

## Določanje mutacij pri bolnikih z dedno obliko malignega melanoma kože

P. Cerkovnik, B. Perić, M. Hočvar, in S. Novaković

### Povzetek

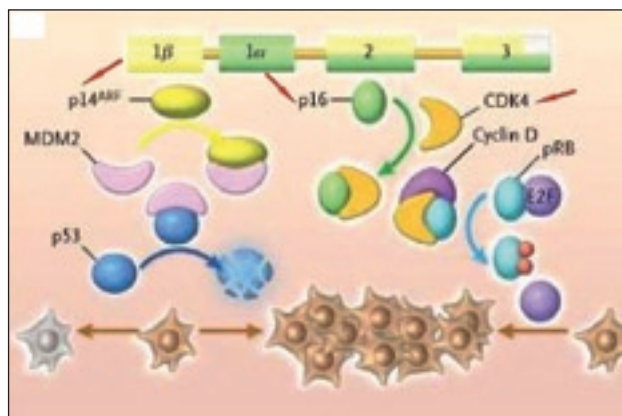
Gensko testiranje za dedno obliko malignega melanoma kože na OI Ljubljana opravljamo od leta 2005. Izbor bolnikov za testiranje poteka v okviru genetskega svetovanja. Testiramo bolnike in njihove zdrave sorodnike, če sta v družini najmanj dva obolela člana, in bolnike s primarnimi multiplimi melanomi brez obremenjujoče družinske anamneze.

Na oddelku za molekularno diagnostiko z metodo sekvenčne analize iščemo in določamo neznane točkovne mutacije ter manjše delecije in insercije v eksonih genov, povezanih z nastankom malignega melanoma kože: *CDKN2A*, *CDK4* in *MC1R*. Do sedaj smo testirali 70 oseb: 40 bolnikov in njihovih zdravih sorodnikov iz 28 različnih družin, obremenjenih z družinsko anamnezo, ter 30 bolnikov s primarnimi multiplimi melanomi. Sekvenčna analiza genov, povezanih z dedno obliko malignega melanoma kože, je pokazala, da so mutacije *CDKN2A* *p16<sup>INK4a</sup>* pri bolnikih z družinsko anamnezo zelo pogoste (37,5 %). Mutacij *CDKN2A* *p14<sup>ARF</sup>* in *CDK4* pri slovenskih bolnikih nismo našli.

### Uvod

Genetska osnova nastanka malignega melanoma kože je zelo kompleksna in vključuje več različnih genov. Znano je, da je (določen) del primerov dednih oblik malignega melanoma kože povezan z mutacijami v genih *CDKN2A* (gen za od ciklina odvisni kinazni inhibitor 2A), *CDK4* (gen za od ciklina odvisno kinazo 4) in *MC1R* (gen za receptor za melanokortin 1). Mutacije v omenjenih genih predstavljajo povečano tveganje za nastanek malignega melanoma kože prek najmanj dveh med seboj neodvisnih mehanizmov. Prvi vključuje nezmožnost nadzora celičnega cikla, kar povzroči nekontrolirano delitev celic zaradi mutacij v genih *CDKN2A* in *CDK4* (slika 1). Drugi mehanizem je pigmentacijsko vezana predispozicija, ki je povezana s prisotnostjo določenih alelov za rdeče lase in svetlo polt v genu *MC1R*.

*CDKN2A* velja za najpomembnejši gen, ki je vpleten v nastanek dednega malignega melanoma kože. Večina vzročnih mutacij v tem tumorskem supresorskem genu se nahaja v eksonih 1 $\alpha$  in 2 in večinoma vplivajo na funkcijo proteina *p16<sup>INK4a</sup>*. Nekatere mutacije v eksonu 2 pa vplivajo tudi na funkcijo proteina *p14<sup>ARF</sup>*, ki predstavlja alternativni proteinski produkt gena *CDKN2A*. Vzročne mutacije v eksonu 1 $\beta$  so po podatkih iz literature redke; prizadenejo samo funkcijo proteina *p14<sup>ARF</sup>*. Delež družin, pozitivnih za mutacijo v *CDKN2A*, je na splošno razmeroma majhen in se razlikuje med različnimi populacijami. V italijanski populaciji je na primer 33 % družin z dvema ali več obolelimi člani pozitivnih za mutacijo v *CDKN2A*, medtem ko je v Španiji takih družin 17 %. Manjši odstotek pozitivnih družin je značilen za Avstralijo (8,4 %).



