

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Syndrom familiárního výskytu maligního melanomu
(FAMMM): význam preventivního genetického testování
pomocí mutační analýzy genů CDKN2A a CDK4**

Bakalářská práce

Markéta Rezková

Školitelka: Mgr. Dagmar Bystřická, Ph. D., Genlabs s.r.o

České Budějovice 2015

Rezková, M., 2015: Syndrom familiárního výskytu maligního melanomu (FAMMM): význam preventivního genetického testování pomocí mutační analýzy genů CDKN2A a CDK4. [The syndrome of familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM): the importance of preventive genetic testing by mutation analysis of the genes CDKN2A and CDK4. Bc Thesis, in Czech.] – 43p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

In the theoretical part malignant melanoma are being characterized in terms of the visual aspect, the origin, the increasing incidence and the treatment. A special attention is turned to the importance of CDKN2A gene and CDK4 gene in cell proliferation of melanocytes and to the molecular interactions associated with the process. Furthermore, I present frequently described mutations of CDKN2A gene and CDK4 gene in familiarly formed melanoma, the importance of prevention and genetic testing. The practical part deals with the methodology that I used for mutational analysis of genes CDKN2A and CDK4.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, poskytnutí literatury a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Petrovi Grossmannovi za navržení specifických pramerů a cenné rady. Děkuji také své rodině, Michaele Raškové a Štěpánovi Kubíčkovvi za podporu během celé doby studia.

Obsah

1.1. Úvod.....	1
1.2. Statistiky	2
1.2.1. Situace v USA a v ČR.....	3
1.3. Formy maligního melanomu	5
1.3.1. Povrchový maligní melanom	5
1.3.2. Nodulární melanom.....	6
1.3.3. Lentigo maligní melanom	6
1.3.4. Akrolentiginózní melanom.....	7
1.4. Histologie kožního melanomu.....	7
1.5. Melanomy mimo oblast kůže - slizniční a oční melanom	9
1.5.1. Slizniční melanom.....	9
1.5.2. Oční melanom	9
1.6. Melanom a rakovina pankreatu	10
1.7. Dědičnost.....	11
1.8. Patofyziologie.....	11
1.8.1. Vliv kancerogenů	11
1.8.2. Vliv ultrafialového záření.....	12
1.8.3. Vliv prostředí.....	13
1.9. Pigmentace	13
1.9.1. Melanocortin-1receptor (MC1R)	15
1.9.2. Microphthalmia associated transcription faktor (MITF).....	16
1.10. Geny CDKN2A, CDK4 a další.....	17
1.10.1. Cyklin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)	17
1.10.2. Cyklin-dependent kinase 4 (CDK4)	20
1.10.3. Další geny důležité v patofyziologii melanomu	21
1.11. Kinázy a signální dráhy	22
1.11.1. MAPK signální dráha-RAS/RAF/MEK/ERK	22
1.12. Přehled mutací a jejich důsledek.....	24
1.12.1. Meta-analýza výskytu CMM - GenoMEL	25
1.12.2. Velké genové přestavby v genech CDKN2A a CDK4	27
1.12.3. Mutace u metastazujících nádorů	27
1.13. Různé přístupy k detekci mutací v genech CDKN2A a CDK4	28
1.14. Diagnostika	28
1.15. Prevence vzniku nádoru.....	29
1.15.1. Primární prevence.....	29
1.15.2. Sekundární prevence.....	30
1.15.3. Indikace ke genetickému vyšetření	30
1.16. Etika testování.....	31
1.17. Léčba.....	32
2. Experimentální část.....	33
2.1. Metodika pro analýzu vybraných oblastí genu CDKN2A a CDK4	33
3. Závěr	37
4. Literatura	38

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ARF	alternative reading frame
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BRHC	gen HCL1 hair color 1 (brown)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CDKN2A	cyklin-dependentní kináza 2A
CDK4	cyklin dependentní kináza 4
CMM	cutaneous malignant melanoma
CR1	konzervativní doména 1
DU	Dobsonova jednotka
Dia1	produkt genu DIAPH1
DIAPH1	diaphanous-related formin 1
DOPA	dioxyfenilalanin
E2F1	transkripční faktor 1
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAMMM	familial atypical multiple mole melanoma
GDP	guanosin difosfát
GTP	guanosin trifosfát
HCL3	hair color 3 (brown)
Hdm2	human double minute 2
HERC	ubiquitin-protein ligase
INK4	inhibitor kinázy 4
ERK	extracellular regulated kinase
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene
MAPK	mitogen-activated protein kináza
MC1R	melanocortin-1 receptor
Mdm2	mouse double minute 2

MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MSH	hormon melanotropin
MLPA	multiple ligation - dependent probe amplification
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene
OCA2	oculocutaneous albinism
RAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene
RAS	intracelulární signální protein
RB	protein retinoblastoma
RB1	gen retinoblastoma
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RHC	gen HCL2 red hair color
SLC24A4	solute Carrier Family 24
smARF	mitochondriální isoforma ARF u myši
SSE	skin self examinations
TBSE	total body skin examinations
TGF α	transforming growth factor alpha
TP53	tumor protein p53
TRP	tyrosinase-related protein

Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je seznámit se syndromem familiárního maligního melanomu a s melanomem obecně. Vzhledem k vzrůstající incidenci maligního melanomu se věnuji významu prevence, diagnostiky, léčby a genetického testování. Součástí této práce je popis úlohy genů CDKN2A a CDK4 v buněčné proliferaci melanocytů a molekulární interakce s tímto procesem spojené. V praktické části se zabývám metodikou pro mutační analýzu genů CDKN2A a CDK4.

