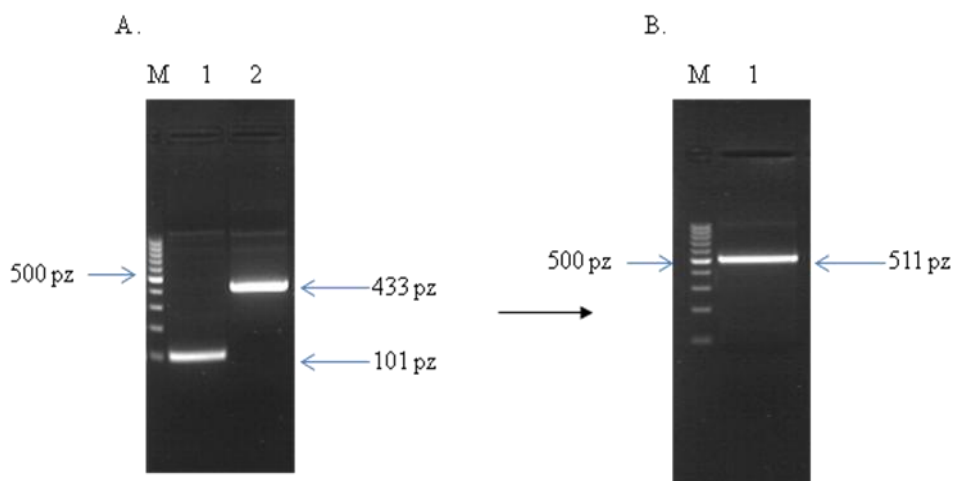
Całkowity RNA przepisano na komplementarny DNA (cDNA), a następnie przeprowadzono reakcję PCR z użyciem odpowiednich par starterów (Tab.2. w pkt.3.2.3). Uzyskano fragmenty 3'UTR o zaplanowanej długości. Wyniki reakcji analizowano w 2% żelu agarozowym, a wielkość produktów oceniano względem markera masy DNA – 100 bp (Rys.7, 8, 9).



Rys. 7. Rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR w 2% żelu agarozowym: M- marker wielkości DNA- 100bp; 1- odcinek 3'UTR-wt.



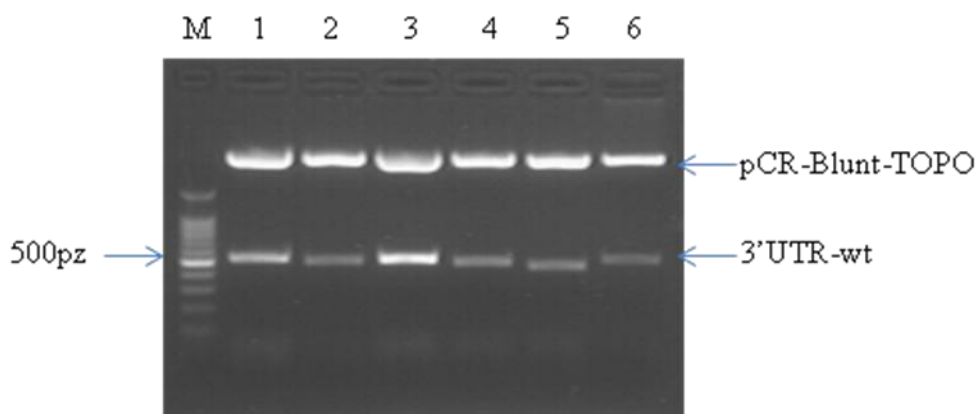
Rys. 8. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w 2% żelu agarozowym: M- marker wielkości DNA- 100bp, A: 1,2- namnożone fragmenty odcinka 3'UTR z wprowadzoną mutacją 500C>G; B: cały odcinek 3'UTR 500C>G.



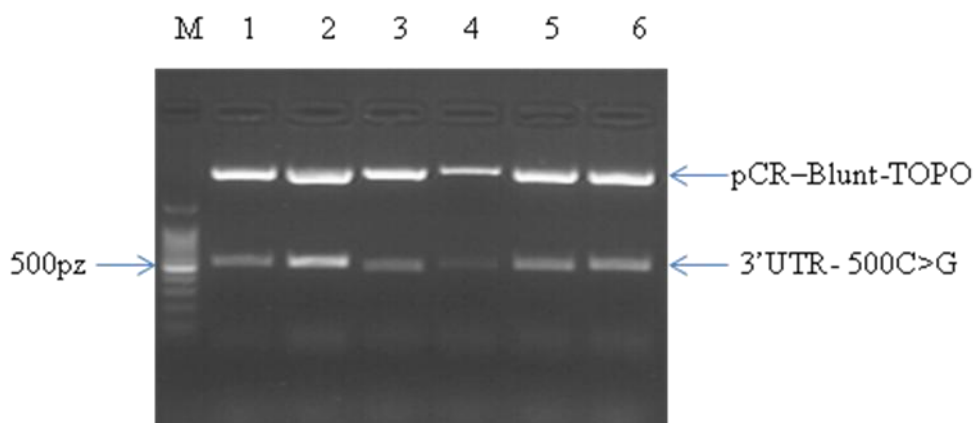
Rys. 9. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w 2% żelu agarozowym: M-marker wielkości DNA -100bp; A:1,2- namnożone fragmenty odcinka 3'UTR z wprowadzoną mutacją 540C>T; B: cały odcinek 3'UTR 540C>T

#### 4.2.1.2. Przygotowanie wektora transferowego pCR-Blunt-TOPO- 3'UTR

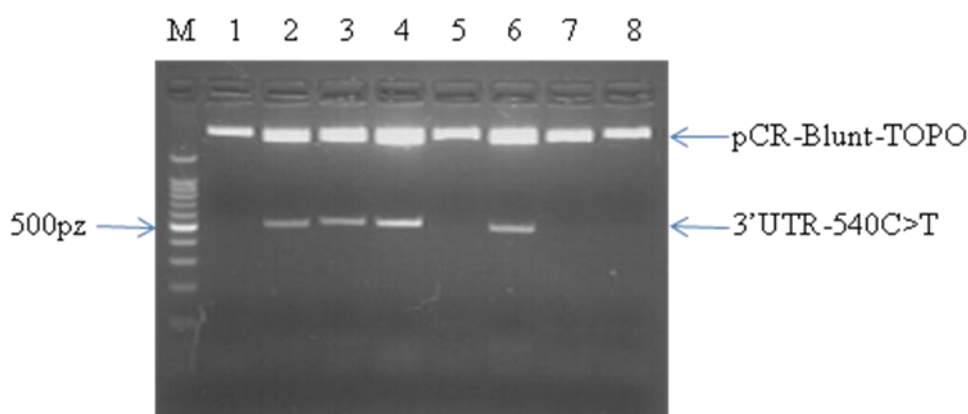
Wykorzystując plazmid pCR-Blunt II-TOPO jako wektor przejściowy otrzymano wszystkie trzy formy odcinka 3'UTR zakończone na lepko z odpowiednio zaprojektowanymi miejscami restrykcyjnymi (XbaI i BamHI), umożliwiającymi utworzenie konstruktyw docelowych w plazmidzie phRL-CMV.



Rys. 10. Analiza restrykcyjna wybranych klonów bakteryjnych. Rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym konstruktu pCR-Blunt-TOPO 3'UTR-wt; M-marker wielkości DNA 100bp; Tory 1-6 – klony pozytywne.



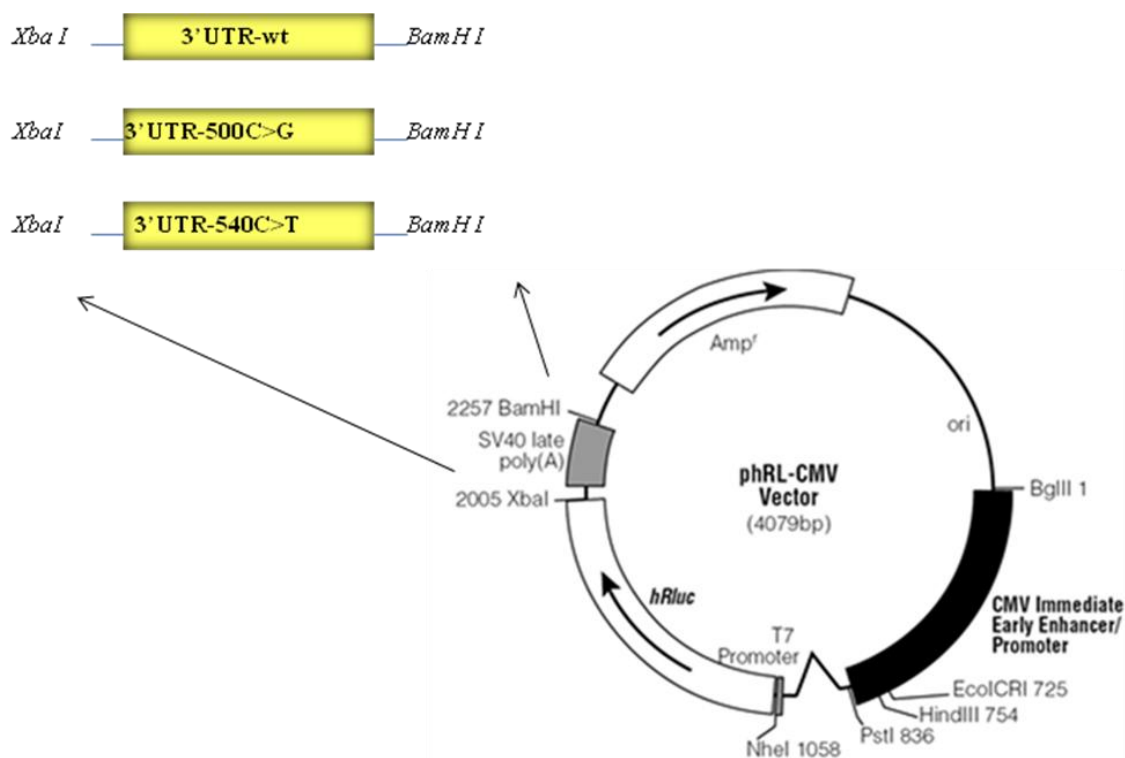
Rys. 11. Analiza restrykcyjna wybranych klonów bakteryjnych. Rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym konstruktu **pCR-Blunt-TOPO 3'UTR-500C>G**; M-marker wielkości DNA 100bp; Tory 1-6 – klony pozytywne.



Rys. 12. Analiza restrykcyjna wybranych klonów bakteryjnych. Rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym konstruktu **pCR-Blunt-TOPO 3'UTR-540C>T**; M-marker wielkości DNA 100bp; Tory 2,3,4,6 – klony pozytywne; tory 1,5,7,8 – klony zawierające plazmid pCR-Blunt-TOPO bez insertu.