**Slika 1.** Mehanizmi delovanja genov *CDKN2A* in *CDK4*. Gen *CDKN2A* ima dva proteinska produkta/transkripta: *p16<sup>INK4a</sup>* in *p14<sup>ARF</sup>*. Oba proteina imata skupna eksona 2 in 3, ekson 1 pa je različen (ekson 1 $\alpha$  kodira *p16<sup>INK4a</sup>*, ekson 1 $\beta$  kodira *p14<sup>ARF</sup>*). Proteinski produkt *p16<sup>INK4a</sup>* deluje kot tumorski supresor. Z vezavo na kompleks ciklin D1/CDK4 zavira aktivnost kinaz in sproži ustavitev celičnega cikla v fazi G1. Prehod med fazama G1 in S je odvisen od fosforilacije retinoblastoma proteina (pRb) s kompleksom ciklin D1/CDK4. Manjši transkript gena *p14<sup>ARF</sup>* je vpleten v uravnavanje celičnega cikla in apoptoze prek poti p53 in pRb. Interakcija *p14<sup>ARF</sup>* z MDM2 vodi v akumulacijo proteina p53 in inaktivacijo pRb. Mutacije v genu *CDKN2A* vplivajo na funkcijo proteina in povzročijo prezgodnje nadaljevanje celičnega cikla, kar lahko vodi v nastanek rakastih celic. Gen *CDK4* spada med protoonkogene in kodira od ciklina odvisno kinazo 4. Prisotnost mutacije zavira vezavo *p16<sup>INK4a</sup>* proteina, kar onemogoči ustavitev celičnega cikla in vodi v nekontrolirano delitev celice.

Razlike med populacijami so lahko posledica »founder« efekta in/ali prisotnosti drugega, do sedaj neznanega gena, povezanega z malignim melanomom kože, kot je domnevni gen na lokusu 1p22.

Mutacije v genu *CDK4* so v primerjavi s *CDKN2A* še redkejše. Do danes je v svetovnem merilu znanih sedem družin z opisano mutacijo v eksonu 2 gena *CDK4*.

V nasprotju z genom *CDKN2A* in *CDK4*, ki veljata za močno penetrantna, je gen *MC1R* slabo penetranten. Zanj je značilna visoka stopnja polimorfizma v populaciji, kar pomeni, da so spremenjeni aleli pogosti. Gen *MC1R* je vpleten v mehanizme, ki določajo obarvanost las in tip kože. Prisotnost alelov za rdeče lase in svetlo polt za 2- do 4-krat poveča tveganje za nastanek melanoma. Produkt gena je receptor za melanokortin 1, ki se nahaja v membrani kožnih melanocitov. Stimulacija receptorja vodi v evmelanogenezo – to je v tvorbo pigmenta po izpostavitvi UV-žarkom. Evmelanin je prevla-

dujoč pigment pri ljudeh s temnejšo poltjo, je rjavo črn in deluje fotoprotektivno. Rdeče rumen feomelanin ima šibkejšo zaščito pred sončnimi žarki. Je prevladujoč pigment pri rdečelascih, zato je njihova koža ob izpostavljenosti soncu hitro opečena in le malo porjavi. Kakšno bo razmerje pigmentov v koži, je odvisno od prisotnosti alelov v genu *MC1R*.

Za določanje mutacij (sprememb) v omenjenih genih v našem laboratoriju uporabljamo metodo neposrednega sekveniranja oziroma sekvenčno analizo. Preiskava temelji na presejalni tehniki (screening), kar pomeni, da točkovne mutacije ter manjše delecije in insercije iščemo in določamo v eksonih genov *CDKN2A*, *CDK4* in *MC1R* pri vsakem preiskovancu. Metoda neposrednega sekveniranja je standardna metoda in velja za najboljčutiljivejšo, saj omogoča neposredno dokazovanje mesta in vrste mutacije. Kljub napredku molekularne diagnostike je ta metoda še vedno razmeroma draga in zamudna. Poleg tega metoda neposrednega sekveniranja ne omogoča določanja večjih delecij in insercij celih eksonov.

Namen prispevka je prikaz poteka in rezultatov določanja mutacij pri bolnikih z dedno obliko malignega melanoma kože.