1.1. Úvod

Syndrom familiárního melanomu (Familial Atypical Multiple Mole Melanoma, zkratka FAMMM) patří do skupiny tzv. hereditárních nádorových syndromů. Jedná se o dědičnou polygenní autozomálně dominantní chorobu s inkompletní penetrancí, u které je odhadem 5 - 10% případů připisováno familiárnímu původu. V této souvislosti se výzkum zaměřuje především na dva geny CDKN2A a CDK4, které jsou obvykle zasaženy mutací (Aspinwall et al. 2008). Zastoupení genetických změn v těchto genech ale není rovnoměrné. V genu CDKN2A se mutace vyskytují u 20-40% familiárních melanomů a 0,2-2% sporadických melanomů (Foretová et al., 2009). V genu CDK4 jsou změny nalézány zřídka, asi u 2 - 3% případů (n = 1 867) (Goldstein et al., 2006). Mutace v CDKN2A způsobuje jejich nositelům 58-92% celoživotní riziko vzniku choroby (Foretová et al. 2009).

Výše uvedené geny hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, kde zamezují nekontrolovatelné proliferaci buněk. V případě FAMMM se jedná o melanocyty, buňky zodpovědné za pigmentaci. Melanocyty mají ektodermální původ, vznikají migrací progenitorových buněk z centrální nervové soustavy do kůže a produkují zde barvivo - melanin. Mají mnoho výběžků, kterými jsou napojeny na okolní keratinocyty a v jejich cytoplazmě se nachází speciální organely pro tvorbu melaninu tzv. melanosomy, přičemž jejich velikost je přímo úměrná tmavšímu zbarvení pokožky.

Snadno lze vyvodit, že nejčastěji postiženou oblastí je kůže, zřídka může být nádor přítomen i ve stěně střeva, v oku, mozkomíšní pleně, pohlavních cestách a v dalších tkáních. Prvními postiženými oblastmi na kůži bývají pigmentové névy neboli mateřská znaménka, která hrají roli ve 30-70% případech maligního melanomu, ostatní vznikají de novo (URL 1). Pigmentové névy vznikají díky poruše v embryonálním vývoji, přičemž se 20-30% mateřských znamének v průběhu života klinicky mění a mohou dát vznik nádoru (URL 9). Ten se na kůži objevuje v podobě mnohočetných neobvyklých malformací, nejčastěji v oblasti trupu a na končetinách.

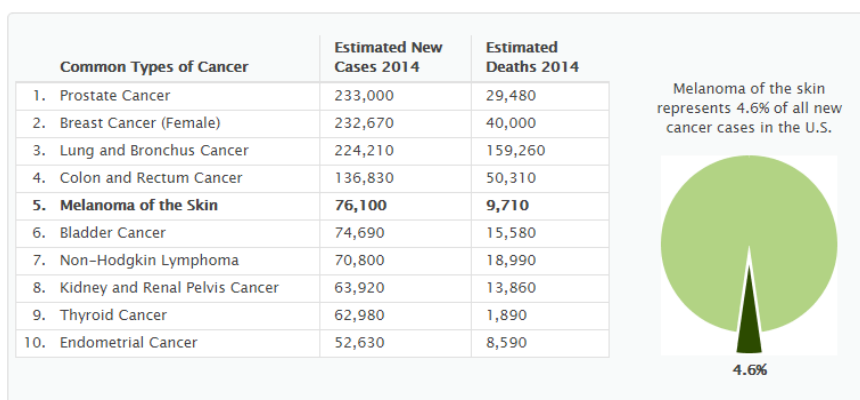
Ve srovnání s jinými epiteliálními nádory (př. basalion, spinaliom) se kožní melanom vyznačuje rychlým přechodem do hematogenních nebo lymfogenních metastáz, což má mnohdy

fatální důsledek (URL 1). Celkový vzhled kožního maligního melanomu, cutaneous malignant melanoma (CMM) je z lékařského hlediska charakterizován podle několika důležitých parametrů podrobně uvedených v kapitole Diagnostika. Tyto parametry mají význam z hlediska diagnostického, prognostického a také z hlediska léčby. V současnosti je nejčastějším řešením chirurgická excize, chemoterapie, imunoterapie nebo radioterapie.

1.2. Statistiky

V evropské populaci představuje maligní melanom 1% případů všech nádorových onemocnění. Pokud se zaměříme na úmrtnost, melanomy jsou zodpovědné za 2% z celkového počtu úmrtí zapříčiněnými různými malignitami, což je v tomto případě dáno zejména rychlým nástupem četných metastáz (Loo et al., 2003).

Celosvětový roční přírůstek CMM se mezi populacemi liší, odhadem se pohybuje mezi 3 - 7% (Diepgen et al., 2002). V roce 2014 přibylo odhadem na celém světě 76 100 nově registrovaných osob s maligním melanomem, to je 4,6% případů všech typů nádorů. Počet úmrtí v témže roce představoval 9 710, což je 1,7% všech úmrtí na rakovinu (URL 3). Na obrázku 1 jsou porovnány počty nových případů různých typů karcinomu pro rok 2014.



Obr. 1: Porovnání počtu nových případů různých typů rakovin v roce 2014 (URL 3).