#### 4.2.2. Przygotowanie wariantów sekwencyjnych konstruktu **phRL-CMV-3'UTR**

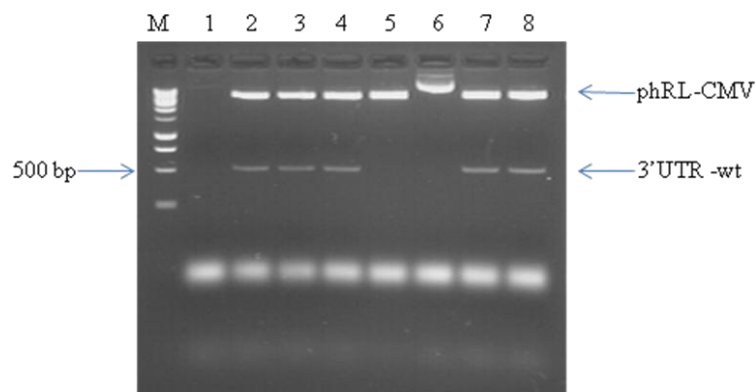
Trawiąc wektor **phRL-CMV** enzymami **XbaI** i **BamHI**, a następnie ligując do niego otrzymane w pkt 4.2.1. formy sekwencyjne odcinka 3'UTR: wt, 500C>G oraz 540C>T, uzyskano wektor **phRL-CMV-3'UTR** z odpowiednim wariantem sekwencyjnym.



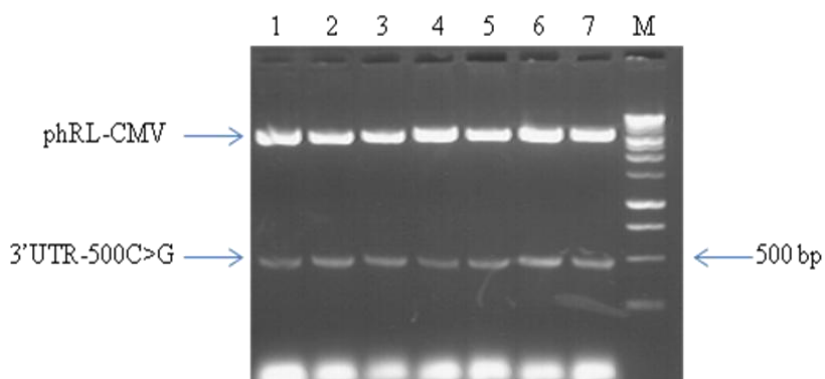
Rys.13. Schemat wektora phRL-CMV z wklonowaną wstawką 3'UTR.

Po transformacji kompetentnych komórek *E.coli* DH5 $\alpha$  mieszaniną ligacyjną, w każdym przypadku uzyskano kilkadziesiąt kolonii bakteryjnych. W celu weryfikacji poprawnych konstruktów przeprowadzono analizę restrykcyjną plazmidów wyizolowanych z wybranych kolonii bakteryjnych i oceniono długości otrzymanych fragmentów DNA (Rys.14,15,16) W przypadku każdego wariantu sekwencyjnego wybrano jeden pozytywny klon i namnożono go na dużą skalę.

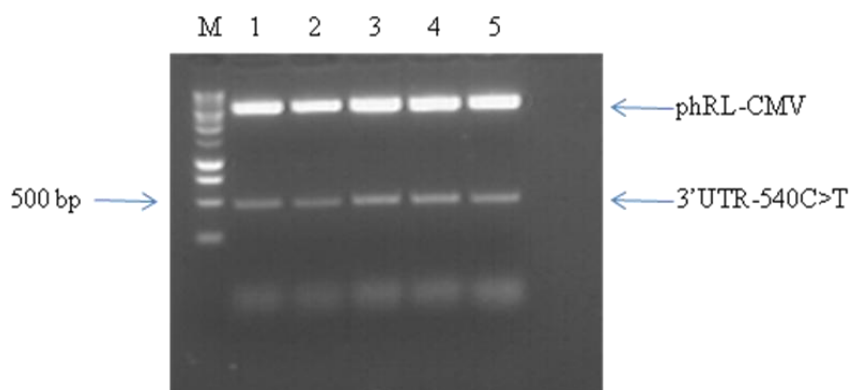




Rys. 14. Analiza restrykcyjna wybranych klonów bakteryjnych. Rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym konstruktu **phRL-CMV 3'UTR- wt**; M-marker wielkości DNA 1kb; Tory 2,3,4,7,8- klony pozytywne; tor 5 i 6-klony zawierające plamid phRL-CMV bez insertu; tor 1-kontrola negatywna.

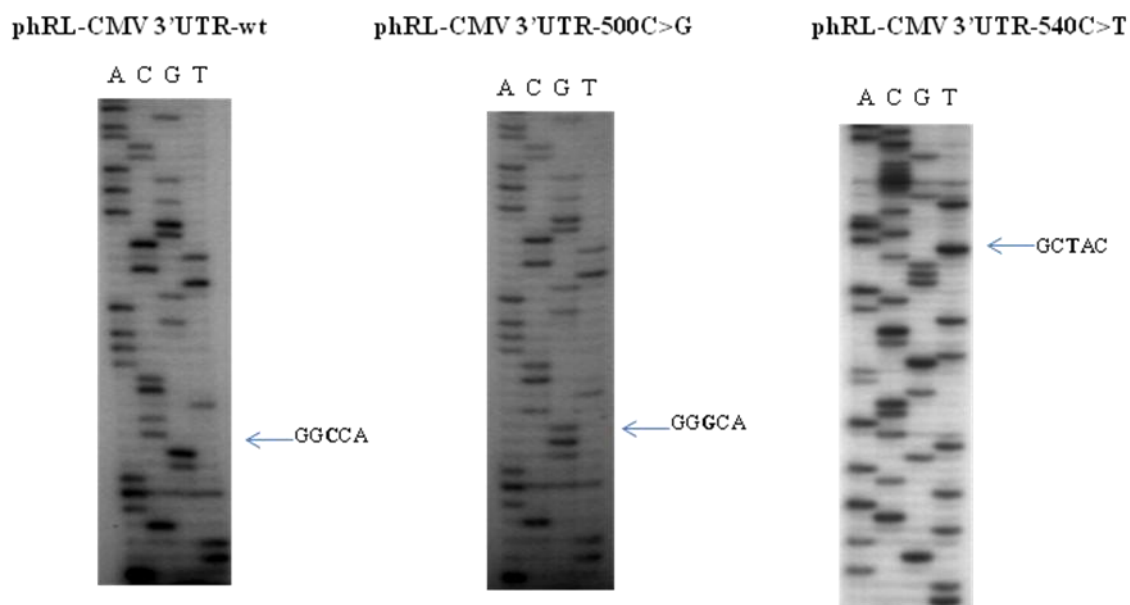


Rys. 15. Analiza restrykcyjna wybranych klonów bakteryjnych. Rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym konstruktu **phRL-CMV 3'UTR-500C>G**; M-marker wielkości DNA 1kb; tory 1-7- klony pozytywne.



Rys. 16. Analiza restrykcyjna wybranych klonów bakteryjnych. Rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym konstruktu **phRL-CMV 3'UTR-540C>T**; M-marker wielkości DNA 1kb; tory 1-5- klony pozytywne.

Poprawność przeprowadzonej mutagenazy konstruktów 3'UTR analizowano poprzez sekwencjonowanie metodą cykliczną (modyfikacja enzymatycznej metody Sanger). Na przedstawionych na Rys. 17. autoradiogramach pokazano wyniki tej reakcji dla poszczególnych wariantów odcinka 3'UTR.



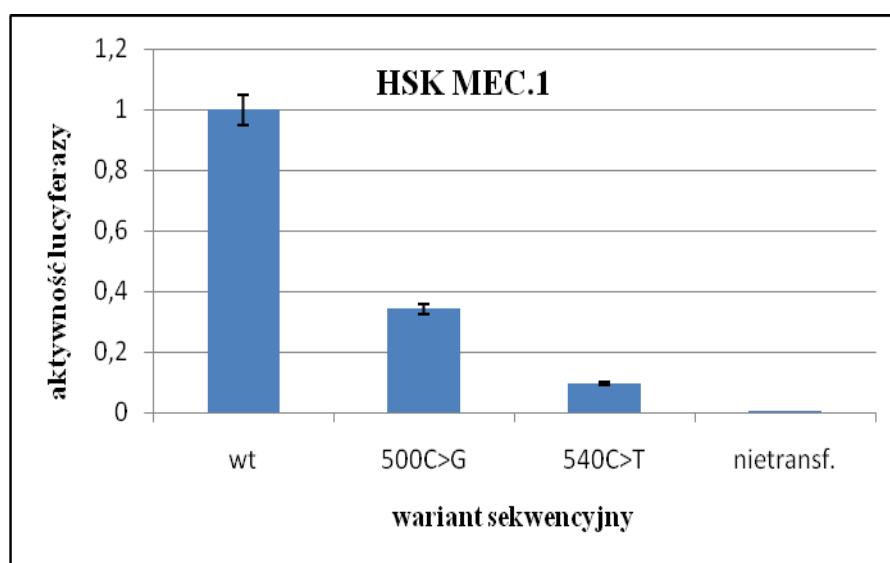
Rys. 17. Sekwencjonowanie phRL-CMV 3'UTR (wt,500C>G i 540C>T) metodą cykliczną. Rozdział produktów sekwencjonowania przeprowadzono w 6% żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 7.5M mocznika. A-adenina, C-cytozyna, G-guanina, T-tymina. Strzałkami zaznaczono miejsca wprowadzonych mutacji.

