

FACTORI GENETICI IMPLICAȚI ÎN ETIOPATOGENIA MELANOMULUI

ELISABETA CANDREA*, RODICA COSGAREA**

București

Rezumat

Incidența melanomului este în continuă creștere în Australia, Europa și Statele Unite ale Americii. Eforturi susținute se îndreaptă pentru o mai bună înțelegere a etiopatogenezei. Deși nu se cunoaște cauza ce determină formarea acestui neoplasm, asocierea dintre factorii de mediu și factorii genetici creează contextul potrivit pentru dezvoltarea melanomului. Unele familii prezintă prin predispoziție genetică un risc crescut pentru dezvoltarea melanomului; cele mai multe cazuri sunt sporadice, prezentând probabil gene cu risc moderat sau scăzut. În acest articol ne-am propus să ne focalizăm asupra principalelor gene implicate în etiopatogenia melanomului.

Cuvinte cheie: melanom, CDKN2A, CDK4, ABCB5, Calea RAS/RAF/MEK/ERK, Calea P13K/PTEN/AKT, MDM2, MC1R.

Summary

The incidence of melanoma is continuously increasing in Australia, Europe and the United States. Outstanding research is performed in order to provide a better understanding of the etiopathogenesis. Although the underlying cause has not yet been identified, association between environmental and genetic factors create the proper environment for the development of melanoma. Certain families have a high risk of acquiring melanoma through genetic predisposition, but most cases are sporadic, probably having low or moderate risk genes. The purpose of this article is to underline the most important genes involved in the etiopathogenesis of melanoma.

Key-words: CDKN2A, CDK4, ABCB5, RAS/RAF/MEK/ERK pathways, P13K/PTEN/AKT, MDM2, MC1R pathways.

DermatoVenerol. (Buc.), 55: 55-61

Incidența melanomului a suferit o creștere semnificativă în ultimii ani în Australia, Europa și Statele Unite ale Americii. În 2005, în Statele Unite, incidența corectată pentru vârstă este de 24.6/ 100.0000 la barbati și 15.6/ 100.000 la femei (1). Procentul anual estimat de modificare a incidenței este de aproximativ 2.9% în USA, procent ce nu reflectă însă variabilitatea incidenței (2).

Melanomul este un cancer complex, heterogen, incidența căruia diferă în funcție de sex, vârsta, grup etnic și zonă (2). Se estimează că în cursul anului 2009 în Statele Unite ale Americii vor fi 68.720 cazuri noi de melanom, din care

39.080 la bărbați, respectiv 5% din totalul cancerelor nou diagnosticate la bărbați și 4% la femei. (3) Factorii genetici și de mediu au efect complementar în apariția melanomului. Principalele mecanisme prin care se produc mutații la nivelul ADN-ului sunt: mutații ale proto-oncogenelor, mutații sau deleții ale genelor supresoare și modificări ale structurii cromozomiale. Istoricul familial de melanom crește riscul pentru dezvoltarea acestui tip de cancer de aproximativ 2-3 ori (4).

Genă CDKN2A, cunoscută și sub denumirea de *INK4a/ARF*, este asociată în proporție de 39% cu melanomul familial și se corelează cu vârsta

* U.M.F. „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca.

** U.M.F. „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca.

precoce la momentul diagnosticului, cu melanoame multiple la membrii de familie sau cancer pancreatic (5). *Goldstein și colaboratorii* au desfășurat un studiu pe 385 de familii în care s-au obiectivat 3 sau mai multe cazuri de melanom (în cadrul aceleiași familii) și s-a constatat faptul că procentul persoanelor care sunt *CDKN2A* pozitive diferă în funcție de zona geografică: 20% în Australia au *CDKN2A* pozitiv, 45% în America de Nord și 57% în Europa. (5).

Gena *INK4a/ARF* este localizată pe cromozomul 9p21. Această genă codează p16^{INK4A} și p14^{ARF}, două proteine importante ale ciclului celular. (6) Aceste proteine sunt supresoare tumorale, fiind necesară mutație la ambele alele pentru a produce oncogeneza.