Trend ve vzrůstající incidenci ovlivňují faktory nejen dědičné, ale i geografická šířka, věk nebo rasa. Obecně má bělošská rasa zvýšený sklon k rozvoji melanomu oproti ostatním rasám. Riziko rozvoje melanomu do 50 roku života se také lokálně liší. Pro Evropu je to 13%, pro USA 50% a pro Austrálii 32%. Pokud posuneme věkovou hranici na 80 let, tak pro Evropu je to 58%, pro USA 76% a pro Austrálii 91% (Bishop et al. 2002). Pacienti mladší 20 - ti let tvoří ze všech kožních maligních melanomů v populaci 1,3 – 2%, znepokojivá je ovšem stoupající meziroční incidence. U dětí mladších 15 - ti let se pohybuje okolo 1% za rok, ovšem u adolescentů již kolem 7% za rok a u mladých dospělých do 24 let přesahuje meziroční incidence 12% (Bajčiová 2013). Nejrozšířenější je zhoubný melanom u pacientů ve věku od 65 do 80 let. Tyto osoby jsou déle vystavovány rizikovým faktorům, jako je například UV záření a jiné mutageny poškozující kůži.

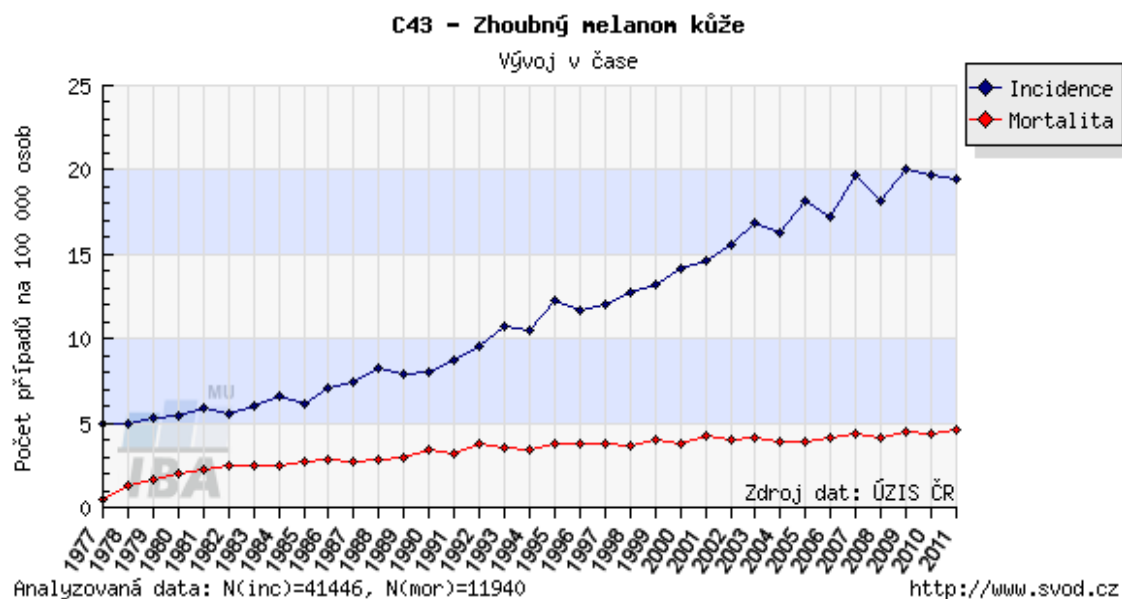
1.2.1. Situace v USA a v ČR

Ve Spojených státech amerických je rozvoj CMM poměrně sledovaný, proto zde uvádím následující statistiku.

Pokud porovnáme výskyt melanomu v USA, v období od roku 2008 do roku 2012, vzrostl z 62 480 postižených osob v roce 2008, na 76 100 v roce 2014. Na základě dostupných statistik je kožní melanom považován za 6 - 7. nejčastěji se vyskytující typ rakoviny (URL 4). Navzdory alarmujícím statistikám se zde genetické testování zaměřuje především na karcinom prsu či tlustého střeva. Analýza genů pro syndrom FAMMM překvapivě běžně nabízená není, i když všechna tři zmíněná onemocnění úzce souvisí s dědičnými predispozicemi. (Aspinwall et al. 2008).

V USA bylo v roce 2009 pět komerčních laboratoří nabízejících genetické testování genu CDKN2A. Jejich cílem bylo poskytnout nejen genetickou analýzu, ale také rozšířit všeobecné povědomí o možnostech sledování dědičných predispozic (Leachman et al. 2009). Ve stejném roce poskytovali v České republice celkem tři laboratoře vyšetření genů CKN2A a CDK4 - Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů MOÚ Brno, ÚBLG FN Praha Motol, Onkologické centrum Nový Jičín (Foretová, 2009).

V ČR se incidence zhoubného melanomu kůže zvýšila za posledních 30 let téměř pětkrát (obrázek 2) a v roce 2008 jsme se tak zařadili mezi 15 zemí s nejvyšší incidencí. Tato data pocházejí z Národního onkologického registru spravovaného ÚZIS ČR (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR) a z databáze demografických údajů ČSU (Český statistický úřad).



Obr. 2: Počet nových případů na 100000 obyvatel a hrubá mortalita v ČR. Epidemiologie zhoubných nádorů v ČR. Aktuality, zpravodajství. Epidemiologie zhoubných nádorů v ČR [online]. [vid-2015-2-27]. Dostupné z: <http://www.svod.cz/report.php?diag=C43>

Prudký nárůst incidence v posledních letech může být důsledkem zvýšeného povědomí veřejnosti o rizicích CMM a zkvalitnění diagnostických metod. Dalo by se čekat, že dojde zároveň ke zvýšení mortality, ale díky dodržování preventivních opatření, včasným diagnózám a stále modernější léčbě se podařilo této hrozbě předejít.

