

Сравнительный анализ молекулярных нарушений в патогенезе увеальной меланомы и меланомы кожи

И.К. Манохина¹, В.В. Землякова^{1,2}, Н.В. Склярова³, С.В. Саакян³, Д.В. Залетаев^{1,2}

¹НИИ молекулярной медицины Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова

²ГУ «Медико-генетический научный центр РАМН»

³ФГУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца Минздравсоцразвития»

Меланоциты кожи и увеального тракта происходят из одних и тех же клеток-предшественников — меланобластов. Общее происхождение и некоторые гистологические характеристики дают возможность предположить, что ключевые этапы канцерогенеза в этих клетках также могут быть сходными. В работе рассмотрена вовлеченность основных молекулярных повреждений, характерных для меланомы кожи, в патогенез увеальной меланомы. Несмотря на предлагаемые доводы в пользу общего патогенеза увеальной меланомы и меланомы кожи, анализ молекулярных нарушений в увеальной меланоме в основном не выявляет повреждений, характерных для меланомы кожи.

Ключевые слова: канцерогенез, меланобласты, мутации, геномная ДНК.

Российский офтальмологический журнал 2010; 2:13–15

Меланоциты кожи и увеального тракта происходят из одних и тех же клеток-предшественников — меланобластов, которые в период эмбрионального развития мигрируют из нервного гребня в разные органы и ткани [6]. В отличие от меланоцитов кожи процессы регуляции клеточного цикла и дифференцировки, а также основные этапы канцерогенеза в меланоцитах увеального тракта изучены недостаточно.

Для меланомы кожи (МК) (рис. 1) уже выявлены крупномасштабные хромосомные нарушения, реконструированы сигнальные каскады, нарушение работы которых приводит к развитию заболевания, а также описаны гены-кандидаты [5]. Многочисленные данные свидетельствуют о нарушении регуляции как минимум трех сигнальных каскадов в МК. Активация каскада *Ras-Raf-MEK-ERK* происходит в результате мутаций генов *BRAF* и *NRAS*. Активация каскада *PI3K-AKT* усиливается благодаря частым делециям в локусе *P TEN*, локализованном на длинном плече хромосомы 10. Эти сигнальные пути контролируют последовательность событий клеточного цикла и регулируют ключевые функции клеток, в том числе адгезию, ангиогенез и для некоторых опухолей устойчивость к химиотерапии. Третьим ключевым

каскадом, повреждаемым в патогенезе МК, является *CDKN2A-RB*. Он негативно воздействует на опухолевый рост путем подавления деления клеток и обеспечения их дифференцировки. Инактивация этого каскада связана с прямым повреждением гена *RB1* либо фосфорилированием его белка вследствие структурных или эпигенетических повреждений ряда других генов (*CDKN2A*, циклин *D*, *cdk4*, *cdk6*) [3, 5].

В увеальных меланомах — УМ (рис. 2) также определены наиболее характерные крупномасштабные хромосомные нарушения (моносомия 3, делеции 1p, 8p) [2]. Однако эти крупномасштабные структурные нарушения скорее всего являются вторичными по отношению к каким-то первичным, индуцирующим событиям в патогенезе УМ. Есть предположения, что инициация патологических процессов в УМ сходна с таковой при МК. Общее происхождение и некоторые гистологические характеристики дают возможность предположить, что ключевые этапы канцерогенеза в этих клетках также могут быть сходными. Именно поэтому во многих работах, посвященных изучению молекулярной патологии в УМ, внимание в первую очередь фокусируется на тех структурных и функциональных



Рис. 1. Меланома кожи.

нарушениях, важность которых для патогенеза МК была доказана неоднократно. В настоящей работе рассмотрена вовлеченность основных молекулярных повреждений, характерных для МК, в патогенез УМ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клинический материал. 107 парных (опухоль + контрольная ткань) образцов УМ (предоставлены отделением офтальмоонкологии и радиологии Московского НИИ глазных болезней им. Гельмгольца) и 51 парный образец МК (предоставлены Московским научно-исследовательским онкологическим институтом им. П.А. Герцена) были использованы для настоящего исследования. Для всех образцов опухолей диагноз «уvealная меланома», а также «меланома» или «лентигинозная меланоцитарная дисплазия» для МК был подтвержден гистологически. Геномную ДНК из образцов ткани выделяли методом фенол-хлороформной экстракции.