Legarea alternativă și citirea alternativă a exonilor permit locusului *CDKN2A* să codeze doi ARN mesageri diferiți și să formeze două proteine separate. Astfel, proteina p16^{INK4A} este alcătuită din legarea exonilor 1α cu exonii 2 respectiv 3. Proteina p14^{ARF} se compune din legarea exonilor 1β cu exonii 2 și 3. Deși aceste proteine sunt determinate de același locus genetic, ele au structuri diferite și funcționează în cadrul unor procese separate. Este evident faptul că o modificare la nivelul locusului genetic afectează funcția ambelor proteine.

Proteina p16^{INK4A} acționează prin inhibarea competitivă a kinazei 4 ciclin- dependente (*CDK4*). *CDK4* interacționează cu ciclina D și participă la fosforilarea proteinei retinoblastom (Rb). Proteina Rb în stare activă (defosforilată) leagă E2F, care nu poate participa la progresia ciclului celular (vezi fig 1). O mutație la nivelul genei *CDKN2A* determină o mutație la nivelul proteinei p16; aceasta nu poate inhiba *CDK4*, Rb rămâne inactivă, nelegată de E2F. Consecința acestei reacții chimice este progresia în faza S a ciclului celular, respectiv diviziunea și proliferarea celulelor tumorale. Astfel, o mutație la nivelul genei *INK4a/ARF* duce la pierderea funcției p16, crescând astfel șansele ca mutațiile de ADN să nu fie reparate și astfel propagate în următorul ciclu al diviziunii celulare (7).

Cea de-a doua proteină implicată, p14^{ARF}, inhibă degradarea p53 prin mecanisme independente dar și în asociere cu MDM2 (mouse double minute 2 homolog) (8). Rolul p53 este de a

observa defectele genetice și a permite repararea ADN sau de a iniția procesul de apoptoză al celulelor mutante. Proteina p14^{ARF} cu mutație genică nu mai leagă MDM2, care este eliberat și distruge proteina p53 prin ubiquinare (9). Astfel, celulele mutante supraviețuiesc și trec în procesele următoare de diviziune celulară. Deși majoritatea mutațiilor apar la nivelul exonilor 1α și 2, există mutații și la nivelul exonului 1β și acestea afectează în principal proteina p14^{ARF} (9). În familiile cu acest tip de defect genetic s-a constatat apariția frecventă a melanomului și a tumorilor de sistem nervos.

Mutații în cadrul aceluiași ciclu celular, dar la nivelul genei *CDK4*, au fost de asemenea identificate la pacienții cu melanom. O astfel de mutație determină gena *CDK4* să fie rezistentă la acțiunea p16^{INK4A}, producându-se un fenotip asemănător celui prezentat mai sus. Cele mai frecvente mutații se produc la nivelul codonului 24 (10). Mutații la nivelul genei *CDK4* sunt alele oncogene, o singură mutație fiind capabilă de a produce oncogeneza (9). Totuși, frecvența mutației *CDK4* este mult mai redusă în comparație cu frecvența *CDKN2A*. În cadrul studiului GenoMEL realizat pe 466 familii din America de Nord, Europa, Australia și Asia, *Goldstein și colaboratorii* au evaluat prevalența celor 2 mutații s-au obiectivat următoarele: 41% sau 190 familii au prezentat mutații genetice; la 178 familii a existat mutație la p16, la 5 familii, respectiv 1.8% s-au constatat mutații ale *CDK4* și la 7 familii, respectiv 2.5% mutații ale p14ARF (11).

La pacienții cu melanom s-au obiectivat mutații ale genei retinoblastom (RB1). Conform datelor mai sus prezentate, o mutație la nivelul acestei gene previne legarea eficientă a acesteia de E2F. Consecința este progresia celulelor mutante în diviziunea celulară. Deși retinoblastomul ereditar este manifestarea cea mai elocventă a acestei mutații, s-a constatat faptul că pacienții care supraviețuiesc acestei patologii prezintă un risc de 80 de ori mai mare pentru dezvoltarea unui melanom în cursul vieții (12)

CMM4 (cutaneous malignant melanoma 4) este o genă cu penetranță crescută. A fost identificată prin studiul a peste 80 familii cu cel puțin trei cazuri de melanom (în cadrul aceleiași familii). Având în vedere faptul că cel puțin 40%