## Materiali in metode

### Preiskovanci

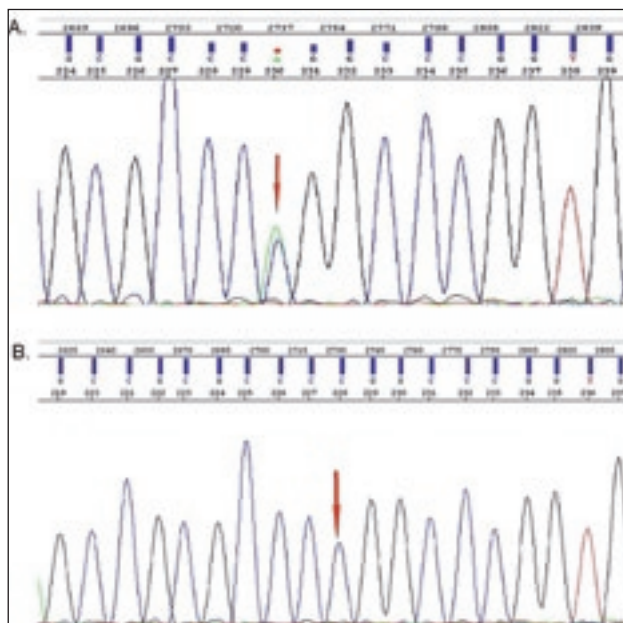
V obdobju 2005–2007 smo testirali 40 bolnikov z družinsko anamnezo in njihovih zdravih sorodnikov iz 28 različnih družin ter 30 bolnikov s primarnimi multiplimi melanomi. V študijo smo vključili tudi 54 zdravih prostovoljcev (kontrolna skupina).

### Potek določanja mutacij z metodo sekvenčne analize

#### Verižna reakcija s polimerazo (PCR) in sekvenčna reakcija

Genomsko DNA smo izolirali iz 10 ml periferne krvi preiskovancev s kompletom QIAamp DNA Blood Maxi kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Prvi korak določanja mutacij v preiskovanih genih s sekvenčno analizo je pomnožitev tistega dela gena, kjer iščemo mutacijo. Z uporabo specifičnih primerjev (oligonukleotidnih začetnikov) in metodo PCR smo pomnožili eksone 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 in 3, vključno z delom promotorske regije in regije 3'-UTR gena *CDKN2A*, ekson 2 gena *CDK4* in kodirajočo sekvenco gena *MC1R*. Sekvence primerjev smo našli v literaturi, pogoje PCR pa smo optimizirali v našem laboratoriju. Uspešnost pomnožitve in pravilno velikost posameznih produktov PCR smo vedno preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pred sekvenčno reakcijo smo posamezni produkt PCR encimsko očistili z reagentom ExoSAP IT (USB, Cleveland, ZDA). Z bioanalizatorjem in uporabo kompleta DNA 1000 Assay Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija) smo izmerili koncentracijo in določili čistost posameznega produkta PCR. Za sekvenčno reakcijo smo uporabili očiščen produkt PCR, primer (forward ali reverse; enaka kot v PCR) in komplet ABI PRISM Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Warrington, Velika Britanija), ki poleg navadnih nukleotidov vsebuje različno fluorescentno označene dideoksinukleotide. Med potekom sekvenčne reakcije se označeni nukleotidi zaradi kemijske modifikacije vedno vežejo na terminalnem koncu. Po sekvenčni reakciji smo tako dobili zmes različno dolgih pomnoženih fragmentov. Sekvenčno reakcijo smo očistili s postopkom etanolne precipitacije. Posamezne vzorce smo analizirali na sekvenatorju ABI 310 (Applied Biosystems). Fragmenti so se po principu kapilarne

elektroforeze ločili po velikosti, zaradi ekscitacije z UV-svetlobo pa so se fluorescentno označeni nukleotidi svetili. Dobili smo kromatogram – izpis sekvence določenega dela gena oz. posameznih eksonov (slika 2).



**Slika 2.** Izpis sekvence – kromatogram po sekvenčni analizi. Na diagramu je prikazan del izpisa sekvence eksona 2 gena *CDKN2A*.  
A. Primer vzorca z mutacijo G101W.  
B. Primer vzorca brez mutacije.