Алель-специфическая амплификация мутантного аллеля *BRAF*. Для выявления стандартной мутации T1796A гена *BRAF* использован метод специфической амплификации мутантного аллеля ARMS (Amplification Refractory Mutation System) и выбрана схема полугнездной полимеразной цепной реакции (ПЦР), в которой два праймера отжигаются на интронных последовательностях, фланкирующих 15 экзон *BRAF*, а третий соответствует мутантному варианту T1796A.

Анализ метилирования. Для определения метилирования CpG-островков промоторных областей генов применяли метод метил-чувствительной ПЦР. Принцип метода описан ранее [1]. В качестве матрицы для ПЦР использовали ДНК из клеток УМ и МК, предварительно гидролизованную рестриктазой *HpaII*.

Микросателлитный анализ. Потери гетерозиготности (ПГ) идентифицировали с использованием высокополиморфных маркеров *D9S169*, *D9S942*, *D9S2136* [9(p21.2–p21.3)]; *D10S1765* [10(q23.1–q23.2)], *RB20int* (13q14). В работе использованы стандартные праймеры к микросателлитным маркерам, информация о которых опубликована в базах данных (<http://www.ensembl.org>, <http://ncbi.nlm.nih.gov>). Про-

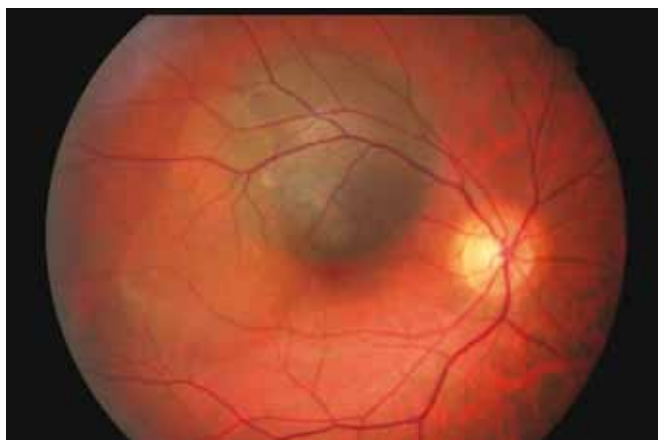


Рис. 2. Увеальная меланома.

дукты ПЦР разделяли в 8% полиакриламидном геле и окрашивали нитратом серебра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск активирующей мутации T1796A гена *BRAF* проводился с помощью аллель-специфичной ПЦР и не выявил искомую мутацию ни в одном случае (0/60) УМ и в 25,4% (13/51) случаев МК (см. таблицу).

Анализ ПГ. Проведен микросателлитный анализ хромосомных районов 9(p21.2–p21.3) в парных (контрольная ткань + опухоль) образцах УМ и МК. Проведен также микросателлитный анализ по маркеру в локусах 10(q23.2–q23.3) и 13q14 для УМ. В УМ анализ локуса 9(p21.2–p21.3) (*CDKN2A*) выявил ПГ хотя бы по одному из маркеров в 3/107 (2,8%) опухолях. В локусах 10(q23.1–q23.2) (*PTEN*) и 13q14 (*RBI*) ПГ не была определена ни в одном образце.

В меланоме кожи ПГ по маркерам 9(p21.2–p21.3) выявлена в 6/51 (11,7%) случаев.

Анализ метилирования. Проведен анализ метилирования CpG-островков промоторных областей генов-супрессоров опухолеобразования *RBI* и *CDKN2A* в 107 образцах УМ и 51 образце МК. Частота метилирования *CDKN2A* в УМ оказалась незначительной (4,7% — 5 из 107 образцов). В МК метилирование *CDKN2A* установлено в 21,5% (11/51). Метилирования промоторной области гена *RBI* в образцах УМ не было выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на предлагаемые доводы «за» общий патогенез УМ и МК [4], анализ молекулярных нарушений в УМ в основном не выявляет тех же повреждений, которые характерны для МК. Возвращаясь к описанным ранее ключевым каскадам регуляции, повреждаемым в МК, мы имеем возможность сопоставить частоты обнаруженных нами молекулярных повреждений при обоих патологических состояниях (см. таблицу). Наиболее частого повреждения, определяемого в МК, мутации T1796A гена *BRAF* в УМ нами не обнаружено. Не выявлено также аллельных потерь в локусе *PTEN*, второго, по дан-

Таблица. Основной спектр молекулярных повреждений при спорадической меланоме кожи (МК) и увеальной меланоме (УМ), включая данные разных авторов [5, 7, 8]