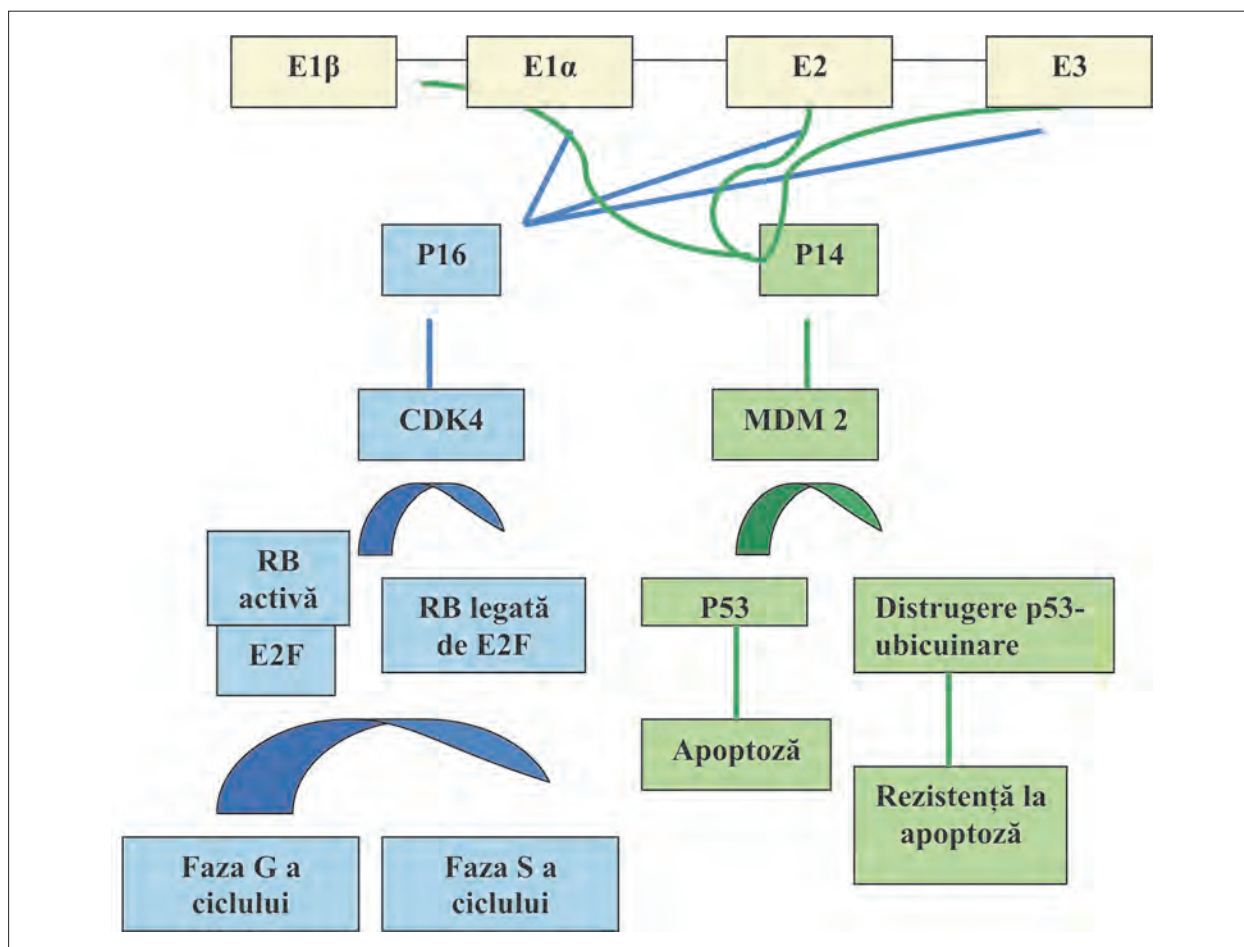


Fig. 1. Structura și funcția CDKN2A

din familiile cu melanom nu prezintă mutații ale genelor *CDKN2A* sau *CDK4*, rămâne de cuantificat proporția celor care dețin mutația genei *CMM4* (13).