#### 4.2.3. Analiza ekspresji wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR genu *CDKN2A*

Linie komórkowe Mich-2, MeWo, WM35, WM902B oraz Hsk MEC.1 transfekowano wektorem reporterowym phRL-CMV zawierającym gen lucyferazy oraz odpowiedni wariant sekwencyjny odcinka 3'UTR. W pierwszej kolejności przeprowadzono wstępny eksperyment, który pozwolił określić optymalną proporcję odczynnika FuGene HD do ilości plazmidowego DNA. Dla komórek HSK MEC.1 oraz WM 902B stosunek ten wynosił 4:2, dla komórek MeWo, WM35 oraz Mich-2 – 5:2. Następnie, wykorzystując ustalony doświadczalnie stosunek FuGeneHD: plazmidowy DNA, przeprowadzono transfekcje komórek. Poziom ekspresji fragmentu 3'UTR z odpowiednim wariantem sekwencyjnym określono na podstawie intensywności

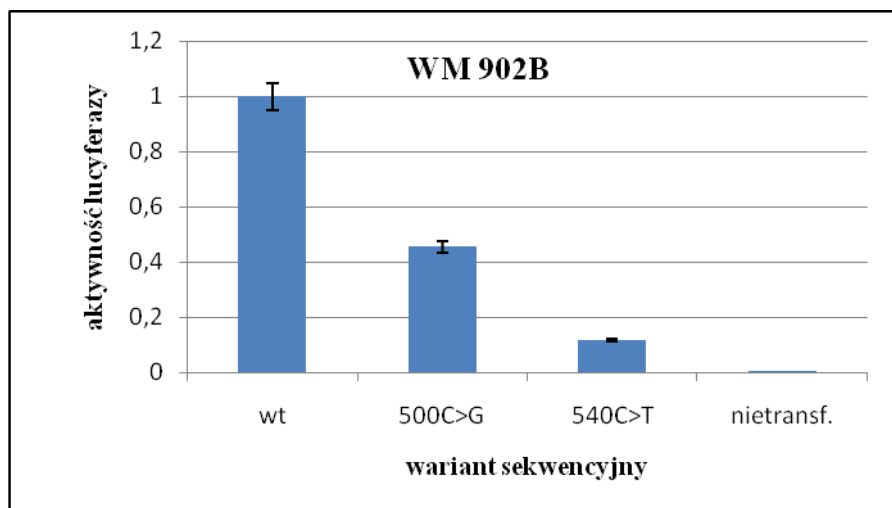
luminescencji emitowanej przez lucyferazę *Renilla*. Wyniki stanowią średnią z trzykrotnie powtórzonych doświadczeń.

W doświadczeniach analizujących wpływ wariantu sekwencyjnego na poziom ekspresji genu reporterowego, wartość luminescencji emitowaną przez komórki transfekowane wariantem 3'UTR-wt przyrównano do 1.



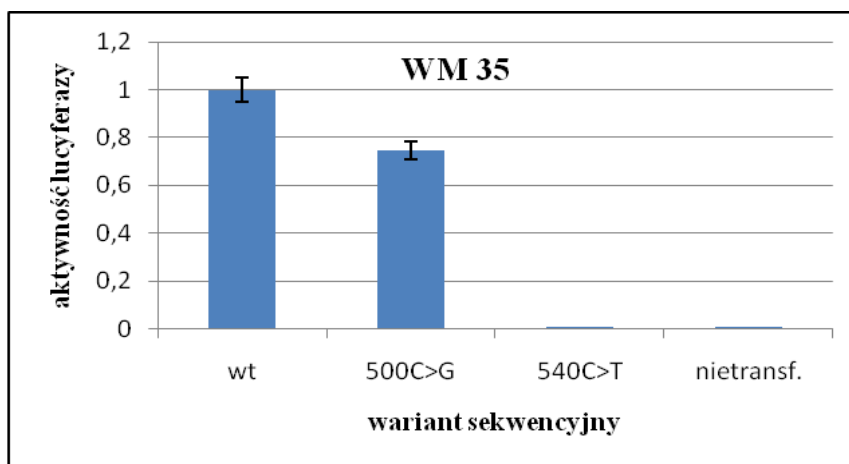
Rys. 18. Wpływ wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR na poziom aktywności lucyferazy w komórkach HSK MEC.1

W przypadku linii komórkowej HSK MEC.1, dla wariantu 3'UTR-500C>G zaobserwowano 2.9 razy niższą ekspresję białka reporterowego w stosunku do wariantu 3'UTR-wt ( $P=0.0149$ ) oraz 10 razy niższą ekspresję dla wariantu 3'UTR-540C>T ( $P=0.0006$ ). Różnice te były istotne statystycznie.



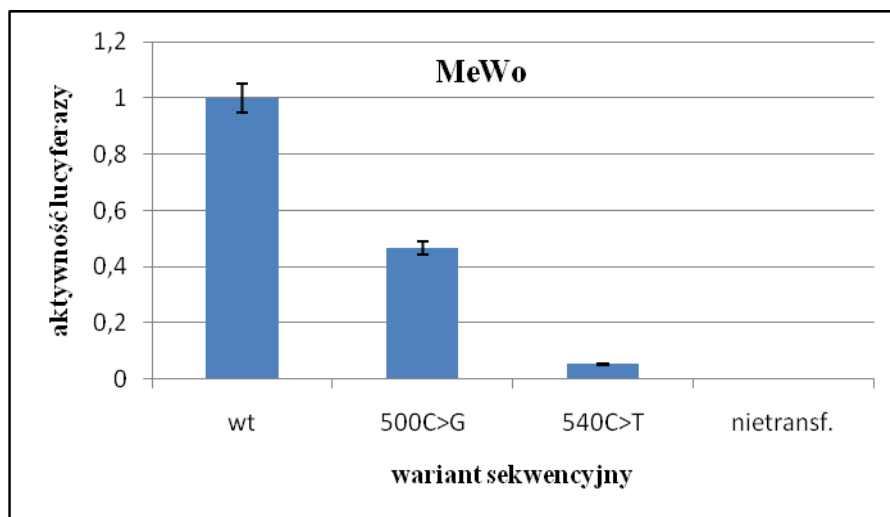
Rys. 19. Wpływ wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR na poziom aktywności lucyferazy w komórkach WM 902B

Dla linii komórkowej WM 902B zaobserwowano 2.2 razy niższą aktywność lucyferazy dla wariantu 3'UTR-500C>G w stosunku do wariantu 3'UTR-wt ( $P=0.1690$ ) oraz 8.6 razy niższą aktywność dla wariantu 3'UTR-540C>T ( $P=0.0013$ ) i różnica ta była istotna statystycznie.



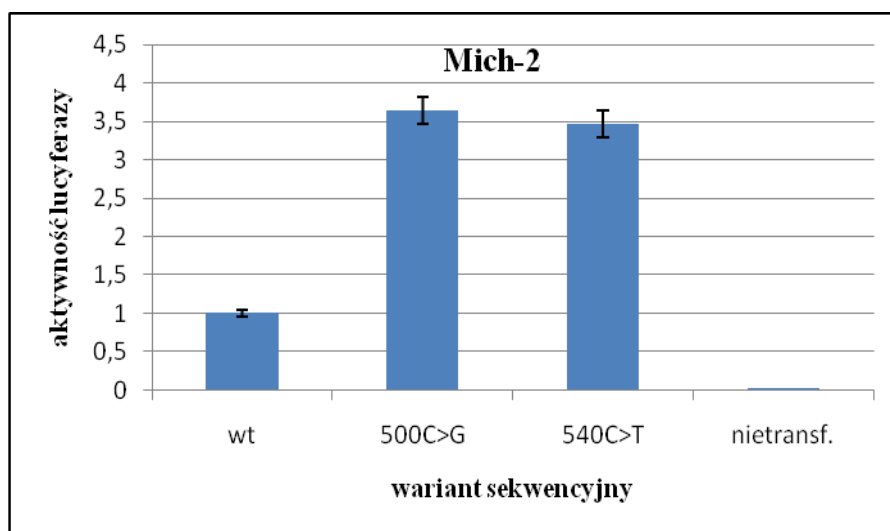
Rys. 20. Wpływ wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR na poziom aktywności lucyferazy w komórkach WM 35

Dla linii komórkowej WM 35 stwierdzono 1.3 razy niższą aktywność lucyferazy dla wariantu 3'UTR-500C>G w stosunku do wariantu 3'UTR-wt ( $P=0.1690$ ) oraz 4000 razy niższą aktywność dla wariantu 3'UTR-540C>T ( $P=0.0001$ ). Różnica ta była istotna statystycznie.



Rys. 21. Wpływ wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR na poziom aktywności lucyferazy w komórkach MeWo

Dla linii komórkowej MeWo stwierdzono 2.1 razy niższą ekspresję białka reporterowego dla wariantu 3'UTR-500C>G w stosunku do wariantu 3'UTR-wt ( $P=0.1850$ ) oraz 18.3 razy niższą ekspresję dla wariantu 3'UTR-540C>T ( $P=0.0014$ ) i wynik ten był istotny statystycznie.



Rys. 22. Wpływ wariantów sekwencyjnych odcinka 3'UTR na poziom aktywności lucyferazy w komórkach Mich2.

W przypadku linii komórkowej Mich-2, dla wariantu 3'UTR-500C>G zanotowano 2.6 razy większą ( $P=0.3499$ ), a dla 3'UTR-540C>T – 2.4 razy większą aktywność lucyferazy w odniesieniu do wariantu 3'UTR-wt ( $P=0.3854$ ).

## 5. DYSKUSJA

Czerniak jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych. Charakteryzuje się szybkim wzrostem, tworzeniem wczesnych i licznych przerzutów oraz opornością na leczenie. Jest także jednym z nowotworów najmniej scharakteryzowanym na poziomie molekularnym. Rozwój tego nowotworu jest wynikiem wzajemnego oddziaływania szkodliwych czynników egzogennych oraz zmian endogennych. Najważniejszym czynnikiem środowiskowym warunkującym rozwój czerniaka jest ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (von Thaler AK i wsp. 2010; Rass K. i wsp. 2008; Jhappan Ch. I wsp. 2003), głównie promieniowanie UVB. Szczególnie niebezpieczne wydają się być poparzenia słoneczne w dzieciństwie (Dennis L.K., i wsp. 2008). W przypadku gdy nadmierna ekspozycja na promienie UV wiąże się z innymi czynnikami ryzyka, takimi jak zachorowanie na czerniaka w rodzinie, jasna cera, tendencja do oparzeń słonecznych czy obecność licznych atypowych zmian – ryzyko zachorowania wyraźnie wzrasta (Chaudru V. i wsp. 2004; Tucker M.A. i wsp. 2003). Czynnikiem endogennym jest predyspozycja genetyczna a jej rola w powstaniu czerniaka jest niepodważalna.