### Sekvenčna analiza in potrditev mutacij

Pri sekvenčni analizi eksonov preiskovanih genov smo posamezni kromatogram oziroma izpis sekvence primerjali z originalno sekvenco iz baze podatkov GeneBank. Analizo smo naredili z vizualnim branjem sekvenc in z računalniškim programom Gene Runner, verzija 3.05. Posamezne sekvence smo prebrali v obe smeri. Spremembe v sekvenci gena (DNA), ki so se razlikovale od originalne sekvence, smo označili in oštevilčili glede na referenčne sekvence za posamezni gen: gen *CDKN2A* (GeneBank accession, št. AF527803 in X94154), gen *CDK4* (GeneBank accession, št. AF507942) in gen *MC1R* (GeneBank accession, št. AF63461). Določeno spremembo v posameznem genu smo opredelili kot mutacijo (ali polimorfizem) glede na razvrstitev v bazi HGMD in po podatkih iz literature. Vsako določeno mutacijo (spremembo) smo potrdili s ponovitvijo PCR in sekvenčne reakcije z uporabo svežega vzorca preiskovanceve DNA.

## Rezultati in diskusija

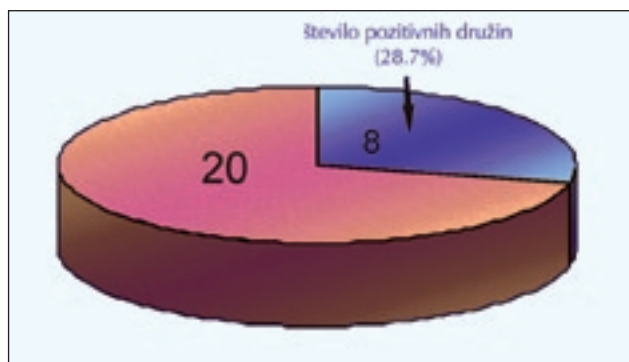
Iskanje in določanje neznanih točkovnih mutacij ter manjših delecij in insercij v eksonih genov *CDKN2A*, *CDK4* in *MC1R* s sekvenčno analizo omogoča odkrivanje posameznikov, pri katerih je tveganje za nastanek malignega melanoma kože povečano.

Pri nosilcih mutacije v genu *CDKN2A* je tveganje za pojav malignega melanoma kože do 50. leta starosti 13-odstotno, do 80. leta pa 58-odstotno. Podatek velja za Evropo. Večina

do danes opisanih mutacij v genu *CDKN2A* spada v skupino drugačnopomenskih (missense) mutacij. To pomeni, da spremenjeni nukleotid v sekvenci gena povzroči zamenjavo aminokislina, s čimer spremeni funkcijo proteina. Manjši del mutacij pa so manjše delecije in insercije ter mutacije, ki spremenijo bralni okvir prepisovanja gena. Po podatkih GenoMEL (Melanoma Genetics Consortium) je opisanih skoraj 40 različnih mutacij v tem genu, od tega pa se le dva odstotka pojavljata v več kot eni družini.

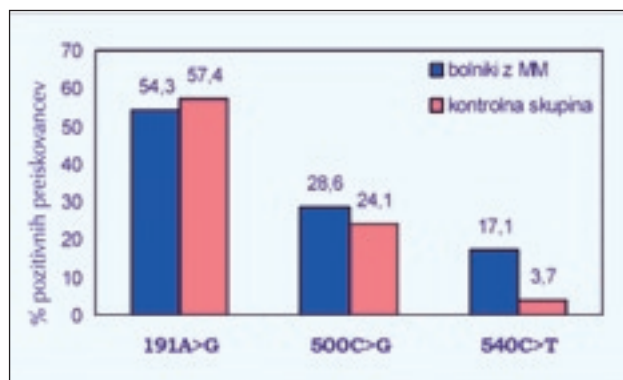
Med slovenskimi družinami, med katerimi je večina imela dva obolela člana, je bilo 28,7 % pozitivnih za mutacijo v genu *CDKN2A* (slika 3). Glede na podatke iz različnih študij je povprečno 20 % družin pozitivnih za mutacijo v genu *CDKN2A* (v razponu od < 5 % do > 50 % v posameznih študijah). Naš rezultat je primerljiv z italijansko populacijo, kjer je takih družin 33 %. S sekvenčno analizo smo v osmih od 28 družin določili pet različnih mutacij, med katerimi je bila najpogostejša G101W (pri treh od osmih družin). Ta mutacija je značilna za jugovzhodno Evropo in je najpogosteje opisana mutacija, povezana z nastankom malignega melanoma kože. Dve mutaciji sta bili prvič opisani pri slovenskih družinah. V tabeli 1 so našete vse določene spremembe (varianete) v eksonih gena *CDKN2A*.