Calea *Ras/Raf/MEK/ERK* este implicată la rândul ei în melanogeneză. Este cunoscută ca și calea de activare a proteinkinazei pe cale mitogenică (MAPK) și reprezintă o cascadă de semnale extracelulare provenite de la nivelul membranei plasmatică la nivelul nucleului (14). Această cale de transmitere se concretizează printr-o serie de fosforilări enzimatică. Reglarea semnalului RAS se face printr-o legare alternativă a RAS de GTP (guanozin trifosfat) ce corespunde stării active, și GDP (guanozin difosfat) ce corespunde stării inactive. (15) O serie de stimuli, printre care și activatorul receptorului tirozin kinazei, determină activarea RAS. Ca o consecință

a acestui proces, *RAF* ajunge de la nivelul citosolului la nivelul membranei celulare unde va fi activat. Prin intermediul acestuia se realizează fosforilarea și activarea kinazelor extracelulare MAP semnal dependente 1 și 2 (MEK1 și MEK 2), care la rândul lor inițiază activarea kinazelor extracelulare semnal dependente 1 și 2 (ERK 1 și 2) (16); în interiorul nucleului acestea determină fosforilarea anumitor factori de transcripție nucleari ce vor lega precursorii anumitor gene (incluzând factorul de creștere și gene citokine) cu rol esențial în creșterea, diferențierea celulară și supraviețuirea anumitor tipuri de celule (16, 17).

Interesant de menționat este faptul că peste 90% din mutațiile *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) în melanom implică substituția acidului valinic cu acidul glutamic în