Badania nad genetyką czerniaka są przedmiotem intensywnych badań prowadzonych od wielu lat przez różne ośrodki na świecie. I choć nie przyniosły do tej pory w pełni zadowalających wyników to bezsprzecznie udowodniono, że niektóre geny odgrywają ważną rolę w etiologii tego nowotworu. Dokładne poznanie mechanizmów rozwoju czerniaka mogłoby się przyczynić do powstania nowych strategii leczenia. Przełomem w badaniach nad genetyką czerniaka było odkrycie przez badaczy w Utah w 1994 roku, u osób z rodzinną postacią czerniaka, mutacji w genie *CDKN2A* zlokalizowanym na chromosomie 9p21 (Hussussian J.P. i wsp. 1994). W wyniku ekspresji tego genu oraz alternatywnego splicingu dochodzi do powstania transkryptów, które kodują białka o kluczowej roli dla regulacji cyklu komórkowego. Białko p16 jest inhibitorem kinaz cyklino-zależnych CDK4/CDK6, które odpowiadają za fosforylację białek Rb i kontrolują przejście komórki z fazy G1 do fazy S cyklu, natomiast białko p14ARF działając poprzez inhibicję mdm-2 wpływa na stabilizację poziomu białka p53 (Li W. i wsp. 2006). W procesie inicjacji i progresji choroby nowotworowej znaczącą rolę odgrywa nieprawidłowe funkcjonowanie białek regulatorowych cyklu komórkowego (zwłaszcza fazy G1), apoptozy i melanogenezy

(Czajkowski R. i wsp. 2009). W głównej mierze białko p16 inaktywowane jest poprzez mutacje punktowe, delecje większych fragmentów oraz hipermetylacje w promotorze (Bennett D.C. 2008). Gen *CDKN2A* jest jednym z pierwszych genów dokładnie analizowanych w poprzedniej dekadzie, ze względu na wysoki (90%) procent mutacji znajdujących w liniach czerniakowych (Gray-Schopfer V.C. i wsp. 2005). Mutacje somatyczne znajdują się w różnym odsetku przypadków i dotyczą zarówno czerniaków sporadycznych (Cachia A.R. i wsp. 2000) jak i dziedzicznych (Hussussian C.J. i wsp. 1994). Zmiany dziedziczne odgrywają rolę w rozwoju ok. 10% przypadków czerniaka (Berwick M. i wsp. 2006; Lukowsky A. i wsp. 2007), a zakres częstości wykrywanych zmian wynosi od 0-50% i zależy od badanej populacji oraz lokalizacji geograficznej (Palmieri G. i wsp. 2009). Zwiększone ryzyko zachorowania na czerniaka u nosicieli tych mutacji, a także rodzinna agregacja tego nowotworu potwierdza sugestie, że predyspozycja genetyczna jest niezwykle istotnym czynnikiem uczestniczącym w patogenezie czerniaka (Dębniak T. i wsp. 2008). Najlepszym przykładem znaczenia zmian dziedzicznych jest rozwój czerniaka w tym samym wieku i tej samej lokalizacji u bliźniąt monozygotycznych (St-Arneault G. i wsp. 1970). Identyfikacja mutacji może mieć znaczenie w badaniu predyspozycji rodzinnych do zachorowania, w diagnostyce i rokowaniu, a w przyszłości nawet wpływ na wybór terapii (Nathanson K.L. 2010).

Mutacje w genie *CDKN2A* i ich udokumentowany wpływ na białko p16 i p14ARF są szeroko opisywane w literaturze. Najczęściej mutacje związane z chorobą występują w exonie 1 $\alpha$  oraz exonie 2 wpływając na białko p16 (Damm Meyle K. i wsp. 2009). Większość mutacji występujących w exonie 2 (wspólnym dla obu transkryptów) zdaje się nie mieć wpływu na białko p14ARF (Arap W. i wsp. 1997). W ostatnich latach opisano jednak mutacje w exonie 1 $\beta$  genu *CDKN2A*, które mają wpływ tylko na ten transkrypt (p14ARF). Mutacje te to: delecja występująca rodzinie z czerniakiem i rakiem układu nerwowego (Randerson-Moor J.A. i wsp. 2001), insercja 16 par zasad znaleziona u kobiety z czerniakiem pierwotnym (Rizos H. i wsp. 2001), oraz mutacje w miejscach donorowych splicingu (Harland M. i wsp. 2005).

W regionie 5'UTR genu *CDKN2A* jak dotąd znaleziono tylko jedną mutację (-34G>T) o udowodnionym wpływie na białko p16, powodującą powstanie alternatywnego miejsca startu translacji AUG. Mutacja ta ogranicza ilość prawidłowego białka p16 do wartości nieprzekraczającej progowego stężenia w komórce, które jest niezbędne do utrzymania jego aktywności jako supresora nowotworzenia (Liu L. i

wsp.1999). Grupa badaczy z Włoch (Bisio A. i wsp. 2010) przeprowadzając analizę funkcjonalną szeregu zmian w sekwencji 5'UTR zaproponowała kolejną mutację, -21C>T, która może predysponować do zachorowania na czerniaka i segreguje się z chorobą. Natomiast inne analizowane zmiany, c-25C>T, c-180G>A oraz c-56G>T, których nie obserwowano u grupy kontrolnej, wymagają dalszych badań i potwierdzenia potencjalnego wpływu na zachorowanie na czerniaka. W Polsce analizowano zmianę -493A>T w promotorze genu *CDKN2A*. Zmiana ta pozostaje w całkowitej nierównowadze sprzężeń z polimorfizmem 148Ala/Thr w exonie 2 o udowodnionym i opisanym związku ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na czerniaka (Dębniak T. i wsp. 2005). Badania, przeprowadzane przez nas w Zakładzie Immunologii Nowotworów nie zakładały analizy fragmentu 5'UTR.

W populacji polskiej mutacje dziedziczne w genie *CDKN2A* są niezwykle rzadkie, natomiast z większą częstością u chorych na czerniaka w porównaniu z populacją osób zdrowych, wykrywane są polimorfizmy. Ich ewentualny wpływ na funkcjonowanie transkryptu p16 i p14ARF jest przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków badawczych.. Do najczęściej opisywanych polimorfizmów w części kodującej genu *CDKN2A* należy zmiana 148Ala/Thr w exonie 2 genu *CDKN2A*. W latach '90 przyjęto założenie, że zmiana 148Ala/Thr jest polimorfizmem i nie wpływa na funkcję białka p16 (Honrado E. i wsp. 2006; Sun C.C. i wsp. 1996). Inne badania wykazały że zmiana ta współistniejąc z mutacją w promotorze genu *CDKN2A* w miejscu -493 może wpływać na ekspresję tego genu (Tischkowitz M.D. i wsp. 2006; Lakhani S.R. 1999). Próby udowodnienia związku występowania polimorfizmu 148Ala/Thr ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka, prowadzone są nieustannie w laboratoriach na całym świecie. Udział zmiany 148Ala/Thr w kancerogenezie jest różny dla różnych populacji. Podczas badań prowadzonych w Niemczech zidentyfikowano 8 polimorfizmów 148Ala/Thr wśród 40 pacjentów chorych na czerniaka i wykazujących zachorowanie na ten nowotwór w rodzinie. Częstość występowania tego polimorfizmu w populacji niemieckiej nie odbiegała od innych badanych populacji europejskich. i odgrywa drugorzędą rolę w patogenezie czerniaka (Lukowsky A. i wsp. 2008). W Hiszpanii polimorfizm 148Ala/Thr występuje zdecydowanie częściej u pacjentów chorych na czerniaka w stosunku do grupy kontrolnej i predysponuje do zachorowania na ten typ nowotworu. Występuje on też w nierównowadze sprzężeń wraz z polimorfizmem 500C>G w regionie 3'UTR genu *CDKN2A* (Puig S. i wsp. 2005). Również w populacji Łotewskiej częstość występowania polimorfizmu 148Ala/Thr jest znamienne wyższa u



chorych na czerniaka, jednak przeprowadzone analizy haplotypu nie wskazały na związek tego polimorfizmu ze zwiększonym ryzykiem do zachorowania na czerniaka (Pjanova D. i wsp. 2007). W populacji polskiej badania wykonane na dużej grupie chorych wykazały częstsze występowanie polimorfizmu 148Ala/Thr (3%-3.5%) w grupie chorych na czerniaka w stosunku do grupy kontrolnej. Polimorfizm ten związany jest ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na czerniaka (Dębniak T. i wsp. 2005).

W literaturze opisywana jest segregacja czerniaka z rakiem piersi. Istnieje przekonanie, że istotnym czynnikiem ryzyka zachorowania zarówno na czerniaka jak i raka piersi jest predyspozycja genetyczna i występowanie nowotworów w rodzinie (Collaborative Group on Hormonal Factors In Breast Cancers 2001; Gandini S. i wsp. 2005). Badania epidemiologiczne wskazują na genetyczny związek pomiędzy rakiem piersi a czerniakiem (Goggins W. i wsp. 2004). Wyniki tych badań sugerują, że nosiciele mutacji w genie *BRCA2* mają zwiększone ryzyko zachorowania na czerniaka podczas gdy mutacje w genie *CDKN2A* predysponują do zachorowania na raka piersi (Borg A. i wsp. 2000). W populacji polskiej związek pomiędzy występowaniem polimorfizmów w *CDKN2A* i rakiem piersi też został potwierdzony Polimorfizm 148Ala/Thr, który związany jest ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na czerniaka, występuje częściej u pacjentów chorych na raka piersi. Asocjacja ta jest szczególnie widoczna w przypadku wczesnego zachorowania na raka piersi - poniżej 30 roku życia (Dębniak T. i wsp. 2005). Po wykonaniu analiz, również potwierdziliśmy współistnienie czerniaka z rakiem piersi u tego samego pacjenta (5 przypadków). Wykazaliśmy istotną korelację występowania polimorfizmu 148Ala/Thr u pacjentów z rakiem piersi i czerniakiem jednocześnie. Pacjentom tym oprócz analizy genu *CDKN2A* wykonano dodatkowo analizę genu *BRCA1* w kierunku trzech najczęściej występujących mutacji w populacji polskiej, nie znaleziono jednak żadnych zmian w obu genach. Może to sugerować, że oba te nowotwory mają inną etiologię genetyczną, a ich współistnienie u jednej osoby wydaje się być wypadkową działania mutacji w genach niskiej penetracji oraz czynników środowiskowych (Nagore E. i wsp. 2009).

Podjmuje się próby korelacji występowania polimorfizmu 148Ala/Thr z klinicznymi parametrami czerniaka. Sugeruje się, że nosicielstwo tego polimorfizmu znacznie zwiększa ryzyko zachorowania u ludzi poniżej 50 roku życia oraz występuje częściej u pacjentów z MPM (Dębniak T. i wsp. 2005; Hashemi J. i wsp. 2000).

W trakcie badań wykonanych w Zakładzie Immunologii Nowotworów nie wykazano korelacji pomiędzy nosicielstwem polimorfizmu 148Ala/Thr a wiekiem zachorowania.

Zwrócono szczególną uwagę na współistnienie czerniaka z innymi nowotworami, najczęściej z rakiem trzustki (Parker J.I. i wsp. 2003), nowotworami centralnego układu nerwowego (Kaufmann D.K. i wsp. 1993), rakiem piersi (Goggins W. i wsp. 2004; Anderson H. i wsp. 2000). Istnieje wiele doniesień sugerujących, opisywanych już wcześniej, że ryzyko zachorowania na nowotwory układu nerwowego zwiększone jest mutacjami w exonie 1 $\beta$  genu *CDKN2A*, skutkującymi zaburzeniami funkcji białka p14ARF (Goldstein A.M. i wsp. 2006). W populacji polskiej zauważono asocjację pomiędzy obecnością zmiany 148Ala/Thr a czerniakiem (Dębniak T. i wsp. 2005), rakiem piersi (Nagore E. i wsp. 2008) i rakiem płuc (Dębniak T. i wsp. 2006). Podczas przeprowadzonych przez nas badań prawie 21% pacjentów wskazało na występowanie nowotworów w rodzinie. W naszym przypadku najczęściej pojawiał się rak płuc - w 17 rodzinach, czerniak - w 14 rodzinach i rak żołądka w 9 przypadkach. Nie zaobserwowaliśmy korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmu 148Ala/Thr a występowaniem nowotworu w rodzinie, gdyż taką zmianę znaleźliśmy tylko u jednego pacjenta z wywiadem nowotworowym w rodzinie..