Pokud porovnáme výskyt zhoubného melanomu u dospělých mužů a u žen, nejsou patrné téměř žádné rozdíly. Jestliže se zaměříme na mortalitu, u žen je obvykle nižší. Muži většinou podceňují prevenci a následkem toho může být melanom diagnostikován v pokročilém stádiu. V tabulce I je uvedeno srovnání mortality žen a mužů na 100 000 obyvatel v České republice za posledních 30 let. U mladé generace se ovšem vyskytuje výrazná predominance melanomu u dívek, s výjimkou dětí do 5 let věku, kdy je melanom častější u chlapců (Bajčiová 2013).

Tab. I: Srovnání mortality CMM mužů a žen v ČR na 100 000 obyvatel v letech 1977 - 2010.

Rok	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993
Celá populace	0,44	1,26	1,71	1,97	2,29	2,49	2,5	2,45	2,66	2,8	2,72	2,88	2,94	3,46	3,24	3,77	3,59
Muži	0,69	1,51	1,9	2,45	2,78	2,66	3,15	2,81	3,25	3,25	3,5	3,32	3,46	3,79	3,88	4,75	3,89
Ženy	0,21	1,02	1,53	1,52	1,83	2,33	1,88	2,11	2,1	2,39	1,99	2,46	2,46	3,15	2,64	2,84	3,31

Rok	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Celá populace	3,41	3,78	3,78	3,77	3,63	3,96	3,72	4,26	4,06	4,09	3,94	3,87	4,11	4,37	4,17	4,52	4,41
Muži	3,61	4,37	4,85	4,37	4,28	4,28	4,36	4,63	4,55	4,66	4,52	4,3	4,97	5,29	4,91	5,35	5,34
Ženy	3,22	3,22	2,78	3,19	3,01	3,66	3,11	3,91	3,59	3,55	3,4	3,47	3,29	3,49	3,47	3,72	3,5

1.3. Formy maligního melanomu

Maligní melanom představuje jeden z nejzhoubnějších typů nádorů. Může vzniknout nejen na kůži z pigmentotvorných buněk, ale i v jiných tkáních či orgánech (plíce, trávicí trakt, sliznice střeva, močový měchýř, ovaria nebo oční sliznice) (URL 2). Mimo oblast kůže se ovšem vyskytuje jen vzácně - 92% případů je kožního původu, 5% připadá na oční melanom a 3% na slizniční melanom. Kožní maligní melanom lze z lékařského hlediska rozdělit do čtyř základních patologických jednotek, kdy se posuzují především tyto parametry: barva, velikost, okraje a také hloubka zasažené tkáně.

1.3.1. Povrchový maligní melanom

K velmi běžným patří povrchový maligní melanom (obrázek 3). Tvoří asi 65% všech kožních nádorů a postihuje zejména osoby mezi 30. až 50. rokem života. Šíří se povrchově, poté proniká do hlubších vrstev kůže. Z počátku je malformace plochá nebo jen mírně vystouplá, má hnědou barvu a postupně tmavne, v průměru okraje nepřesahují více než 6 mm (URL 2).



Obr. 3: Povrchový melanom (URL 6).

1.3.2. Nodulární melanom

Dalším poměrně hojně se vyskytujícím typem nádoru je nodulární melanom (obrázek 4). Název je odvozen od způsobu šíření, kdy se tvoří při vertikálním růstu uzly. Výstupek je patrný již od počátku vzniku a proniká do hlubších vrstev epidermis. Tvoří okolo 20% melanomů a navíc rychle přechází do metastáz (URL 2).



Obr. 4: Nodulární melanom (URL 6).

1.3.3. Lentigo maligní melanom

Lentigo melanom (obrázek 5) postihuje zejména starší osoby a představuje přibližně 5% případů melanomu. Na kůži se střídají tmavé a světlé skvrny nepřesně ohraničené, vzniklé v důsledku dřívějšího poškození UV zářením. Nezasahuje do hloubky, je spíše povrchový a je lokalizovaný v okolí krku a na obličeji (URL 2).



Obr. 5: Lentigo melanom (URL 6).

1.3.4. Akrolentiginózní melanom

Akrolentiginózní melanom (obrázek 6) je běžný v černošské populaci a tvoří přibližně 5% případů melanomu. Lze jej nalézt na periferiích lidského těla např. plosky nohou, dlaní a pod nehtovou ploténkou. Může připomínat bradavici, modřinu nebo mozol (URL 2).



Obr. 6: Akrolentiginózní melanom (URL 6).

1.4. Histologie kožního melanomu

Histologická diagnostika kožního maligního melanomu nemusí, ale může být v některých atypických případech poměrně složitá. V zásadě se rozlišuje několik typů maligního melanomu uvedených níže. Důležitým kritériem je oblast vzniku a šíření nádoru, které má dvě fáze, horizontální - radiální a vertikální. V první fázi se melanomové buňky šíří v epidermis (horizontálně - radiálně), druhá fáze expanze je od povrchu do koria (vertikálně) (URL 2).

Z histologického pohledu lze hloubku nádoru charakterizovat stupnicemi podle Breslowa nebo podle Clarka. Podle Breslowa se měří invaze od povrchu až po nejhlubší nádorový melanocyt jak je uvedeno v tabulce II. S. Z výsledku lze navrhnout vhodný chirurgický zákrok popřípadě alternativní druh léčby, přičemž s vyšší hodnotou se zhoršuje i prognóza.