Po primerjavi bolnikov s kontrolno skupino (zdravimi preiskovanci) smo ugotovili veliko pogostost mutacij v *CDKN2A* pri bolnikih z družinsko anamnezo, in sicer pri 37,5 %. V kontrolni skupini smo pri treh od 54 preiskovancev določili spremembo (varianto) v kodirajoči regiji gena *CDKN2A*, in sicer dva polimorfizma in varianto D153E v eksonu 2 z do sedaj še neznanim vplivom na funkcijo proteina p16<sup>INK4a</sup>. Med bolniki z multiplimi primarnimi melanomi pa je bila sprememba (varianta) prisotna pri treh od 30 bolnikov. Pri dveh bolnikih je bil prisoten polimorfizem A148T, ki po podatkih iz literature ne vpliva na funkcijo proteina p16<sup>INK4a</sup>. Pri enem bolniku z multiplimi primarnimi melanomi pa smo določili varianto D84N, za katero do zdaj ni znano, da vpliva na funkcijo proteina. Glede na nam dostopne podatke še nobena od omenjenih variacij z neznanim vplivom ni opisana v literaturi (tabela 1). Vse določene mutacije za protein p16<sup>INK4a</sup> so se nahajale v eksonu 1α ali v eksonu 2, nobene mutacije za alternativni protein p14<sup>ARF</sup> pa nismo določili v eksonu 1β.



**Slika 3.** Delež družin, pozitivnih za mutacijo v genu *CDKN2A*.

Z izbranimi specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki smo s sekvenčno analizo gena *CDKN2A* zajeli tudi del promotorske regije in regije 3'-UTR. Variante, ki se nahajajo v bližini eksonov, lahko vplivajo na izrezovanje eksonov pri transkripciji genov, s tem pa tudi na funkcijo proteinskega produkta. Ne-



**Slika 4.** Razširjenost variant v intronski regiji gena *CDKN2A* pri bolnikih z malignim melanomom kože in pri zdravih prostovoljcih (kontrolna skupina). V promotorski regiji gena je bila tako pri bolnikih kot zdravih preiskovancih pogosta varianta -191MetA>G. V regiji 3'-UTR smo določili dve varianti: 500C>G in 540C>T. Statistično značilna razlika v razširjenosti med skupinama je bila v primeru 540C>T.

MUTACIJA	Družinska anamneza (n = 40)	Primeri multipli MM (n = 30)	Kontrolna skupina (n = 54)	družinska anamneza
G23D	3	0	0	37.5%
R24P	2	0	0	
D84N	0	1	0	
L94Q	5	0	0	16.7%
G101W	4	0	0	
D153E	0	0	1	
IVS1-G>A	1	0	0	
A148T*	1	2	1	
F23P*	0	0	1	
SKUPAJ	15	3	3	11.1%

**Tabela 1.** Mutacije in polimorfizmi v genu *CDKN2A*, določeni s sekvenčno analizo.

V genu *CDKN2A* smo s sekvenčno analizo določili sedem različnih mutacij. Vse so se nahajale v eksonih 1α in 2. Mutaciji L94Q in IVS1-1G>A sta bili prvič opisani pri slovenskih družinah. Za D84N in D153E še ni znan vpliv na funkcijo proteina. Določili smo tudi dva polimorfizma\*, ki ne vplivata na funkcijo proteina. Pri izračunu deleža preiskovancev, pozitivnih za spremembo v genu *CDKN2A*, smo upoštevali vseh devet določenih sprememb v kodirajoči regiji gena (grafi na desni).

katere variante v intronski regiji se lahko pogosteje pojavljajo pri določeni skupini bolnikov. Pri naših preiskovancih smo določili tri različne variante v intronski regiji gena *CDKN2A*. V promotorski regiji je bila pogosta varianta -191MetA>G, v regiji 3'-UTR pa varianti 500C>G in 540C>T. Na sliki 4 je prikazano, kakšna je razširjenost teh variant pri bolnikih v primerjavi s kontrolno skupino. Nekatere študije poročajo o večji prevalenci teh variant pri bolnikih z malignim melanomom kože, vendar je povezanost še nejasna. Rezultati sekvenčne analize pri naši skupini preiskovancev so pokazali statistično značilno razliko med bolniki in kontrolno skupino samo pri varianti 540C>T (P = 0,003).

V eksonu 2 gena *CDK4* je sekvenčna analiza pokazala odsotnost mutacij pri slovenskih družinah in pri bolnikih z multiplimi primarnimi melanomi. Rezultat je pričakovan, saj so mutacije v tem genu zelo redke in značilne za družine z več obolelimi člani.