Pomimo przypisywania istotnej roli zmianom w genie *CDKN2A* w przypadkach dziedzicznej predyspozycji do zachorowania na czerniaka, znaleziono stosunkowo niewiele mutacji w odcinkach kodujących tego genu. Zmiany takie znaleziono we Francji (Soufir N. i wsp. 1998), USA (FitzGerald M.G. i wsp. 1996), Australii (Walker G.J. i wsp. 1995), Danii (Gruis N.A. i wsp. 1995), Szwecji (Platz A. i wsp. 1997), Anglii (Harland M. i wsp. 1997) i we Włoszech (Ciotti P. i wsp. 1996), a częstość ich występowania wahała się od 6-48%. Tak duża rozpiętość może być spowodowana różnym stopniem narażenia na promieniowanie ultrafioletowe. W populacji polskiej nie stwierdzono dziedzicznej mutacji patogenicznej. Wydaje się zatem, że mutacje w tym genie nie odgrywają w naszej populacji żadnej roli w genetycznej predyspozycji do zachorowania na czerniaka (Lamperska K. i wsp. 2002; Dębniak T. i wsp. 2005). W związku z powyższym, w wielu ośrodkach na świecie, także w Polsce, zwrócono uwagę na sekwencje kwasów nukleinowych, które nie kodują bezpośrednio sekwencji białek, a które regulują ekspresję materiału genetycznego np.: promotory, enhancery, region 5'UTR, sekwencje intronowe, miejsca składania (splicingu) i region 3'UTR. Zwrócenie uwagi na istotną rolę struktury mRNA w ekspresji materiału genetycznego podyktowane jest, z jednej strony, znakomitym w ostatnich czasach postępem badań strukturalnych, a z drugiej, zmianą spojrzenia na RNA. Wymienione struktury wraz z licznymi elementami regulatorowymi wpływają na przebieg i wydajność translacji.

Jednak w potranskrypcyjnej regulacji to głównie regiony 5'UTR i 3'UTR odgrywają czołową rolę. Regiony te wpływają na procesy komórkowe poprzez wiązanie czynników białkowych, co jest uwarunkowane nie tylko sekwencją, ale również drugorzędową strukturą przestrzenną (Kwinta Ł. 2008). Wszelkie zmiany w obrębie tych regionów prowadzą do istotnych modyfikacji w przebiegu translacji i co się z tym wiąże, mogą prowadzić do rozwoju wielu chorób (Chatterjee S. i wsp. 2009).

3'UTR to nieulegająca translacji część mRNA położona w kierunku 3' od sekwencji kodującej. Odgrywa niezwykle istotną rolę w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu (Lopez de Silanes I. i wsp. 2007; Moore M.J. 2005). Mutacje w obrębie kodonu terminacji translacji, sygnału poliadenylacji czy struktury drugorzędowej mogą mieć ogromny wpływ na czas półtrwania cząsteczki mRNA (stabilność), kierowanie lokalizacją mRNA w obrębie komórki oraz na wydajność translacji (Moore M.J. 2005). Zaburzenia w którymkolwiek z tych ważnych procesów mogą doprowadzić do powstania szeregu chorób, w tym do rozwoju nowotworów (Venables J.P. i wsp. 2006; Audic Y. i wsp. 2004; Bassell G.J. i wsp. 2004; Fairbrother W.G. i wsp. 2002; Mandell J.T. i wsp. 2001). Poszukiwania mutacji w wyżej opisanych regionach doprowadziły do zidentyfikowania kilku zmian w populacji brytyjskiej i australijskiej, segregujących się z chorobą oraz predysponujących do zachorowania na czerniaka (Liu L. i wsp. 1999; Harland M. i wsp. 2005). Jednak do najczęściej opisywanych zmian w regionach niekodujących genu *CDKN2A*, podejrzewanych o wpływ na ryzyko zachorowania (Kumar R. i wsp. 2001) oraz progresję choroby (Straume O. i wsp. 2002), należą polimorfizmy 500C>G oraz 540C>T w odcinku 3'UTR. Przypuszcza się, że zmiana 540C>T może wpływać na transport, stabilizację i translację p16 mRNA, a co się z tym wiąże, na funkcjonalność białka p16 oraz p14ARF. Stwierdzono również, że w połączeniu z innym polimorfizmem – 580C>T, wpływa na bardziej agresywny przebieg choroby (Sauroja I. i wsp. 2000). Mimo tych sugestii inne grupy badawcze stwierdziły jednak, że polimorfizmy 500C>G oraz 540C>T wcale nie występują częściej u chorych na czerniaka (Pjanova D. i wsp. 2007; Aitken J. i wsp. 1999). W populacji polskiej występowanie tych dwóch polimorfizmów oraz ustalenie ich roli w powstawaniu i przebiegu choroby wciąż pozostają niejasne. Mimo, że istnieją różne opinie na temat wpływu polimorfizmów i mutacji w genie *CDKN2A* na zachorowanie i przebieg czerniaka (Dęniak T. i wsp. 2005; Lamperska K. i wsp. 2002) to jednak zmiana 500C>G zdecydowanie częściej występuje u chorych na ten nowotwór. Odpowiedź na to pytanie wciąż pozostaje nierozstrzygnięta. W ramach przedstawianej pracy, po

przeprowadzonych analizach grupy chorych na czerniaka, nie stwierdziliśmy zmiany 540C>T w odcinku 3'UTR. Nie wykrycie przez nas tego polimorfizmu może być spowodowane zbyt małą grupą badaną. Nie udało nam się również odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób dokładnie wariant sekwencyjny 500C>G wpływa na czerniaka ale otrzymane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie kilku wniosków. Nie stwierdzono związku pomiędzy wystąpieniem polimorfizmu 500C>G a lokalizacją zmiany pierwotnej i wiekiem zachorowania oraz typem nowotworu występującego w rodzinie pacjenta. Znaleźliśmy korelację pomiędzy wystąpieniem polimorfizmu 500C>G a odsetkiem zgonów, jednak ze względu na zbyt heterogenną grupę badaną, przeprowadzenie analizy całkowitego czasu przeżycia wśród nosicieli tego polimorfizmu nie było możliwe. W dalszym ciągu zatem, związek tych zmian z klinicznym przebiegiem czerniaka pozostaje przedmiotem dyskusji.

Analizując wszystkie doniesienia dotyczące wpływu polimorfizmów 148Ala/Thr, 500C>G i 540C>T na powstawanie, rozwój i kliniczne aspekty czerniaka, zauważamy brak jednoznacznych wyników. Nie wiadomo także, jakiego rodzaju zmiany strukturalne mogą powodować polimorfizmy 500C>G i 540C>T w regionie 3'UTR i jakie konsekwencje dla regulacji ekspresji genu mogą wynikać w związku z ich wystąpieniem. Wiedząc jak wielkie znaczenie ma region 3'UTR dla komórki, postanowiliśmy przeprowadzić analizę funkcjonalną w warunkach *in vitro*, i sprawdzić, czy obecność zmian 500C>G oraz 540C>T w odcinku 3'UTR ma jakikolwiek wpływ na ekspresję materiału genetycznego. Ten niekodujący region mRNA, jest zazwyczaj pomijany i niedoceniany podczas poszukiwań i analizy genów odpowiedzialnych za daną chorobę (Conne B. i wsp. 2000). Należy w tym miejscu podkreślić unikatowość podjętych badań, gdyż w literaturze nie ma doniesień na temat podobnych analiz. Jedynie zespół Bisio A. i wsp. (2010) przeprowadził podobne doświadczenia, jednak jak już zauważono wcześniej, przedmiotem zainteresowań był odcinek 5'UTR genu *CDKN2A*. Eksperyment tej grupy badawczej polegał na pomiarze aktywności białka reporterowego w zależności od mutacji w odcinku 5'UTR. W wyniku przeprowadzonych analiz potwierdził się udział zmiany c-34G>T w predyspozycji do zachorowania na czerniaka, a zmiana (-21C>T) okazała się nową mutacją predysponującą do zachorowania na czerniaka. Przystępując do naszego eksperymentu w pierwszej kolejności skonstruowano odcinki 3'UTR zawierające poszczególne warianty sekwencyjne: formę „dziką” – 3'UTR-wt, 3'UTR-500C>G oraz 3'UTR-540C>T, a następnie wprowadzono do plazmidu pozwalającego na analizę ekspresji

regionu niekodującego. Następnie transfekowano ustalone linie komórkowe czerniaka i oceniano poziom aktywności lucyferazy w poszczególnych przypadkach. W każdym przeprowadzonym eksperymencie zauważono różnice w aktywności białka reporterowego w zależności od badanego wariantu sekwencyjnego. W przypadku trzech linii komórkowych poziom ekspresji genu reporterowego był najwyższy w przypadku wariantu sekwencyjnego odcinka 3'UTR nie zawierającego mutacji (3'UTR-wt). Za to w przypadku linii komórkowej Mich-2, dla wariantu 3'UTR-500C>G zanotowaliśmy 2.6 razy większą, a dla 3'UTR-540C>T, 2.4 razy większą aktywność lucyferazy w odniesieniu do typu dzikiego (3'UTR-wt) co sprawiło, że różnice te uplasowały się na granicy istotności statystycznej. Mimo, że w przypadku jednej linii komórkowej wyniki odbiegały od pozostałych, to i tak można wyciągnąć wniosek, że wymieniane wyżej zmiany sekwencji nukleotydów w odcinku 3'UTR modulują poziom ekspresji białka. Być może w taki sam sposób polimorfizmy wpływają na poziom ekspresji białka p16 w komórkach nowotworowych.

Wiele jest jeszcze niejasności i można przypuszczać, że w najbliższym czasie pojawią się kolejne nowe doniesienia na temat wpływu sekwencji niekodujących na rozwój czerniaka. Prawdopodobnie pozwolą one pełniej zrozumieć patogenezę tego nowotworu i być może doprowadzą do ustalenia uniwersalnego molekularnego szlaku kancerogenezy czerniaka. Umożliwiłyby to w przyszłości opracowanie nowych strategii terapeutycznych lub też testów genetycznych, służących do określenia ryzyka u osób z rodzinną predyspozycją do zachorowania na czerniaka.

