

OBRAVNAVA DEDNEGA MELANOMA

Marko Hočevar

Povzetek. Za melanom velja tako kot za vse ostale vrste raka, da je kancerogeneza več-stopenjski proces, pri katerem nastane več zaporednih mutacij, preden celica dokončno maligno alterira. Zgodnji dogodek je običajno takšna mutacija, ki povzroči stalno proliferacijsko aktivnost in s tem možnost prenašanja mutacij na naslednje generacije celic. Pri sporadičnih rakah nastane takšna mutacija v posamezni somatski celici, pri dednih rakah pa takšno mutacijo bolnik podeduje od staršev in je zato že ob rojstvu v vseh somatskih celicah in v polovici spolnih celic.

Pri nastanku melanoma je eden izmed najzgodnejših in najverjetneje nujni dogodek neprestana aktivacija signalne poti RAS-RAF-MEK-ERK. S tem dobijo melanociti za kancerogenezo nujno potrebno stalno proliferacijsko sposobnost. Naslednji nujni korak v nastanku melanoma je zaobiti proces apoptoze melanocitov, ki je eden bistvenih mehanizmov proti nastanku raka. Glavno vlogo pri tem ima verjetno pot INK4A (p16)-CDK4-RB, ki se v normalnih razmerah aktivira kot odziv na mutirani gen B-RAF. Pozni dogodek pri napredovanju melanoma je čezmerna aktivacija signalne poti PI3K-AKT s pomočjo mutiranih genov, kot so PTEN, C-KIT, N-RAS ali drugi, s katero dobijo melanomske celice sposobnost metastaziranja.

Oblika melanoma je dedna, ko se rak pojavi pri dveh ali več sorodnikih, značilno 10 do 20 let prej kot pri sporadičnih primerih, poleg tega pa so pri dedni obliki primarni melanomi pogosto multipli. Za nastanek dednega melanoma so odgovorni visoko penetrantni geni. CDKN2A na lokusu 9p21 je za tumor supresorski gen, ki kodira dva proteina – p16 in p14ARF. Mutirani p16 omogoči fosforilacijo proteina Rb, vstop v fazo S in prezgodnje nadaljevanje celičnega cikla. Mutirani p14ARF prepreči razgradnjo p53, kar zaustavi tako fazo G1 kot G2. Pogostost mutacij CDKN2A naraste s približno 0,01 % v splošni populaciji na 40 % v družinah z dedno obliko melanoma. Drugi visoko penetrantni gen, ki povzroča nastanek dednega melanoma, je gen CDK4. Doslej sta bili opisani samo dve različni mutaciji (R24H pri 11 družinah in R24C pri 6 družinah) na drugem eksonu gena CDK4. Skupaj je po celem svetu opisanih samo 17 družin, ki pa so zelo številne, tako da je posameznikov z mutiranim genom CDK4 zelo verjetno več kot 120. Mutirani gen CDK4 inhibira vezavo proteina p16. Ostali visoko penetrantni geni so trenutno še predmet intenzivnih raziskav.

UVOD

Za melanom velja tako kot za vse ostale vrste raka, da je na ravni posamezne maligne celice to vedno dedna genska bolezen. Osnova za nastanek raka je namreč sprememba dednega materiala (DNK) v celičnem jedru, ki celici omogoči, da se izogne različnim regulacijskim mehanizmom in se nenadzorovano deli, s tem pa prenaša pridobljene lastnosti na naslednjo generacijo. Karcinogeneza je vedno večstopenjski proces, kjer je potrebnih več mutacij, preden se celica dokončno maligno spremeni. Za večino solidnih rakov velja, da je potrebnih vsaj 7 mutacij različnih genov, ki sodelujejo pri delitvi celic (protoonkogeni) in njeni regulaciji (supresorski geni). Zgodnji dogodek je običajno takšna mutacija, ki povzroči stalno proliferacijo in s tem možnost prenašanja mutacij na naslednje generacije celic. Pri veliki večini rakov nastane mutacija v posamezni somatski celici, ki se nato ob