Stanovení přežití deseti let je dáno právě hodnotou Breslowa např. Breslow 1 mm přežije 85% pacientů, 2 mm asi 72% a 3 mm 58% pacientů. U větších melanomů o velikosti 4 mm je to 35% a více než 5 mm přežije pouhých 20% pacientů (URL 2).

Tab. II: Klasifikace melanomu podle Breslowa (URL 2).

Hloubka invaze melanomu	Typické projevy melanomu
Breslow < 0,75 mm	Novotvar nemetastazuje. Pacient podstoupí pouze chirurgickou excizi.
Breslow 0,76- 1,49 mm	Útvar je vystouplý a obvykle nelze jednoznačně predikovat jeho chování.
Breslow 1,5- 2,99 mm	Nádor se šíří vertikálně a to je spojené s horší prognózou.
Breslow > 3 mm	U pacienta došlo ke vzniku metastáz.

Existuje také alternativní klasifikace do skupin I-IV podle Clarka, kdy se hodnotí, do jaké hloubky nádor zasahuje, respektive která nejhlubší tkáň je zasažena viz tabulka III. Od této metody se ale upouští, protože je ryze subjektivní a diagnostika je tím obtížnější (URL 2). Stádium I a II vykazuje radiální šíření nádorových buněk, stádium III a vyšší, vertikální. Míra přežití pěti let u pacientů ve IV. stupni stádia je 9-15% (Balch et al. 2001).

Tab. III: Klasifikace melanomu podle Clarka (URL 2).

Stupeň postižení podle Clarka	Nejhlouběji zasažená tkáň
Clark I	Melanom zasáhl pouze epidermis = melanom in situ.
Clark II	Nádor prorostl až k papilární dermis.
Clark III	Útvar se rozšířil na rozhraní papilární dermis s retikulární dermis.
Clark IV	Nádor prorostl k retikulární dermis a kolagenním vláknům.
Clark V	Zasažen je podkožní tuk

1.5. Melanomy mimo oblast kůže - slizniční a oční melanom

1.5.1. Slizniční melanom

Melanocyty se vyskytují také ve stěnách respiračního, gastrointestinálního nebo genitourinálního traktu (URL 2). Ze všech typů melanomů představují slizniční melanomy v bělošské populaci 1%, mezi Asiaty je rozšířen u 5 - 8%. Má obvykle velmi špatnou prognózu, protože je často diagnostikován až v pozdější fázi, kdy už dochází ke krvácení ze sliznice (URL 2). Bohužel ani samotná léčba nedává příliš velké naděje. Chirurgický zákrok je obtížný a je zřejmé, že rozsah odstranění sliznice je značně omezen. I přesto je chirurgický zákrok nezbytný a navazuje na něj aktinoterapie (ozáření prováděné u mnohočetných melanomů, podkožních metastáz nebo v případě zasažení mízních uzlin) nebo imunochemoterapie.

Co se týče výskytu slizničních melanomů, obvykle se nachází v dutině ústní, nose a hrtanu (40% až 50% případů), v zevních rodidlech a pochvě (40% případů), v anorektální sliznici, jícnu a močové trubici (10 - 20% případů). Pětileté přežití se pohybuje mezi 10 - 42% (URL 2).

1.5.2. Oční melanom

Vyskytuje se poměrně vzácně, představuje 3 - 5% případů melanomů a je častější u osob starších 50 let. Může mít dvě formy - uveální a konjunktivální.

První typ má původ v neuroektodermálních melanocytech duhovky, ciliárním tělísku nebo choroidey. Pacient obvykle nepocítuje bolestivost, ta je přítomná až u sekundárního glaukomu. Druhý typ je melanom spojivky, který vytváří drobná i větší, plošná nebo uzlovitá ložiska (URL 2).

Vyšetření probíhá fotografickou dokumentací, fluorescenční angiografií (vyšetření cév) a sonografií. Léčba úzce souvisí se stádiem a rozsahem melanomu. U včasného záchytu se provádí parciální iridektomie (chirurgické odstranění části duhovky), laserová fotokoagulace (laserové odstranění novotvarů) nebo transpupilární termoterapie (tkáňová hypertermie, která vede k uzavření cév). Nejradikálnější je enukleace bulbu (trvalé odstranění oční koule) (URL 2).

1.6. Melanom a rakovina pankreatu

Recentní studie poukazují na spojitost mezi výskytem familiárního melanomu a nádoru slinivky břišní (Onesti et al., 2011; Vanneste et al., 2013; Lynch et al. 2002).

Bohužel, tento typ rakoviny je velice agresivní a je známý pro svou špatnou prognózu a vysokou mortalitu. To je dáno především diagnózou onemocnění až v jeho pokročilé fázi a to díky nejednoznačným příznakům. Nádor se projevuje podobně jako žloutenka a je doprovázen úbytkem tělesné hmotnosti. Do jednoho roku po nástupu prvních příznaků obvykle nastane smrt (Lynch et al., 2002).

Vysokou mortalitu potvrzují také statistické úřady, podle kterých je karcinom slinivky čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu ve Spojených státech. V roce 2000 přibylo celkem 28 300 nových případů a 28 200 případů skončilo úmrtím (Greenlee et al. 2000). Pokud bychom porovnali incidenci s Českou republikou, v roce 2012 u nás bylo hlášeno 2 118 nových případů a v USA 42 885 (URL 5). Ke snížení mortality by měla přispět prevence, která se zaměřuje na pacienty se zvýšeným rizikem rozvoje nádoru pankreatu např. na pacienty s FAMMM, hereditární pankreatitidou, Lynchovým syndromem, Peutz-Jeghersovým syndromem, syndromem familiárního pankreatického karcinomu a syndromem familiárního karcinomu prsu (Novotný, 2013).