## 6. WNIOSKI

1. W wyniku przeprowadzonych analiz genu *CDKN2A* i jego odcinka 3'UTR wykryto 7 polimorfizmów 148Ala/Thr w exonie 2 oraz 62 polimorfizmy 500C>G w odcinku 3'UTR. Zmiany 540C>T nie stwierdzono.
2. Po korelacji otrzymanych wyników z klinicznymi parametrami czerniaka:
  - nie stwierdzono związku pomiędzy wystąpieniem polimorfizmu 500C>G a lokalizacją zmiany pierwotnej, wiekiem zachorowania oraz typem nowotworu występującego w rodzinie pacjenta.
  - występuje korelacja pomiędzy jednoczesnym wystąpieniem polimorfizmu 148Ala/Thr i 500C>G.
  - wykazano korelację między wystąpieniem polimorfizmu 148Ala/Thr u pacjentów jednocześnie z rakiem piersi i czerniakiem.
  - znaleziono korelację pomiędzy wystąpieniem polimorfizmu 500C>G a odsetkiem zgonów
3. Skonstruowano wektory zawierające odcinek 3'UTR genu *CDKN2A* niosące 3 najczęściej występujące warianty sekwencyjne: 500C>G, 540C>T oraz wariant bez polimorfizmu.
4. Po transfekcji linii komórkowych i pomiarach poziomu aktywności lucyferazy stwierdzono, że polimorfizmy w odcinku 3'UTR wpływają na poziom ekspresji genu reporterowego w liniach komórkowych.

## 7. STRESZCZENIE

Etiopatologia czerniaka, podobnie jak innych nowotworów jest wypadkową działania czynników środowiskowych i predyspozycji genetycznych. W wyniku analiz przeprowadzanych w ośrodkach badawczych na całym świecie zidentyfikowano kilka genów, których mutacje lub inaktywacja są przyczyną powstania choroby. Najlepiej poznanym genem jest gen *CDKN2A*, który należy do grupy genów supresorowych i koduje dwa białka: p16 i p14ARF. W Polsce nie znaleziono żadnej dziedzicznej mutacji patogenicznej w genie *CDKN2A*. W związku z powyższym zwrócono szczególną uwagę na polimorfizmy i odcinki nie kodujące sekwencji białek, pełniące bardzo ważną rolę w procesie regulacji ekspresji materiału genetycznego. Do najczęściej opisywanych zmian w regionach niekodujących genu *CDKN2A*, podejrzewanych o wpływ na ryzyko zachorowania i progresję choroby należą polimorfizmy 500C>G oraz 540C>T w odcinku 3'UTR oraz polimorfizm 148Ala/Thr w exonie 2. Wariant ten pojawia się z większą częstością u osób chorych. Wykazano również jego asocjację z rakiem piersi i czerniakiem. Częściej występuje również u osób z mnogimi pierwotnymi ogniskami czerniaka (MPM).

Celem pracy była analiza genu *CDKN2A* u 285 chorych na czerniaka i korelacja otrzymanych wyników z klinicznymi parametrami choroby takimi jak: wiek zachorowania, lokalizacja zmiany pierwotnej, współistnienie drugiego nowotworu, historia zachorowań na nowotwory w rodzinie. W moich badaniach nie stwierdziłam korelacji pomiędzy obecnością polimorfizmu 148Ala/Thr, a występowaniem nowotworu w rodzinie. Wykazano za to korelację między wystąpieniem tego polimorfizmu i obecnością raka piersi i czerniaka jednocześnie u tych samych chorych. Nie znaleziono polimorfizmu 540C>T w grupie badanych chorych. Nie stwierdzono związku pomiędzy wystąpieniem polimorfizmu 500C>G, a lokalizacją zmiany pierwotnej i wiekiem zachorowania oraz typem nowotworu występującego w rodzinie pacjenta. Znaleźliśmy korelację pomiędzy wystąpieniem polimorfizmu 500C>G a liczbą zgonów.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę funkcjonalną w warunkach *in vitro* mającą ocenić, czy obecność polimorfizmów 500C>G oraz 540C>T w odcinku 3'UTR ma wpływ na ekspresję genu *CDKN2A*. W tym celu skonstruowano wektory niosące 3 najczęściej występujące warianty sekwencyjne: 500C>G, 540C>T oraz

wariant bez polimorfizmu. We wszystkich przeprowadzonych eksperymentach zaobserwowano różnice ekspresji genu reporterowego w zależności od wariantu sekwencyjnego 3'UTR.

W przypadku trzech linii czerniakowych i jednej linii kontrolnej poziom aktywności lucyferazy był najwyższy dla wariantu 3'UTR nie zawierającego mutacji (wariant 3'UTR-wt), a na znacznie niższym poziomie prezentowała się aktywność lucyferazy w przypadku wariantu 3'UTR-500C>G. Poziom ekspresji białka (lucyferazy) dla wariantu 3'UTR-540C>T był najniższy. Za to w przypadku linii komórkowej czerniaka Mich-2, wariant 3'UTR-500C>G powodował 2.6 razy wyższą, a wariant 3'UTR-540C>T, 2.4 razy wyższą aktywność lucyferazy w porównaniu z typem dzikim (3'UTR-wt). Przeprowadzone badania funkcjonalne wskazują, że polimorfizmy w odcinku 3'UTR genu *CDKN2A* mają wpływ na poziom ekspresji genu reporterowego, tym samym mogą wpływać na ekspresję genu *CDKN2A* w komórkach czerniaka u chorych.



## 8. SUMMARY

The etiology of cutaneous melanoma, like other cancers, consists of environmental factors and genetic predispositions. It has been demonstrated that inactivation or mutations of certain genes lead to tumor development. The best characterized of those genes is *CDKN2A* suppressor gene which encodes for two proteins: p16 and p14/ARF. No familial pathogenic mutations in this gene have been found in Poland so far. Thus, more attention has been focused on polymorphisms and non-coding regions of *CDKN2A* which plays a significant role in regulation of gene expression. The most common changes in non-coding region of *CDKN2A* which are supposed to be connected with cancer progression include polymorphisms 500C>G and 540C>T in 3'UTR and 148Ala/Thr in exon 2 of *CDKN2A*. The last variant is more frequent in cancer patients than in healthy people. It has been proved to be associated with breast cancer and melanoma.

The aim of this project was genetic analysis in a group of 285 melanoma patients and correlation of those results with clinical course of melanoma such as: age of first diagnosis, tumor localization, survival rate, age of death, coexistence of another type of cancer, familial history of disease.

Within this study no correlation between the presence of 148Ala/Thr polymorphism and cancer in the family has been observed. There was a correlation between the presence of this polymorphism and breast cancer and melanoma in the same patient. I also found the lack of 540C>T polymorphism in the analysed group of patients. There was no correlation between 500C>G polymorphism and tumor localization, age of diagnosis and type of cancer in a patients' family. There was a correlation between the percentage of patients dying and the 500C>G variant.

In the further research the functional analysis *in vitro* in order to assess of 500C>G and 540C>T in 3'UTR influence on the *CDKN2A* expression has been performed. Two vectors carrying three most common sequence variants (500C>G, 540C>T and variant without mutation – wild type), together with luciferase reporter gene have been constructed and used for tumor cells transfections. In all performed experiments differences in reporter gene expression depending on 3'UTR variant was observed. Within three melanoma cell lines and one control cell line, the level of luciferase expression was the highest for the 3'UTR variant without mutation (3'UTR-

## Summary

---

wt) and the expression of luciferase with 3'UTR-500C>G was significantly lower. The expression level of luciferase for 3'UTR-540C>T was the lowest. In Mich-2 melanoma cell line the variants 3'UTR-500C>G and 3'UTR-540C>T caused over 2 times higher luciferase expression comparing to 3'UTR-wt. The results of functional tests indicated that 3'UTR polymorphisms in *CDKN2A* gene influence on the level of reporter gene expression, thus they may modulate the expression of *CDKN2A* gene in melanoma patients.

## 9. LITERATURA

Aitken J., Welch J., Duffy D., Milligan A., Green A., Martin N., Hayward N. CDKN2A variants in a population-base sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:446-52

Anderson H., Bladstrom A., Olsson H., et al. Familial breast and ovarian cancer: a Swedish population-based register study. *Am J Epidemiol* 2000; 152:1154-63

Arap W., Knudsen E., Sewell D.A., et al. Functional analysis of wild-type and malignant glioma derived CDKN2A beta alleles: evidence for an RB-independent growth suppressive pathway. *Oncogene* 1997; 15:2013-2020

Audic Y., Hartley R.S. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell* 2004; 96:479-498

Balch C.M., Soong S.J., Gershenwald J.E. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 2001; 19:3622-34

Balch C.M., Soon S.J., Atkins M.B., Buzaid A.C., Cascinelli N., et al. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J Clin* 2004; 54(3):131-49

Bassell G.J., Kelic S. Binding proteins for mRNA localization and local translation and their dysfunction in genetic neurological disease. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14:574-581

Bauer J., Curtin J.A., Pinkel D., Bastian B.C. Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J Invest Dermatol* 2007; 127:179-182

Benelli C, Roscetti E, Dal Pozzo V. Reproducibility of the clinical criteria (ABCDE rule) and dermoscopic features (7FFM) for the diagnosis of malignant melanoma. *European Journal of Dermatology* 2001; 11: 234-9

Bennett D.C. How to make a melanoma: what do we know of the primery clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21:27-38

Berwick M., Wiggins C. The current epidemiology of cutaneous malignant melanoma. *Front Sci* 2006; 11:1244-54

Bhatt K.V., Spofford L.S., Aram G., McMullen M., Pumiglia K., Aplin A.E. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. *Oncogene* 2005; 24:3459-71

Bisio A., Nasti S., Jordan J.J., Gargiulo S., Pastorino L., et al. Functional analysis of CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup> 5'UTR variants predisposing to melanoma. *Hum Mol Genet* 2010; vol.19; 8:1479-1491

Borg A., Johannsson U., Johannsson O., et al. Novel germline p16 mutation in familial malignant in southern Sweden. *Cancer Res* 1996; 56:2497-500

Borg A., Sandberg T., Nilsson K., Johannsson O., Klinker M., Masback A., Westerdahl J., Olsson H., Ingvar C. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1260-1266

Bothner B., Lewis W.S., DiGiammarino E.L., et al. Defining the molecular basis of Arf and Hdm2 interactions. *J Mol Biol* 2001; 314:263-77

Brose M.S., Volpe P., Feldman M., et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002; 62:6997-7000

Brudnik U., Wojas-Pels A., Branicki W. Genetyczne uwarunkowania czerniaka. *Post Dermatol Alergol* 2006; XXIII,1:21-25

Cachia A.R., Indsto J.O., McLaren K.M., Mann G.J., Arends M.J. CDKN2A mutation and deletion status in thin and thick primary melanoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6:3511-3515

Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? *Nature Rev Cancer* 2003; 3:339-49