dodatno pridobljenih mutacijah postopno maligno spremeni. V teh primerih gre za sporadične rake, ki so večinoma bolezen starejših, saj je za nastanek kombinacije mutacij različnih genov potreben čas. Pri 3–5 % bolnikov z rakom pa je ugotovljeno, da so eno od zgodnjih mutacij podedovali od staršev in so jo zato imeli že ob rojstvu v vseh somatskih celicah in v polovici spolnih celic. Posledica je hitrejša karcinogeneza, kar se kaže v zgodnejšem zbolevanju (10–20 let prej kot pri enakih sporadičnih rakih); pogosteje nastane tudi več primarnih rakov. V teh primerih gre za dedne rake, ki se dedujejo avtosomsko dominantno.

V nadaljevanju bomo opisali že znane mutacije, ki sodelujejo pri nastanku melanoma, in gene, ki so odgovorni za dedni melanom.

NASTANEK MELANOMA

Somatske mutacije v različnih regulacijskih genih so odgovorne za iniciacijo, promocijo in napredovanje melanoma. Fenotipsko se te mutacije kažejo kot zaporedje različnih histoloških sprememb, ki jih opisuje Clarkov model nastanka melanoma (nevus→displastični nevus→radialna faza rasti melanoma→vertikalna faza rasti melanoma→metastatski melanom). Eden izmed najzgodnejših in najverjetneje nujni dogodek v patogenezi melanoma je nenehna aktivacija signalne poti RAS-RAF-MEK-ERK, ki jo imenujemo tudi mitogensko aktivirana proteinskokinazna signalna pot (ang. *mitogen-activated protein kinase*). S tem dobijo melanociti za kancerogenezo nujno potrebno stalno proliferacijsko sposobnost. Mutirani gen B-RAF najdemo pri 50–70 %, N-RAS pa pri 15–25 % melanomskih celičnih linij in primarnih melanomov.

Naslednji nujni korak v nastanku melanoma je zaobiti proces staranja (ang. *senescence*) melanocitov, kar melanocitom omogoči, da se izognejo apoptozi (programirani celični smrti), ki je eden bistvenih mehanizmov proti nastanku raka. Glavno vlogo pri tem ima verjetno pot INK4A (p16)-CDK4-RB, ki se v normalnih okoliščinah aktivira kot odziv na mutirani gen B-RAF. Dodatno vlogo pri uravnavanju mehanizmov, ki vodijo v apoptozo, imata gena ARF in TP53, ki pa sta pri večini melanomov spremenjena. Pozni dogodek pri napredovanju melanoma je čezmerna aktivacija signalne poti PI3K-AKT s pomočjo mutiranih genov, kot so PTEN, C-KIT, N-RAS ali drugi, s katero dobijo melanomske celice sposobnost metastaziranja.

Opisana pot nastanka melanoma in geni, ki v njej sodelujejo, je pri bolnikih z melanomom najpogostejša, vendar seveda ne edina. Glede na kompleksnost procesa podvojevanja DNK in njegovega nadzorovanja, v katerem sodelujejo zelo številni geni, so pri nastanku melanoma možne še praktično neštete kombinacije mutacij ali pa samo spremenjene aktivnosti drugih genov. Kateri geni so bolj/manj aktivni pri posameznem melanomu, lahko –

tako kot pri ostalih rakih – ugotavljamo z genskim podpisom. Genski podpis je tudi zelo pomemben in neodvisen prognostični dejavnik bolezni. Glede na genski podpis lahko bolnike z melanomom delimo v 4 skupine:

- normalna – aktivni so običajni geni,
- z burnim imunskim odzivom – aktivni so zlasti geni, zadolženi za imunski odziv,
- s pigmentacijo – aktivni so zlasti geni, zadolženi za pigmentacijo,
- s proliferacijo – aktivni so zlasti geni, zadolženi za proliferacijo.