Pogostost alelov (%)		
Varianta	Bolniki	Kontrolna skupina
V60L	8,60	8,30
V92M	10,10	8,30
R142H	0,80	0,00
<b>R151C</b>	9,40	5,50
I155T	0,80	0,00
<b>R160W</b>	8,60	7,40
R163Q	4,70	3,70
R213W	0,80	0,00
A218T	0,00	0,90
G239G	0,00	0,90
<b>c.754delC</b>	0,80	0,00
<b>L286V</b>	1,60	0,00
<b>D294H</b>	0,80	0,00
T314T	10,90	9,20
S316S	0,00	0,90

**Tabela 2.** Pogostost spremenjenih alelov v genu *MC1R* pri bolnikih z malignim melanomom kože in pri zdravih prostovoljcih. V genu *MC1R* smo določili 15 različnih variant. Poudarjene so t. i. variante RHC, povezane z rdečimi lasmi in svetlo poltjo. Varianti, označeni z oranžno barvo, sta bili prvič opisani pri slovenskih družinah.

V genu *MC1R* smo določili 15 različnih variant (sprememb). Pogostost alelov je bila podobna med bolniki in kontrolno skupino, kar je v skladu s študijami na drugih evropskih populacijah (tabela 2). Tveganje za nastanek malignega melanoma kože dokazano povečajo t. i. variante RHC (R151C, R160W, D294H), ki so povezane z rdečimi lasmi in svetlo poltjo. Ti spremenjeni aleli so bili pogostejši pri bolnikih, vendar ta razlika v primerjavi s kontrolno skupino ni bila statistično značilna. Po podatkih iz literature lahko prisotnost spremenjenih alelov v genu *MC1R* vpliva na penetranco mutacij *CDKN2A*. Penetranca se ob prisotnosti spremenjenih alelov RHC poveča s 50 % na 84 % pri nosilcih, obenem pa se zmanjša tudi starost pojava bolezni z 58,1 leta na 37,8 leta. Zaradi

velike polimorfnosti gena *MC1R* je vpliv posameznih variant na tveganje za nastanek malignega melanoma kože težko opredeliti. Na našem oddelku rezultate sekvenčne analize zato podajamo samo glede na podatke iz baze HGMD in dostopne literature.

### Sklep

Gensko testiranje za dedno obliko malignega melanoma kože na našem oddelku uspešno poteka s sekvenčno analizo genov, povezanih z nastankom malignega melanoma kože. Ker ta metoda ne more odkriti večjih delecij in insercij, trenutno poteka vpeljevanje metode MLPA (metoda hkratnega pomnoževanja od ligacije odvisnih sond) za gen *CDKN2A*. S tem bomo povečali občutljivost testiranja, saj omenjena metoda omogoča odkrivanje delecije ali duplikacije celih eksonov gena.

Glede na naše rezultate in podatke iz drugih študij ostaja razmeroma veliko število družin negativnih za mutacijo v genu *CDKN2A*. Zato so študije na tem področju usmerjene v iskanje novih genov, povezanih z nastankom malignega melanoma kože. Z vključitvijo v projekt GenoMEL k tem raziskavam prispeva tudi OI.

### Viri

1. Bishop D.T. et al. Geographical Variation in the Penetrance of *CDKN2A* Mutations for Melanoma. *J of National Cancer Institute* 2002; 94 (12): 894–903.
2. Harland M. et al. A comparison of *CDKN2A* mutation detection within the Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). *Eur J of Cancer* 2008, doi:10.1016/j.ejca.2008.03.005.
3. Box N.F. et al. *MC1R* Genotype Modifies Risk of Melanoma in Families Segregating *CDKN2A* Mutations. *Am. J.Hum.Genet.* 2001; 69:765–773.
4. Bressac-dePaillerets B. et al. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie* 2002; 84: 67–74.
5. Avbelj M, Hocevar M, Trebusak-Podkrajsek K, Krzisnik C, Battelino T. A novel L94Q mutation in the *CDKN2A* gene in a melanoma kindred. *Melanoma Res.* 2003; 13: 567–70.
6. Zuo L, Weger J, Yang Q et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of *CDK4* in familial melanoma. *Nature Genetics* 1996; 12: 97–9.
7. Kanetsky PA, Ge F, Najarian D, et al. Assessment of polymorphic variants in the melanocortin-1 receptor gene with cutaneous pigmentation using an evolutionary approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 808–19.