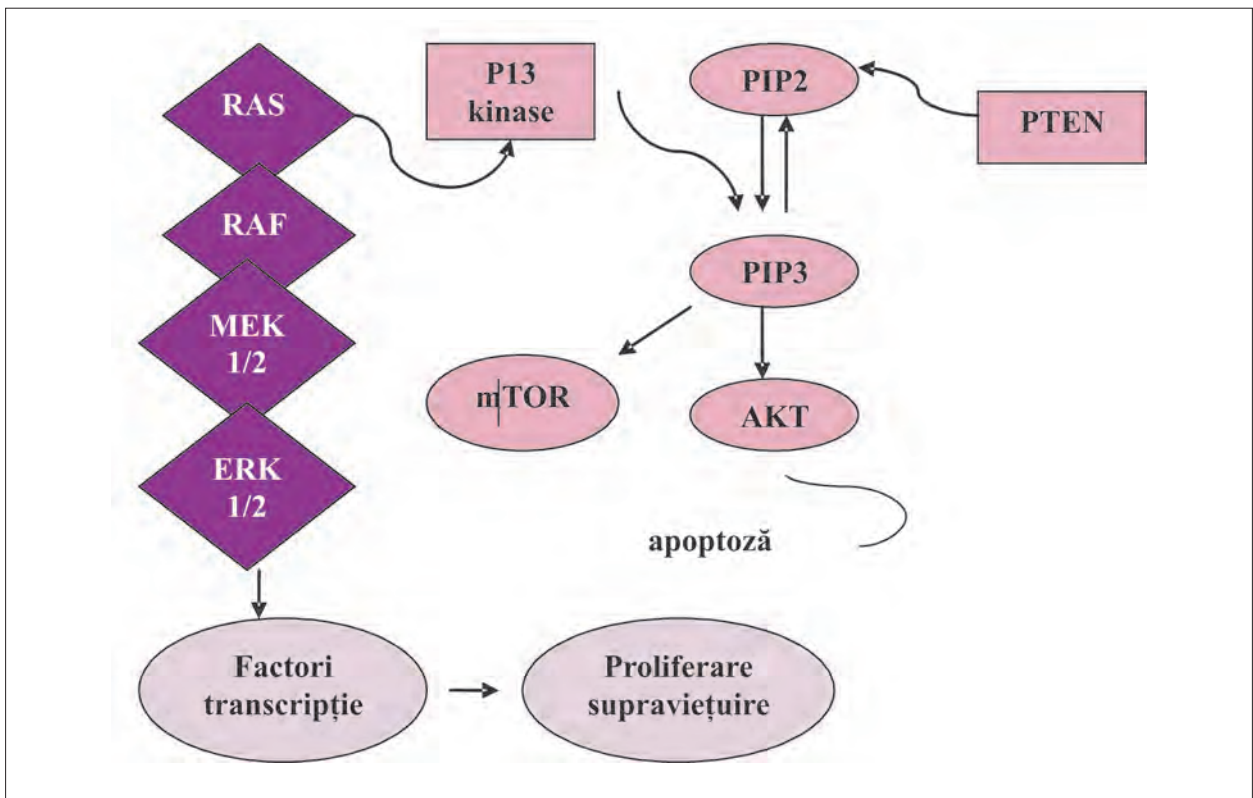


Fig. 1. Structura și funcția CDKN2A

domeniul kinazei (V600E). Mutația *RAF* se constată la 50-70% din cazurile de melanom (15).

Mutații la nivelul genelor din prima parte a cascadei (*RAS*, *RAF* precum și a altor gene) determină un semnal ERK constitutiv ce va stimula proliferarea și supraviețuirea celulelor tumorale (18). Acest tip de mutație este foarte frecvent în cadrul melanoamelor sporadice, fiind obiectivat în 47- 66% din cazurile de melanom (8); având în vedere faptul că 82% din nevii displazici prezintă mutații la acest nivel, devine necesară găsirea căilor adiacente care favorizează creșterea și proliferarea tumorală (8).

Calea P13K/PTEN/AKT este inițiată prin activarea kinazei P13 (fosfoinozimid-3-OH) ce va duce la transformarea PIP2 în PIP3 (fosfatidilinozitol 3, 4, 5 trifosfat) cu stimularea AKT. Prin activarea consecutivă a Bcl-2 se constată blocarea apoptozei celulare, activarea ciclului celular, creșterea translațiilor proteice mediate de mTOR și creșterea nivelului de telomerază (8). PTEN (omologul fosfataz-tensinei

înlăturat de la nivelul cromozomului 10) este o genă supresoare tumorală care oprește progresia ciclului celular prin transformarea PIP3 înapoi la forma de PIP2. Mutații, deleții sau inactivări ale genei se constată în 30-60% din pacienții cu melanom. Mutații la nivelul acestei gene au ca și consecință supraexpresia AKT3 (19). Expresia acestuia este crescută în aproximativ 70% din tumorile maligne, contribuind de asemenea la diminuarea apoptozei și la tumorigeneză (20).

Dezechilibrarea balanței dintre melanocit și keratinocit perturbă aderența celulară precum și transmiterea semnalelor la nivel intercelular.

Proteina p53 este un supresor tumoral important; deși se surprind frecvent mutații ale acestei gene în diferite neoplazii, în cazul melanomului acestea sunt rare. **MDM2** participă la reglarea negativă a lui p53. În cazul melanomului, această genă este supraexprimată în 50-60% din cazuri fără a fi cunoscut mecanismul prin care se produce această modificare (21). Un studiu prospectiv desfășurat pe 225

subiecți a obiectivat prezența în procent crescut la tinere paciente cu melanom a mutației MDM2 SNP309, indicând faptul că acest genotip ar putea fi un factor de risc pentru dezvoltarea melanomului(22).

Polimorfismul G309 ar putea fi implicat în cascada moleculară a melanomului (21). Datele obținute deocamdată necesită a fi completate de studii ulterioare.

Modificările genetice la pacienții cu melanom contribuie la diminuarea sau inhibarea apoptozei prin mutații ale genelor p53, ARF, ARAF1, PTEN (phosphatase and tensin homolog), PTK (protein tyrosine kinases) precum și mutații ale NRAS și BRAF (13).