Chatterjee S., Pal J.K. Role of 5'- and 3'- untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 2009; 101:251-262

Chaudru V., Chompret A., Bressac-de Paillerets B., et al. Influence of genes, nevi, and sun sensitivity on melanoma risk in a family sample unselected by family history and in melanoma-prone families. *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96(10):785-795

Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* 2006; 20:2149-82

Ciotti P., Strigini P., Bianchi-Scarra G. Familial melanoma and pancreatic cancer. Ligurian Skin Tumor Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334:469-470

Ciotti P., Struewing J.P., Mantelli M., et al. A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutations in 20 melanoma-prone families. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 311-319

Clark WH Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705–26

Cleaver J.E., Crowley E. UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci* 2002; 7:d1024-1043.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358: 1389-1399

Conne B., Stutz A., Vassalli J.D. The 3' untranslated region of Messenger RNA: a molecular "hotspot" for pathology? *Nat Med* 2000; 6:637-641

Czajkowski R., Placek W., Tadrowski T., Pokrywczyńska M., Zegarska B., Drewa T. Geny BRAF, NRAS, HRAS w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego. *Przegl Dermatol* 2009; 96:265-270

Dahl C., Guldberg P. The genome and epigenome malignant melanoma. *APMIS* 2007; 115:1161-1176

Damm Meyle K., Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet* 2009; 126:499-510

Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949-54

Demunter A., Stas M., Degreef H., De Wolf-Peeters C., van den Oord J.J. Analysis of N- and K- ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol* 2001; 117:1483-9

Dennis L.K., Vanbeek M.J., Beane Freeman L.E., et al. Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis. *Ann Epidemiol* 2008; 18(8):614-27

## Literatura

---

Dębniak T., Lubiński J. Genetyka kliniczna czerniaka. Postępy Nauk Medycznych 2008; 8:501-503

Dębniak T., Górski B., Huzarski T., et al. A common variant of CDKN2A (p16) predisposes to breast cancer. J Med Genet 2005; 42:763-5

Dębniak T., Scott R.J., Huzarski T., et al. CDKN2A common variants and multi-organ cancer risk – a population based study. Int J Cancer 2006; 118:3180-3182

Dębniak T., Scott R.J., Huzarski T., Byrski T., Rozmiarek A., Dębniak B., et al. CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. Cancer Res 2005; 65(3):835-839

Didkowska J., Wojciechowska U., Tarnowski W., Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 1999 roku. Centrum Onkologii – Instytut Marii Skłodowskiej Curie 2002

Duchange N., Ochoa A., Plowman G.D., Roze A., Amdjadi M., Zakin M.M. Identification of an enhancer involved in the melanoma-specific expression of the tumor antigen melanotransferrin gene. Nucleic Acids Res 1992; 20:2853-9

Elwood J.M., Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of publisher studies. Int J Cancer 1997; 73:198-203

Eskandarpour M., Hashemi J., Kanter L., Ringborg U., et al. Frequency of UV-inducible NRAS mutations in melanomas of patients with germline CDKN2A mutations. J Natl Cancer Inst 2003; 95:790-798

Evans R.D., Kopf A.W., Lew R.A., et al. Risk factors for the development of malignant melanoma: review of case-control studies. J Dermatol Surg Oncol 1998; 14:393-408

Fairbrother W.G., Yeh R.F., Sharp P.A., Burge C.B. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. Science 2002; 297:1007-1013

Falkson CI, Ibrahim J, Kirkwood JM, et al. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. J Clin Oncol 1998; 16: 1743-51

FitzGerald M.G., Harkin D.P., Silva-Arrieta S., et al. Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of clinic-based population. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:8541-8545

## Literatura

---

Flanagan N., Healy E., Philips S., Todd C., Jackson I.J., Birch-Machin M.A., Rees J.L. Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2531-2537

Galus Ł. Immunoterapia czerniaka złośliwego- próby i perspektywy zwycięstwa z nowotworem. [www. hylostet.pl](http://www.hylostet.pl), 2009; Nr 6.

Gandini S., Sera F., Cattaruzza M.S., Pasquini P., Zanetti R., Masini C., et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2040-2059

Garbe C., Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14:280-90

Goel V.K., Lazar A.J., Warneke C.L., Redston M.S., Haluska F.G. Examination of mutations in BRAF, NRAS and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; 126:154-160

Goggins W., Gao W., Tsao H. Association between femal breast cancer and cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2004; 111:792-4

Goldstein A.M., Fraser M.C., Struewing J.P., et al. Increase risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16Ink4a mutations. *N Engl J Med* 1995; 333:970-4

Goldstein A.M., Struewing J.P., Chidambaram A., et al. Genotype-phenotype relationship in US melanoma prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1006-10

Goldstein A.M., Liu L., Shennan M.G., et al. A common founder of V126D CDKN2A mutation in seven North America melanoma-prone families. *Br J Cancer* 2001; 85:527-30

Goldstein A.M., Struewing J.P., Fraser M.C., et al. Prospective risk of cancer in CDKN2A germline mutations carriers. *J Med Genet* 2004; 41:421-424

Goldstein A.M., Chan M., Harland M., Gillanders E.M., et al. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* 2006; 66:9818-9828

Goydos J.S., Mann B., Kim H.J., Gabriel E.M., et.al. Detection of BRAF and NRAS mutations in human melanoma. *J Am Coll Surg* 2005; 200:362-70

Gray-Schopfer V.C., da Rocha Dias S., Marais R. The role of B-RAF in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24:165-83

Greene V.R., Johnson M.M., Grimm E.A., Ellerhorst J.A. Frequencies of NRAS and BRAF mutations increase from the radial to the vertical growth phase in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2009; 129:1483-1488

Gruber F., Kaštelan M., Brajac I., Saftić M., Peharda V., Čabrijan L., Žgombić Z.S., Simonić E. Molecular and genetic mechanisms in melanoma. *Coll Antropol* 2008; 32 Suppl.2:147-152

Gruis N.A., Sandkuijl L.A., van der Velden P.A., et al. CDKN2 explains part of the clinical phenotype in Dutch familial atypical multiple-mole melanoma (FAMMM) syndrome families. *Melanoma Res* 1995; 5:169-177

Guldberg P., Straten P., Birck A., Ahrenkiel V., Kirkin A.F., Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 1997; 57:3660-3663

Hara E., Smith S., Parry D., Tahara H., Stone S., Peters G. Regulation of p16 CDKN2A expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 1996; 16:859-867

Harland M., Meloni R., Gruis N., et al. Germline mutations of the CDKN2 gene in UK melanoma families. *Hum Mol Genet* 1997; 6:2061-2067

Harland M., Holland E.A., Ghiorzo P., et al. Mutation screening of the CDKN2A promoter in melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28:45-57

Harland M., Sushila M.D., Bishop T., Newton Bishop J.A. A deep intronic mutations in CDKN2A is associated with disease in subset of melanoma pedigrees. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2679-86

Harland M., Taylor C.F., Chambers P.A., Kukulizch K., Randerson-Moor A., et al. A mutation hotspot at the p14ARF splice site. *Oncogene* 2005; 24:4604-4608

Harland M., Taylor C.F., Bass S., et al. Intronic sequence variants of the CDKN2A gene in melanoma pedigree. *Genes Chromosome Cancer* 2005; 43:128-136

Hashemi J., Platz A., Ueno T., Stierner U., et al. CDKN2A germ-line mutations in individuals with multiple cutaneous melanomas. *Cancer Res* 2000; 60:6864-6867

Hayward N.K. Genetic of melanoma predisposition. *Oncogene* 2003; 22:3053-3062



## Literatura

---

Hazen BP, Bhatia AC, Zaim T, Brodell RT. The clinical diagnosis of early malignant melanoma: expansion of the ABCD criteria to improve diagnostic sensitivity. *Dermatol Online J* 1999; 5: 3

Heidenreich R., Kappel A., Breier G. Tumor endothelium-specific transgene expression directed by vascular endothelial growth factor receptor -2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences. *Cancer Res* 2000; 60:6142-6147

Hellriegel W. Radiation therapy of primary and metastatic melanoma. *Ann Ny Acad Sci* 1963; 100-131

Hewitt C., Lee Wu C., Evans G., et al. Germline mutation of ARF in melanoma kindred. *Hum Mol Genet* 2002; 11:1273-1279

Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., et al. Improved Survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8):711-723

Hoffmann R, Muller I, Neuber K, et al. Risk and outcome in metastatic malignant melanoma patients receiving DTIC, cisplatin, BCNU and tamoxifen followed by immunotherapy with interleukin 2 and interferon alpha 2a. *Br J Cancer* 1998; 78: 1076-80

Honrado E., Benitez J., Palacios J. Histopathology of BRCA1 and BRCA2 associated breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 59:27-39

Hussussian J.P., Struewing A.M., Goldstein P.A., et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994; 8:15-21

Jakóbisiak M. Immunologia czerniaka. *Współcz Onkol* (2003) vol. 7, 8 (625)

Jhappan Ch., Noonan F.P., Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 2003; 22:3099-3112

Kamijo T., Weber J.D., Zambetti G., Zindy F., Roussel M.F., Sherr C.J. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8292-97

Kaufman D.K., Kimmel D.W., Parisi J.E., Michels V.V. A familial syndrome with cutaneous malignant melanoma and cerebral astrocytoma. *Neurology* 1993; 43:1728-1731

Kennedy C., Huurne J., Berkhout M., et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair colour. *J Invest Dermatol* 2001; 117:294-300

Kirkwood J.M., Strawderman M.H., Ernstoff M.S. et al. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996; 14:7-17

Kozak M. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* 1989; 9:5134-5142

Krajowa Baza Danych Nowotworowych. <http://www.onkologia.org.pl>

Kumar R., Smeds J., Berggren P., Straume O., Rozell B.L., Akslen L.A., Hemminiki K. A single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *Int J Cancer* 2001; 95:388-393

Kumar R., Angelini S., Snellman E., Hemminiki K. BRAF mutations are common somatic events in melanocystic nevi. *J Invest Dermatol* 2004; 122:342-348

Kwinta Ł. Rola sekwencji niekodujących w kancerogenezie czerniaka. *Współcz Onkol* 2008; vol.12; 3:99-105

Kycler W., Teresiak M. Czerniak skóry: aktualne możliwości leczenia w Polsce na podstawie analizy leczonych pacjentów i przeglądu literatury. *Współczesna Onkologia* 2006; vol.10; 9:437-448

Lakhani S.R. The pathology of familial breast cancer: morphological aspects. *Breast Cancer Res* 1999; 1:31-35

Lamperska K.M., Karczewska A., Kwiatkowska E., Mackiewicz A. Analysis of mutations in p16 CDKN2A gene in sporadic and familial melanoma in the Polish population. *Acta Biochim Pol* 2002; 49:369-76