Bolniki v prvih dveh skupinah imajo boljšo prognozo, ker imajo manj maligne (ang. *low grade*) melanome, bolniki v preostalih dveh skupinah pa slabšo, ker so njihovi melanomi hudo maligni (ang. *high grade melanomas*).

Ugotovitev, kateri geni so mutirani pri bolniku, nima le prognostičnega pomena, važna je tudi za zdravljenje, saj so na voljo tarčna zdravila, ki specifično delujejo na mutirane gene: vemurafinib inhibira mutirani gen B-RAF, ki je odgovoren za stalno proliferacijsko aktivnost melanomskih celic. Pri vseh bolnikih z metastatskim melanomom je zato treba določiti, ali je gen B-RAF mutiran in – če je (približno v 50 % primerov) – začeti zdravljenje z vemurafinibom in ne več s klasično kemoterapijo.

DEDNI MELANOM

Približno 10 % bolnikov z malignim melanomom ima pozitivno družinsko anamnezo. Pozitivna družinska anamneza na splošno pomeni 2-krat večjo ogroženost z malignim melanomom. Družinsko obliko malignega melanoma lahko razdelimo v tri skupine: sporadične primere melanoma, ki se kopičijo v nekaterih družinah, družinsko obliko melanoma, ki je posledica nizko penetrantnih alelov, in dedno obliko, ki je posledica visoko penetrantnih alelov. Zadnja oblika je relativno redka. Vanjo sodi približno 1 % vseh primerov melanoma. Oblika malignega melanoma pa je dedna, ko se pojavi pri dveh ali več sorodnikih, značilno 10 do 20 let prej kot pri sporadičnih primerih, poleg tega pa imajo bolniki z dedno obliko pogosto multiple primarne melanome. Za dedno obliko je značilen unilateralni vzorec dedovanja znotraj družine. Pri družinah, katerih člani imajo kožni melanom in/ali atipične nevuse, gre za sindrom družinskih atipičnih multiplih kožnih znamenj/melanomov (ang. *familial atypical multiple mole/melanoma*, FAMMM).

VISOKO PENETRANTNI GENI

Gen CDKN2A na lokusu 9p21 je tumor-supresorski gen, povezan z dedno obliko malignega melanoma. Produkta gena sta proteina p16 in p14ARF. Oba imata skupen 2. in 3. ekson, a se ob nastanku p16 prepíše ekson 1 α ,

ob nastanku p14ARF pa ekson 1 β . Protein p16 inhibira kompleks ciklina D in kinaze 4 (CDK 4) ali kinaze 6 (CDK 6), kar posledično zavre fosforilacijo proteina Rb (protein retinoblastoma), celični cikel pa se ustavi v fazi G₁. Okvarjeni protein p16 omogoči fosforilacijo proteina Rb, vstop v fazo S in pre-zgodnje nadaljevanje celičnega cikla. Protein p14ARF prepreči razgradnjo p53, kar zaustavi tako fazo G₁ kot G₂. Poleg tega vpliva tudi na transkripcijske faktorje, na katere se veže protein Rb. Večina mutacij je na eksonu 1 α ali na 2. eksonu. Pogostost teh mutacij, ki je 0,01-odstotna v splošni populaciji, je v družinah z dedno obliko malignega melanoma kar 40-odstotna. Mutacije na 2. eksonu inaktivirajo tako p16 kot p14ARF. Odkrite so le tri mutacije, ki so na eksonu 1 β . Pri bolniku z multiplimi primarnimi melanomi je bila dokazana insercija na eksonu 1 β , v družini s štirimi zbolelimi člani delecija, opisana pa je tudi substitucija pri dveh članih družine z malignim melanomom.

Spremenjeni CDKN2A najdemo pri 50 % družin s sindromom FAMM, a povezava gena s številom in displazijo nevusov še ni povsem jasna. CDKN2A je visoko penetranten gen, saj je ogroženost z malignim melanomom pri nosilcih mutacije do 80. leta starosti v Evropi 53-odstotna, v ZDA 76-odstotna, v Avstraliji pa kar 91-odstotna. Podatek kaže, da mutacijo CDKN2A pri kancerogenezi melanoma močno podpira količina UV-žarkov.