Nosiči mutace v genu CDKN2A mají 11-17% riziko vzniku nádoru pankreatu a v některých studiích je uváděna i náchylnost ke vzniku karcinomu prsu (Foretová et al., 2009). Borg et al. provedli v roce 1999 studii, která měla odhalit vztah rakoviny pankreatu k malignímu melanomu. Bylo testováno 52 rodin se dvěma či více členy postiženými melanomem. U 10 rodin (43 pacientů) byla zjištěna zárodečná mutace v genu CDKN2A a 41 z nich vykazovalo dokonce shodnou mutaci c.332_334dup, která vede k inzerci argininu do proteinu p16/INK4 v pozici 113. Devět pacientů zároveň rozvinulo rakovinu pankreatu. Navíc bylo zjištěno, že inaktivaci genu CDKN2A lze najít téměř u každého jedince s rakovinou pankreatu. S jistotou však nelze tvrdit, zda je tato dysfunkce příčinou onemocnění nebo jen jeho akcelerátorem (Borg et al. 2000).

V současné době probíhají výzkumy na objasnění souvislostí těchto onemocnění.

1.7. Dědičnost

Melanom je autozomálně dominantní dědičné onemocnění s neúplnou penetrancí a variabilní expresí (heterozygoti nemusí nutně rozvinout CMM) (Scaini et al., 2014). 5 – 10% všech případů má dědičný charakter (Florell et al., 2005) a to bylo hlavním podnětem k hledání zárodečných a rekurentních mutací v nejčastěji afektovaných genech - CDKN2A a CDK4. CDKN2A i CDK4 mají za úkol regulovat G1 fázi buněčného cyklu, nutno je však podotknout, že za nádorové onemocnění kůže nejsou zodpovědné pouze tyto geny, ale existují i jiná riziková místa v genomu, která by mohla hrát významnou roli v patogenezi této malignity (Badenas et al., 2012). Mutace v genu CDKN2A se vyskytují u 20 - 40% případů melanomů s rodinnou zátěží (Foretová et al., 2009) a v genu CDK4 pouze ve 2 - 3% případů (n = 1 867) (Goldstein et al., 2006).

Vliv dědičnosti je tedy v případě maligního melanomu nesporný. Důležitou roli hraje také celkový počet onemocnění v rodině, například pravděpodobnost výskytu mutací v CDKN2A v rodinách s jedním postiženým příslušníkem je 1%, se dvěma 4%, třemi 8% a více jak třemi 38% (Leachman et al., 2009; Goldstein et al. 2006). Pokud se vyskytuje melanom u třech a více členů a současně se vyskytuje v této rodině i karcinom pankreatu, je mutace v genu CDKN2A detekována ve více jak 72% (Leachman et al., 2009). Průměrný věk stanovení první diagnózy melanomu u pacientů z rizikových rodin je 30 - 40 let, zatímco v rizikových rodinách pro CMM bez mutace je to 40 - 50 let (Leachman et al., 2009). Z toho je patrný význam primární i sekundární prevence, ale i genetického testování.

1.8. Patofyziologie

1.8.1. Vliv kancerogenů

Další vlivy, které mohou přispět ke vzniku melanomu, jsou látky označované jako kancerogeny. Jedná se o faktory chemické (např. anorganické soli arzenu), fyzikální (např. ionizující záření - tvorba zlomů DNA a kyslíkatých radikálů), biologické (např. zánět, potlačená imunitní odpověď, viry). Ty ovlivňují přímo či nepřímo genom a mohou hrát zásadní roli v procesech probíhajících v buňce. Přímý účinek je daný vlastnostmi faktoru a nepřímý

zahrnuje navíc biotransformaci v organismu, vzniklé změny jsou buď reverzibilní, nebo ireverzibilní. Obvykle nevratný účinek mají genetické kancerogeny, které přímo působí na DNA buňky, například pro chemické látky je charakteristický vznik kovalentních vazeb s DNA. Nepřímý vliv mají epigenetické kancerogeny jako imunosuprese, hormonální reakce nebo cytotoxicita. Kompletní kancerogeny jsou kombinací obou předchozích typů.

Přehled nejčastějších rizikových faktorů spojených s melanomem:

- věk nad 50 let
- citlivost na sluneční záření, spálení
- bulózní dermatitida
- atypické névy nebo névy přesahující 20 cm
- dědičnost
- pigmentová skvrna vykazující změny vzhledu
- imunosuprese
- opalování v soláriu

1.8.2. Vliv ultrafialového záření

UV záření má několik složek, které nestejně přispívají k rozvoji melanomu, jak popisuje tabulka IV. Nejrizikovější je UVB záření o vlnové délce 280 – 315 nm, které vede k tvorbě dimerů thyminu. Vlastní nárůst UV záření je ovlivněn zejména šířkou ozónové vrstvy ve stratosféře. Pro představu desetiprocentní úbytek ozónu znamená 20% nárůst UV záření na zemském povrchu a 40% nárůst vzniku kožní rakoviny. Na konci 60. let minulého století se nad naším územím ztenčila vrstva ozónu z cca 345 Dobsonových jednotek (DU) na 320 DU, tedy o 7% (URL 6). O deset let později, v roce 1970, bylo u nás hlášeno 316 případů melanomů, v roce 2000 to bylo již odstrašujících 1 413 (URL 7) a v roce 2012 Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR zaznamenal 2 0193 případů CMM.