În cazul genelor cu risc mai redus, fenotipul este legat și de trăsături pigmentare generale precum culoarea pielii și a părului sau sensibilitatea la soare. **MC1R** (receptorul melanocortinei 1) este receptorul pentru hormonul de stimulare α melanocitar precum și al antagonistului acestuia, agouti (9). În urma legării de acesta, are loc activarea proteinei G, care la rândul ei stimulează adenilat ciclaza, crescând astfel concentrația intracelulară de cAMP (25). Nivelul ridicat de cAMP influențează producerea eumelaninei închise în defavoarea feomelaninei roșii; eumelanina accentuează pigmentarea pielii și protejează împotriva radiațiilor ultraviolete (24). Anumite variante ale MC1R sunt asociate cu părul roșcat și pielea deschisă la culoare (p.Asp84Glu, p.Arg151Cys, p.Arg160Trp și p.Asp294His) (24). Studii anterioare indicau creșterea riscului de dezvoltare a melanomului de 3.9 ori la persoanele care aveau o mutație de MC1R (25). După corecția pentru tipul de piele, s-a obiectivat creșterea riscului de melanom de 2.7 ori pentru o variantă a MC1R și de 3.6 ori pentru două mutații ale acestei gene(26). Observăm relația complexă între genotip și fenotip precum și faptul că riscul de dezvoltare a melanomului este influențat de fototip. O meta-analiză efectuată de *Raimondi și colaboratorii* arată asocierea dintre melanom și toate variantele de MC1R (27). Pe lângă faptul că MC1R are penetranță redusă, el deține și rolul de genă modificatoare a riscului la melanom. Astfel, cele mai multe familii cu mutație la nivelul CDKN2A dețin cel puțin o variantă a MC1R. În cazul acestor persoane, după ajustarea

în funcție de vârstă, nevi și pigmentație, mutația MC1R crește riscul de dezvoltare a melanomului de 7 ori (28).

Mediatorul de chemorezistență ABCB5 influențează celulele progenitoare de la nivelul pielii sănătoase (29) și este implicat în geneza tumorală a melanomului(30). Deși secvențele patogenetice la nivel molecular încă nu sunt deplin cunoscute, rezultatele unui studiu efectuat de *Schatton și colaboratorii săi* pe linii celulare melanomatoase, respectiv un studiu in vivo, dovedesc implicarea *ABCB5* în tumorigeneză (30). Celulele tumorale *ABCB5+* obiectivate la pacienții cu melanom demonstrează un fenotip molecular primar și se corelează cu progresia clinică a melanomului. În experimente de xenotransplantare a liniilor celulare de la om la șoarece s-a constatat faptul că celulele melanomatoase *ABCB5+* au o capacitate tumorigenă mai crescută în comparație cu *ABCB5-*. Experimentul in vivo desfășurat de același grup de cercetători obiectivează capacitatea subpopulației *ABCB5+* de diferențiere și dezvoltare, deoarece celulele tumorale *ABCB5+* generează atât celulele *ABCB5+* cât și *ABCB5-* însă populațiile *ABCB5-* contribuie doar la apariția celulelor *ABCB5-*. S-a testat efectul unui anticorp monoclonal anti *ABCB5* și s-a observat faptul că administrarea sistemică a acestui anticorp a avut efecte antitumorale. Identificarea unor astfel de gene care permit o terapie țintită reprezintă un potențial obiectiv al terapiei. Desigur, acest studiu trebuie completat de experimente adiacente.

Sulem și colaboratorii săi identifică locusuri cu risc adițional pentru melanom. S-au obiectivat următoarele: variante ale genei *TPCN2* se corelează cu culoarea părului, o mutație agouti se corelează cu sensibilitatea pielii la soare, pistrui și păr roșcat (fenotip asemănător persoanelor *MC1R* pozitive) (31). Un anumit haplotip al locusului *ASIP* (agouti) s-a asociat puternic cu melanomul cutanat. S-a reușit stabilirea unei corelații statistice între varianta *TYR* (tyrosinase related protein), *TYRP1* și riscul pentru melanom (31). Asocierea dintre *ASIP* și riscul de dezvoltare a melanomului a fost confirmat de Brown și colaboratorii (32). Astfel de mutații sunt sugestive pentru asocierea cu melanomul cutanat.

Concluzii

Datele cele mai importante obținute în cercetările legate de melanom se obțin din studii desfășurate la nivel molecular. Astfel, se aduc permanent argumente ce susțin implicarea în patogeneză a mutațiilor la nivelul căilor CDKN2A, RAS/RAF/MEK/ERK, P13K/PTEN/AKT. Mediatorul de chemorezistență ABCB5 este o noutate importantă în domeniu iar MDM2, prin reglarea negativă a lui p53, influențează de asemenea riscul de melanom. MC1R este o genă cu risc redus, care crește semnificativ riscul de dezvoltare a melanomului când se asociază cu mutația unei alte gene. ASIP, TYR și TYR1 sunt locusuri sugestive pentru asocierea cu melanomul cutanat.