Drugi visoko penetrantni gen, ki povzroči nastanek dednega melanoma, je gen CDK4. Doslej sta bili opisani samo dve različni mutaciji (R24H pri 11 družinah in R24C pri 6 družinah) na drugem eksonu gena CDK4. Skupaj je po vsem svetu opisanih samo 17 družin, ki pa imajo veliko članov, tako da je posameznikov z mutiranim genom CDK4 zelo verjetno več kot 120 (od 209 testiranih je bilo 89 pozitivnih). V največji opisani družini z Norveške so imeli mutacijo pri 33 družinskih članih v štirih generacijah. Mutirani CDK4 gen inhibira vezavo proteina p16.

Pri vseh ostalih bolnikih (družinah), ki izpolnjujejo pogoje dednega raka in pri katerih ne najdemo mutacije genov CDKN2A ali CDK4, so možne mutacije številnih drugih genov, ki lahko povzročijo nastanek dednega melanoma. Konzorcij Genomel trenutno pripravlja nabor kandidatnih genov, dobljenih z manjšimi nacionalnimi študijami, ki bodo nato testirani na zelo velikem številu vzorcev (več kot 1000) družin, ki izpolnjujejo pogoje dednega melanoma in pri katerih niso našli mutacije genov CDKN2A ali CDK4. Rezultate lahko pričakujemo v naslednjih dveh letih.

Pri vseh bolnikih z melanomom, ki izpolnjujejo merila za dednega raka, je indicirano onkološko genetsko svetovanje, pri katerem se bolniku ponudi tudi možnost genetskega testiranja. Trenutno se testirata gena CDKN2A in CDK4. Dedni melanom sodi med tri izjeme v onkološki genetiki, kjer se genetski test ponudi otrokom pred puberteto (med 10. in 12. letom), in zato

o testiranju odločajo starši. Sicer je pravilo onkološke genetike, da se o genetskem testu vedno odločajo polnoletne osebe same zase. Razlog za izjemo je, da se največja potencialna škoda pri nosilcih mutiranih genov CDKN2A ali CDK4 naredi ob neustrezni zaščiti pred UV-žarki v obdobju pubertete, ko se melanociti najbolj delijo.

NIZKO PENETRANTNI GENI

Nizko penetrantni aleli in izpostavljenost sončnim žarkom zvečajo tako ogroženost z malignim melanomom v splošni populaciji kot pogostost melanoma v dovezetnih družinah. Eden od teh genov je gen za receptor melanokortina (gen MC1R). Izpostavljenost UV-žarkom zveča tvorbo melanina prek slabo poznanih mehanizmov, ki vključujejo neposredni učinek žarkov na melanocite, aktivacijo melanocitov z MSH (melanocite stimulirajočim hormonom ali melanotropinom) ter parakrini učinek dušikovega monoksida, ki ga izločajo keratinociti. MSH se veže na receptor melanokortin-1 melanocitov (MC1R) in spodbuja tvorbo melanina. Ta je sestavljen iz dveh kemično različnih oblik pigmenta: evmelanin prevladuje pri ljudeh s temnejšo poltjo, je rjavo-črn in deluje fotoprotektivno; rdeče-rumeni feomelanin ima šibek fotoprotektivni učinek, ob fotoaktivaciji pa nastanejo kisikovi prosti radikali, ki delujejo citotoksično in mutageno. Razmerje med evmelaninom in feomelaninom v koži je odgovorno za različne tipe kože. V koži in laseh rdečelasih prevladuje feomelanin, poleg tega pa nastaja še manj evmelanina, zaradi česar je njihova koža ob izpostavljenosti sončnim žarkom hitro opečena in le malo porjavi. Kakšno je razmerje pigmentov v koži, je odvisno od oblike MC1R. Gen za MC1R se nahaja na lokusu 16q24.3. Za ta gen je značilna visoka stopnja polimorfizma v populaciji, ogroženost z melanomom pa se pri nosilcu določenega alela zveča za 2–4-krat, a je znatno manjša kot pri mutaciji CDKN2A. Določeni aleli so povezani z različnimi fenotipi oz. različnimi kliničnimi tipi kože. Trije aleli (Arg151Cys, Arg160Trp in Asp294His) so povezani s fenotipom, katerega značilnosti so rdeči lasje, pege in svetla polt, ki ne porjavi, in jih spremlja večja ogroženost z malignim melanomom. Pri nosilcih enega od teh alelov se ogroženost zveča, čeprav imajo temnejšo, olivno polt. Poleg tega so nekateri aleli gena MC1R verjetno udeleženi pri nastanku malignega melanoma, neodvisno od njihovega učinka na fenotip. Največja ogroženost je morda povezana z alelom Asp84Glu. V avstralski populaciji je 72 % bolnikov z melanomom nosilcev vsaj enega od opisanih alelov, v Veliki Britaniji pa le 28 %. Poleg tega so raziskave pokazale, da se penetranca mutacije CDKN2A zveča ob navzočnosti enega od opisanih alelov s 50 na 84 %, ob tem pa se zmanjša povprečna starost ob diagnozi z 58 na 37 let.