Lamperska K.M., Przybyła A., Kycler W., Mackiewicz A. The CDKN2a common variants: 148 Ala/Thr and 500C/G in 3'UTR and their association with clinical course of melanoma. *Acta Biochim Pol* 2007; 54(1):119-24

Langård S., Rosenberg J., Andersen A., Heldaas S.S. Incidence of cancer among workers exposed to vinyl chloride in polyvinyl chloride manufacture. *Occup Environ Med* 2000; 57:65-68

## Literatura

---

- Lens MB., Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004; 150: 179-85
- Li W., Sanki A., Karim R.Z., et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006; 38(4):287-301
- Lilischkis R., Sarcevic B., Kennedy C., Warlters A., Sutherland R.L. Cancer-associated mis-sense and deletion mutations impair p16INK4 CDK inhibitory activity. *Int J Cancer* 1996; 66:249-54
- Liu L., Dilworth D., Gao L., Monzon J., Summers A., Lassam N., Hogg D. Mutation in the CDKN2A 5'UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nat Genet* 1999; 21:128-132
- Loo J.C., Liu L., Hao A., et al. Germline splicing mutations of CDKN2A predispose to melanoma. *Oncogene* 2003; 22:6387-94
- Lopez de Silanes I., Paz Quesada M., Esteller Manel. Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cellular Oncology* 2007; 29:1-17
- Lukowsky A., Schäfer-Hesterberg G., Sterry W., Voit Ch. Germline CDKN2A/p16 mutations are rare in multiple primary and familial malignant melanoma in German patients. *Journal of Dermatological Science* 2008; 49:163-165
- MacKie R.M. Early recognition of malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 1986;15:707-708
- MacKie R.M. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer.* 1998 Jul;34 Suppl 3:S3-6
- MacKie R.M., Andrew N., Lanyon W.G., Connor J.M. CDKN2A germline p16 mutations in U.K. patients with familial melanoma and multiple primary melanomas. *J Invest Dermatol* 1998; 111:269-72
- Mackiewicz J., Mackiewicz A. Immunoterapia nowotworów i perspektywy jej rozwoju. *Współczesna Onkologia* 2010; vol.14; 2:59-71
- Medireddi M.T., Dent P., Fisher P.B. Regulation of mda-7 gene expression during human melanoma differentiation. *Oncogene* 2000; 19:1362-68
- Mendell J.T., Dietz H.C. When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell* 2001; 107:411-414

## Literatura

---

Miracco C., Palumbo N., Lavergne D., et al. Malignant melanomas: search for human papillomaviruses. *Arch Dermatol* 2001; 137:826-827

Moore M.J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 2005; 309:1514-1518

Nagore E., Montoro A., Garcia-Casado Z., Botella-Estrada R., et al. Germline mutations in CDKN2A are infrequent in female patients with melanoma and breast cancer. *Melanoma Research* 2009; 19:211-214

Nathanson K.L. Using genetics and genomics strategies to personalize therapy for cancer: Focus on melanoma. *Biochemical Pharmacology* 2010; 80:755-761

Nelson A.A., Tsao H. Melanoma and genetics. *Clinics in Dermatology* 2009; 27:46-52

Newton Bishop J., Harland M., Randerson-Moor J., Bishop D.T. Management of familial melanoma. *Lancet Oncol* 2007; 8:46-54

O'Day S.J., Boasberg P.D., Kristieda T., et al. Incidence of central nervous systems (CNS) metastases in 117 metastatic melanoma patients treated with concurrent biochemotherapy. *Melanoma Research* 2001; vol.11, suppl.1:132-133

Okamoto I., Roka F., Kroegler J., et al. The EGF A61G polymorphism is associated with disease-free period and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; 126:2242-6

Omholt K., Platz A., Kanter L., Ringborg K., Hansson J. NRAS and BRAF mutation arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Can Res* 2003; 9:6483-88

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man

Palmer J.S., Duffy D.L., Box N.F., et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Human Genet* 2000; 66:176-86

Palmieri G., Capone M., Libera Ascierio M, Gentilcore G., Stroncek D.F., Casula M., Sini M.C., Palla M., Mozzillo N., Ascierio P.A. Main roads to melanoma. *Journal of Translational Medicine* 2009; 7:86

Parker J.I., Florell S.R., Alexander A, et al. Pancreatic melanoma surveillance in patients with familial melanoma. *Arch Dermatol* 2003; 139:1019-25

## Literatura

---

Pawlak W.Z., Wawrocka-Pawlak M., Szczylik C. Biologia molekularna czerniaka skóry. *Współczesna Onkologia* 2003; vol.7; 8:548-555

Penninger J.M., Woodgett J. Coupling tumor suppression to stem cells. *Science* 2001; vol.294 issue 5549:2116-2118

Pho L., Grossman D., Leachman S.A. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes In familial melanoma. *Curr Opin Oncol* 2006; 18:173-179

Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A (p16)/ARF tumor suppressor. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:705-22

Plate K.H, Breier G., Millauer B., Ullrich A., Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1993; 53:5822-5827

Platz A., Hansson J., Mansson-Brahme E., et al. Screening of germline mutations in the CDKN2A and CDKN2B genes in Swedish families with hereditary cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:697-702

Platz A., Egyhazi S., Ringborg U., Hansson J. Human cutaneous melanoma: a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* 2007; 1:395-405

Pollock P.M., Stark M.S., Palmer J.M Walters M.K., Aitken J.F., et al. Mutation analysis of the CDKN2A promoter in Australian melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32:89-94

Pollock P.M., Harper U.L., Hansen K.S., Yudt L.M., et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33:19-20

Polsky D., Cordon-Cardo C. Oncogenes in melanoma. *Oncogene* 2003; 22:3087-3091

Puig S., Malvey J., Badenas C., et al. Role of CDKN2A locus in patients with multiple primary melanoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:3043-51

Randerson-Moor J.A., Harland M., Williams S., et al. A germline deletion of p14ARF but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumour syndrome family. *Hum Mol Genet* 2001; 10:55-62

Randerson-Moor J.A., Gaut R., Turner F., et al. The relationship between the epidermal growth factor (EGF) 5'UTR variant A61G and melanoma/nevus susceptibility. *J Invest Dermatol* 2004; 123:755-9

- Rass K., Reichrath J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008; 624:162-78
- Rees J.L. Genetics of hair and skin colour. *Annu Rev Genet* 2003; 37:67-90
- Rees J.L. The genetic of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* 2004; 75:739-751
- Rizos H., Puig S., Badenas C., et al. A melanoma-associated germline mutation in exon 1 $\beta$  inactivates p14ARF. *Oncogene* 2001; 20:5543-5547
- Rouzaud F., Kadekaro A.L., Abdel-Malek Z.A., Hearing V.J. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res* 2005; 571:133-152
- Ruka W. Czerniak Złośliwy. Rozdz. w: *Onkologia Kliniczna*; Red. Krzakowski M; Wyd. Borgis 2006, W-wa
- de Snoo F.A., Hayward N.K. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Lett* 2005; 230:153-186
- Satyamoorthy K., Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther* 2002; 1:14-17
- Sauroja I., Smeds J., Vlaykova T., Kumar R., Talve L., et al. Analysis of G<sub>1</sub>/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28:404-414
- Skowronek J., O'Shea A., Kubaszewska M. Wyniki leczenia napromienianiem chorych na czerniaka złośliwego w materiale Wielkopolskiego Centrum Onkologii. *Współcz Onkol* 1999; 2:65-68
- Soufir N., Avril M.F., Chompret A., et al. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 1998; 7:209-16
- St Johnson D. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 1995; 81:161-170
- Stahl J.M., Sharma A., Cheung M., et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 2004; 64:7002-10
- St-Arneault G., Nagel G., Kirkpatrick D., et al. Melanoma in twins. Cutaneous malignant melanoma in identical twins from a set of triples. *Cancer* 1970; 25:672-677

## Literatura

---

Stott F.J., Bates S., James M.C., et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998; 17:5001-14

Straume O., Smeds J., Kumar R., Hemminki K., Akslen L.A. Significant impact of promoter hypermethylation and the 50C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* 2002; 161:229-237

Sun C.C., Lenoir G., Lynch H., et al. In-situ breast cancer and BRCA1. *Lancet* 1996; 348:408

Szczeklik A. (red). *Choroby wewnętrzne. Przyczyny, rozpoznanie i leczenie. Tom I. Medycyna Praktyczna, Kraków 2005.*

Tamura M., Matsumoto K., Aota S., Parsons R., Yamada K.M. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumour suppressor PTEN. *Science* 1998; 280:1614-1617

Thomas N.E. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res* 2006; 16:97-103

Thompson J.F., Hunt J.A., Shannon K.F., Kam P.C. Frequency and duration of remission after isolated limb perfusion for melanoma. *Arch Surg.* 1997;132:903-7

Thompson J.F., Scolyer R.A., Kefford R.F. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 365:687-701

Tucker M.A., Goldstein A.M. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003; 22:3042-3052

Tischkowitz M.D., Foulkes W.D. The basal phenotype of BRCA1 related breast cancer: past, present and future. *Cell Cycle* 2006; 5:963-967

Vasen H.F., Gruis N.A., Frants R.R., et al. Risk of developing pancreatic cancer in families with atypical multiple melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer* 2000; 87:809-11

Valverde P., Healy E., Jackson I., et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995; 11:328-30

Valverde P., Healy E., Sikkink S., et al. The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet* 1996; 10:1663-6

van der Velden P.A., Sandkuijl L.A., Bergman W., et al. A locus linked to p16 modifies melanoma risk in Dutch familial multiple mol melanoma (FAMMM) syndrome families. *Genom Res* 1999; 9:575-80

Venables J.P. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays* 2006; 28:378-386

von Thaler A.K., Kamenisch Y., Berneburg M. The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis. *Experimental Dermatology* 2010; 19:81-88

Vrouenraets BC, Hart GA, Eggermont AM, et al. Relation between limb toxicity and treatment outcomes after isolated limb perfusion for recurrent melanoma. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 522-30

Walker G.J., Hussussian C.J., Flores J.F., et al. Mutations of the CDKN2/p16INK4 gene in Australian melanoma kindreds. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1845-52

Wideli M. Eksperymentalne i kliniczne aspekty radiobiologii czerniaka złośliwego. *Nawotwory* 1996; 46:742-760

Wong O., Raabe G.K. A critical review of cancer epidemiology in the petroleum industry, with a meta-analysis of combined database of more than 350.000 workers. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 32:78-98

Wu H., Vikas G., Haluska F.G. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003; 22:3113-3122

Wysocki P., Mackiewicz A. Szczepionki czerniakowe. *Współczesna Onkologia*. 2003;7:626-629

Xu N., Chen C.Y., Shyu A.B. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol* 1997; 17:4611-21

Zuo L., Weger J., Yang Q., et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996; 12:97-9