Intrat în redacție: 2.11.2009

Bibliografie

- 1 Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. – SEER Cancer statistics review, 1975–2005. Bethesda (MD): National Cancer Institute; 2008.
- 2 Tucker M. – Melanoma Epidemiology. *Hematol Oncol Clin N Am* 2009; 383-395.
- 3 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. – Cancer Statistics 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59; 225-249.
- 4 Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. – Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005; 41 (14): 2040–59.
- 5 Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F et al. – Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J. Med Genet* 2007; 44 (2): 99-106.
- 6 Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. – Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83: 993-1000.
- 7 Bologna J, Jorizzo J.L, Rapini R. – *Dermatology*. Mosby 2003. 1789-1815.
- 8 Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M. – *Braun-Falco's dermatology* 3rd edition. Springer medicin Verlag Heidelberg. 2009
- 9 Nelson A, Tsao H. – Melanoma and genetics. *Clinics in dermatology* 2009; 27, 46-32.
- 10 Soufir N, Avril MF, Chompret A et al. – Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma prone families in France. The French Familial Melanoma Stdy Group. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 209-16.
- 11 Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al. – High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* 2006; 66 (20): 9818–28.
- 12 Chin L, Garraway LE, Fisher D. – Malignant melanoma: genetics and therapeutics in genomic era. *Genes Dev* 2006; 20: 2149-82.
- 13 Gray-Schopfer V, Bennett D. – The Genetics of melanoma 472-488 în *The pigmentary Sistem*. 2nd edition. Blackwell Publishing Oxford. 2006.
- 14 Garnett MJ and Marais R – Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*, 2004, 6: 313- 319.
- 15 Berger M, Garraway L. – Applications of genomics in melanoma oncogene discovery. *Hematol Oncol Clin N Am* 2009. 397-414.
- 16 Russo A.E, Torrisi E et al. – Melanoma: Molecular pathogenesis and emerging target therapies. *International Journal of Oncology* 2009, 34: 1481-1489.
- 17 Domina AM, Vrana JA, Gregory MA, Hann SR and Craig RW – MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23: 5301-5315, 2004.
- 18 McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM and Franklin RA: Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1263-1284, 2007.
- 19 Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L and Robertson GP – Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 64: 7002-7010, 2004.
- 20 Sharma A, Sharma A.K et al. – Targeting Akt3 signaling in malignant melanoma using isoselenocyanates. *Clin Cancer Res*. 2009, 15(5): 1674-85.
- 21 Gluck I, Simon A.J et al. – Germline analysis of thymidine/guanidine polymorphism at position 309 of the Mdm2 promoter in malignant melanoma patients. *Melanoma Res*. 2009.
- 22 Firoz E.F, Warycha M et al. – Association of MDM2 SNP309, age of onset, and gender in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009. 15(7): 2573-80.
- 23 Garcia-Borron JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C. – Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 2005; 18: 393–410.

- 24 Udayakumar D, Tsao H – Melanoma genetics: an update on risk- associated genes. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2009; 415- 429.
- 25 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.
- 26 Kennedy C, ter 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 color. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 294–300.
- 27 Raimondi S, Sera F, Gandini S, et al. – MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2008; 122: 2753–60.
- 28 Goldstein AM, Landi MT, Tsang S, et al. – Association of MC1R variants and risk of melanoma in melanoma-prone families with CDKN2A mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14 (9): 2208–12.
- 29 Frank, N. Y et al. – Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP binding cassette transporte. *J. Biol. Chem.* 278, 47156- 47165 (2003).
- 30 Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M et al. – Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008; 451: 345- 349.
- 31 Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, et al. – Two newly identified genetic determinants of pigmentation in *Europeans*. *Nat Genet* 2008; 40: 835–7.
- 32 Brown KM, Macgregor S, Montgomery GW, et al. – Common sequence variants on 20q11.22 confer melanoma susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40: 838–40.