ZAKLJUČEK

Melanom je, tako kot vsi ostali raki, bolezen, pri kateri sta nastanek in napredovanje odvisna od spremenjenega delovanja genov, ki so sicer odgovorni za delitev celice in njeno natančno regulacijo. Informacija o tem, kateri geni so pri bolniku z melanomom spremenjeni, je vedno bolj pomembna, saj omogoča na eni strani ciljano zdravljenje s tarčnimi zdravili (vemurafinib) ali pa preventivne ukrepe, s katerimi je mogoče zmanjšati možnost nastanka melanoma pri nosilcih zarodnih mutacij.

LITERATURA

1. Clark WH, Jr. Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1991; 10: 83–8.
2. Eskandarpour M, Kiaii S, Zhu C, Castro J, Sakko AJ, Hansson J. Suppression of oncogenic NRAS by RNA interference induces apoptosis of human melanoma cells. *Int J Cancer* 2005; 115: 65–73.
3. Hoeflich KP, Gray DC, Eby MT, Tien JY, Wong L, Bower J, et al. Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models. *Cancer Res* 2006; 66 (2): 999–1006.
4. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; 122 (2): 337–41.
5. Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence – halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006; 355 (10): 1037–46.
6. Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 2003; 22 (20): 3063–9.
7. Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (14): 8292–7.
8. Yang G, Rajadurai A, Tsao H. Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2005; 125 (6): 1242–51.
9. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24 (2): 273–85.
10. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006; 6 (3): 184–92.
11. Jönsson G, Dahl C, Staaf J, Sandberg T, Bendahl PO, Ringnér M, et al. Genomic profiling of malignant melanoma using tiling-resolution arrayCGH. *Oncogene* 2007; 26 (32): 4738–48.
12. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bröcker EB, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1998; 58 (10): 2170–5.
13. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006; 12 (9): 406–14.
14. Harbst K, Staaf J, Lauss M, Karlsson A, Masback A, Johansson I, et al. Molecular profiling reveals low- and high-grade forms of primary melanoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18 (15): 4026–36.

15. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994; 8 (1): 15–21.
16. Goldstein AM, Struewing JP, Chidambaram A, Fraser MC, Tucker MA. Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92 (12): 1006–10.
17. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94 (12): 894–903.
18. Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, 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 color. *J Invest Dermatol* 2001; 117 (2): 294–300.
19. Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O'Gorman LE, Green AC et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 2000; 66 (1): 176–86.
20. Hocevar M, Avbelj M, Peric B, Zgajnar J, Besic N, Battelino T. High prevalence of germline CDKN2A mutations in Slovenian cutaneous malignant melanoma families. *Croat Med J* 2006; 47: 851–4.
21. Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J Med Genet* 2013; 50 (4): 264–70.