Tab. IV: Typy UV záření a jejich důsledek (URL 8).

Typ UV záření	Vlnová délka	Důsledek
UVA	320 - 400nm	Vysoké dávky vedou k okamžitému zhnědnutí, stárnutí kůže, CMM.
UVB	290 - 320nm	I v menším množství způsobuje CMM, spálení kůže, zhnědnutí s časovým odstupem.
UVC	200 - 290nm	Pohlčeno v atmosféře.

1.8.3. Vliv prostředí

Vliv prostředí má při rozvoji CMM velkou roli, avšak pravděpodobnost výskytu u osob bez rodinných predispozic je nízká, okolo 1% (Badenas et al., 2012). Nenosiči mutace pocházející z rodin, kde se defekt vyskytuje, mají 1,7 krát zvýšenou šanci na vznik melanomu oproti ostatní populaci (Foretová et al. 2009).

Celkový duševní stav a správná životospráva se zásadně podílí na velikosti účinku okolního prostředí i z hlediska onemocnění organismu. Organismus se může lépe vyrovnat s jakoukoli zátěží, pakliže je v dobrém psychickém i fyzickém stavu.

1.9. Pigmentace

Pigmentové buňky tzv. melanocyty mají v patofyziologii CMM zásadní vliv. Jedná se o dendritické buňky neuroektodermálního původu vyskytující se ve stratum bazale epidermis a jejich hlavní funkcí je produkce černohnědého melaninu tzv. eumelaninu, kterým pak prostřednictvím výběžků zásobují okolní keratinocyty. Důsledkem je opálení pokožky. Syntéza eumelaninu probíhá ve speciálních váčcích melanocytů nazývaných melanosomy.

Vznik pigmentu je tedy kontinuální proces a je k němu zapotřebí, aby buňka byla vystavena slunečnímu záření. UV složka způsobí uvnitř melanosomů produkci intermedinu (melanotropinu, hormonu hypofýzy), který stimuluje vznik melaninu. Melanin se dále přenesení do okolních keratinocytů (1 melanocyt je schopný zásobovat cca 36 keratinocytů) a tím zbarví pokožku do hněda (Jarešová Růžičková, 2013). Intenzita pigmentace je přímo úměrná velikosti melanosomů.

Zbarvení vlasů nebo pokožky je podmíněno hustotou a plošným rozložením pigmentu, dále i množstvím a typem barviva, jak je uvedeno níže v tabulce V. U zrzavých vlasů je typická vysoká produkce feomelaninu (červený a žlutý pigment), který se však fenotypově projeví jen v přítomnosti eumelaninu.

Tab. V: Barva vlasového vlákna podle typu a hustoty melaninu.

Barva vlasů	Typ barviva	Hustota vyprodukovaného barviva
černé	eumelanin	vysoká
hnědé	eumelanin	nízká
blond	eumelanin	nižší než u hnědých vlasů
špinavá blond	feomelanin	nízká
zrzavá	feomelanin	vysoká

Byla prokázána existence více než 120 genů ovlivňujících pigmentaci (Udayakumar et al. 2010). Patří mezi ně například HCL3, BRHC, RHC, OCA2, HERC2, SLC24A4 a další (Udayakumar et al. 2010), které různou měrou přispívají ke vzniku prekurzorů melaninu, jako jsou tyrozin a glykoprotein 100 (strukturní protein melanozomů). Transformací tyrozinu v dihydroxyfenylalanin (DOPA) a dále v dopachinon nakonec vzniká melanin.

Pokud bychom uvažovali jen tři typy zbarvení vlasového vlákna (hnědá, blond, zrzavá), pak vztah mezi geny je označován jako dominantní epistáze. Gen HCL3 (fenotypově spojený s hnědou duhovkou) nebo BRHC (fenotypově spojený se zelenou duhovkou) pro hnědé zbarvení vlasů funguje jako dominantní, gen RHC pro zrzavé vlasy je hypostatický ve vztahu ke genům pro hnědé zbarvení vlasů a geny x (doposud neidentifikovatelné) pro blond barvu vlasů jsou recesivní.

HCL3 (BRHC) > **RHC** > **x**
H_R_ hhR_ hhrrxx
H_rr

1.9.1. Melanocortin-1receptor (MC1R)

V procesu pigmentace má esenciální význam melanocortin-1receptor (MC1R), který se nachází na povrchu melanocytů. Jedná se o 7 - transmembránový G-protein, který hraje významnou roli v pigmentaci. Jeho funkci zásadně ovlivňuje melanotropin - adrenokortikotropní hormon.

Spojením MC1R receptoru a hormonu α melanotropinu (α MSH) dojde k vytvoření signálu pro aktivaci procesu pigmentace a syntéze cyklického 3',5'-adenosinmonofosfátu (cAMP), který aktivuje tyrozinázu. Následuje syntéza tyrozinu, přeměna v DOPA a vznik melaninu. Celou reakci reguluje microphthalmia-associated transcription factor (MITF), který je podrobně popsán níže (Jin et al, 2012).

Varianty MC1R receptoru

Samotný gen MC1R vykazuje značný polymorfismus zejména v kavkazské populaci a vzniká několik typů MC1R receptoru (Badenas et al., 2012). Varianty MC1R receptoru mají dědičný charakter a určují nejen zbarvení vlasů a pokožky, ale i citlivost k UV záření (Badenas et al., 2012).