Сигнальный каскад	Ген	Повреждение	УМ	МК	
			выявленные нарушения		результаты других авторов
<i>Ras-Raf-MEK-ERK</i>	<i>BRAF</i>	Мутация V600E	0	25,4%	
<i>PI3K-AKT</i>	<i>PTEN</i>	Делеции 10q23	0		20–40%
<i>CDKN2A-RB</i>	<i>CDKN2A</i> <i>RB1</i>	Делеции	4,7%	11,7%	50–75% До 40%
		Метилирование	2,8%	21,5%	
		Делеции	0		
		Метилирование	0		

ным литературы [5], наиболее частого нарушения в спорадических злокачественных МК. Также не были установлены аллельные делеции и метилирование гена *RB1*, определяющиеся не менее чем в 50% спорадических МК [7]. Метилирование и ПГ в локусе *CDKN2A* было определено в отдельных образцах УМ (7,5%) и в значительной части МК (29,4%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, основной спектр молекулярных нарушений, характерный для МК, не играет важной роли в запуске патологических процессов в УМ. Естественно, что в процессе канцерогенеза различных опухолей происходит повреждение одних и тех же сигнальных каскадов, однако к настоящему времени можно предполагать, что ключевые моменты патогенеза этих опухолей не идентичны. Предполагается, что различия в популяциях МК и увеального тракта появляются еще в период эмбрионального развития в процессе миграции предшественников меланоцитов кожи в эпителий, а меланоцитов увеального тракта глубоко в мезодермальные ткани [3]. Возможно, изучение путей дифференцировки этих двух клеточных популяций поможет понять причины различий в патогенезе этих типов опухолей.

Литература

1. Залетаев Д.В., Немцова М.В., Стрельников В.В. Системы генетических и эпигенетических маркеров в ДНК-диагностике злокачественных новообразований // Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. М.: Медицина, 2009. С. 7–76.
2. Манохина И.К., Склярова Н.В., Саакян С.В., Залетаев Д.В. Системы диагностических ДНК-маркеров в увеальных меланомах. В кн.: Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. М.: Медицина, 2009. С. 247–283.
3. Belmar-Lopez C., Mancheno-Corvo P., Saornil M.A. et al. Uveal vs. cutaneous melanoma. Origins and causes of the differences // Clin Transl Oncol. 2008. V. 10, N 3. P. 137–142.
4. Landreville S., Agapova O.A., Harbour J.W. Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma // Future Oncol. 2008. V. 4, N 5. P. 629–636.
5. Miller A.J., Mihm M.C. Jr. Melanoma // N Engl J Med. 2006. V. 355, N 1. P. 51–65.
6. Mouriaux F., Saule S., Desjardins L., Mascarelli F. Normal and malignant choroidal melanocytes: from cell to clinical approach // J Fr Ophtalmol. 2005. V. 28, N 7. P. 781–793.
7. Rastetter M., Schagdarsurengin U., Lahtz C. et al. Frequent intra-tumoural heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma // Histol Histopathol. 2007. V. 22, N 9. P. 1005–1015.
8. Uribe P., Wistuba I.I., Solar A. et al. Comparative analysis of loss of heterozygosity and microsatellite instability in adult and pediatric melanoma // Am J Dermatopathol. 2005. V. 27, N 4. P. 279–285.

A comparative analysis of molecular disorders in the pathogenesis of uvea and skin melanomas

I.K. Manokhina¹, V.V. Zemlyakova^{1,2}, N.V. Sklyarova³, S.V. Saakyan³, D.V. Zaletaev^{1,2}

¹Institute of Molecular Medicine, I.M. Sechenov Moscow Medical Academy

²State Medical Genetic Research Center of Russian Academy of Medical Science

³Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases

info@igb.ru

Melanocytes of skin and uvea originate from the same progenitor cells – melanoblasts. The common origin and certain histological parameters suggested the idea that the key phases of carcinogenesis in these cells may also be similar. 107 eyes with uveal melanoma and 51 skin melanoma were examined and the tumors were histologically verified in order to determine how the main molecular damages typical of skin melanomas may be involved into the pathogenesis of uveal melanoma (UM). As a result, it was found that, despite the arguments for a common pathogenesis of UM and skin melanomas, molecular disorders in UM do not generally point to damages typical of skin melanoma.

Key words: carcinogenesis, melanoblasts, mutations, genomic DNA.

Russian Ophthalmological Journal, 2010; 2:13–15