Podle toho, zda buňka produkuje více eumelaninu (hnědý až černý pigment) nebo feomelaninu (červený a žlutý pigment), lze rozlišit dva stavy MC1R receptoru (normální nebo neaktivní či blokovaný). Mutace vyskytující se v genu MC1R mají dopad především na funkci receptoru. Mutovaná forma MC1R špatně interaguje s α MSH nebo dojde k dysfunkci na úrovni cAMP, jehož množství se v buňce snižuje a naopak se zvyšuje množství feomelaninu (Palmer et al. 2000).

- Normální stav MC1R - buňka vykazuje větší produkci eumelaninu. Pigment je hnědý až černý a pokožka je fotoprotektivní na rozdíl od druhé formy.
- Neaktivní nebo blokovaný MC1R - vyšší produkce feomelaninu, pigment je žlutý až červený. Feomelanin je nestabilní vůči UV záření a může díky superoxidovým nebo hydroxylovým radikálům poškodit DNA.

Osoby se specifickými variantami MC1R jsou nosiči „R“ nebo „r“ alel, které jsou více či méně spojovány s RHC (red hair colour) fenotypem - světlou pletí, množstvím pih, zelenýma a modrýma očima. Tito lidé se navíc špatně opalují a často u nich dochází k poškození epidermis

v důsledku UV záření a následné kancerogenezi (Badenas et al., 2012).

Mezi alely působící na RHC fenotyp se řadí různé varianty MC1R (tabulka VI). U RHC fenotypu se běžně vyskytují varianty s jednou „R“ alelou, méně často se dvěma „RR“ alelami a nejméně s „r“ alelou.

Všechny níže zmíněné varianty MC1R receptoru mají nejen odlišné složení aminokyselin, ale mají i různou schopnost vázat α -MSH, a to zpravidla menší než normální stav MC1R. To má za následek zvýšení produkce feomelaninu a vznik RHC fenotypu (Udayakumar et al. 2010).

Tab. VI: Rozdělení typů MC1R receptorů podle asociace s „R“, „RR“ nebo „r“ alelou (Udayakumar et al. 2010).

Alely	Varianty MC1R receptoru			
„R“	p.Asp84Glu	p.Arg151Cys	p.Arg160Trp	p.Asp294His
„RR“	p.Arg142His	p.Ile155Thr		
„r“	p.Val60Leu	p.Val92Met	p.Arg163Gln	

U nositelů dvou RHC alel, riziko CMM vzroste 4× až 6× oproti lidem bez RHC alely. Pakliže pacient navíc pochází z rodiny, kde byla rakovina kůže již diagnostikována, riziko je aditivní (Badenas et al., 2012). Některé varianty MC1R (Arg151Cys, Arg160Trp and Asp294His) mají dokonce vliv na zvýšení penetrance CDKN2A nebo na snížení věkové hranice u první diagnózy CMM (Udayakumar et al. 2010).

1.9.2. Microphthalmia associated transcription faktor (MITF)

Faktor MITF je důležitý při přepisu mnoha genů a v řadě signálních drah, v případě melanocytů se váže na sekvenci DNA genových promotorů (např. tyrosinasa, TRP-1 a TRP-2) (Lee et al., 2014). Zásadní je však aktivace genu DIAPH1 pomocí faktoru MITF. Gen DIAPH1 kóduje protein Dia1, který je nezbytný v reorganizaci cytoskeletu melanocytů. Koncentrace MITF a Dia1 spolu navzájem korelují a jejich zvýšená hladina zabezpečuje přežití melanocytů, tudíž MITF působí pro-proliferálně. Zvýšená exprese MITF navíc vede ke snížení invaze buněk melanomu (Carreira et al., 2006).

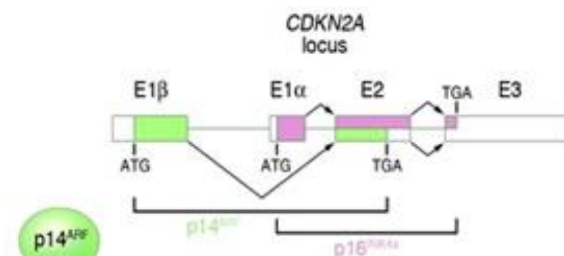
Faktor MITF byl silně amplifikovaný, mutovaný nebo nadměrně exprimovaný u řady

melanomů (Carreira et al., 2006). Jak bylo již uvedeno, je nezbytný v udržení přežívání melanocytů a používá se jako marker při diagnostice metastazujícího nádoru, kdy je sledována exprese izoformy MITF - M. Cílenou dysfunkcí tohoto faktoru lze blokovat antiapoptotické mechanismy, díky tomu by MITF mohl být vhodný k využití v genové terapii. Bohužel, problémem v aplikaci nadále zůstávají neobjasněné vztahy mezi dalšími kofaktory (Price et al., 1998).

1.10. Geny CDKN2A, CDK4 a další

1.10.1. Cyklin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)

Největší pozornost v souvislosti s FAMMM je věnována genu CDKN2A, který se nachází na chromozomu 9p21. Je složen ze 4 exonů a mechanismem alternativního splicingu (variabilní sestřih intron-exonových oblastí) a použitím různých promotorů, dává vznik několika isoformám (obrázek 7).



Obr. 7: Schéma struktury genu CDKN2A a dvou možných prepisů (Chudnovsky et al., 2005).

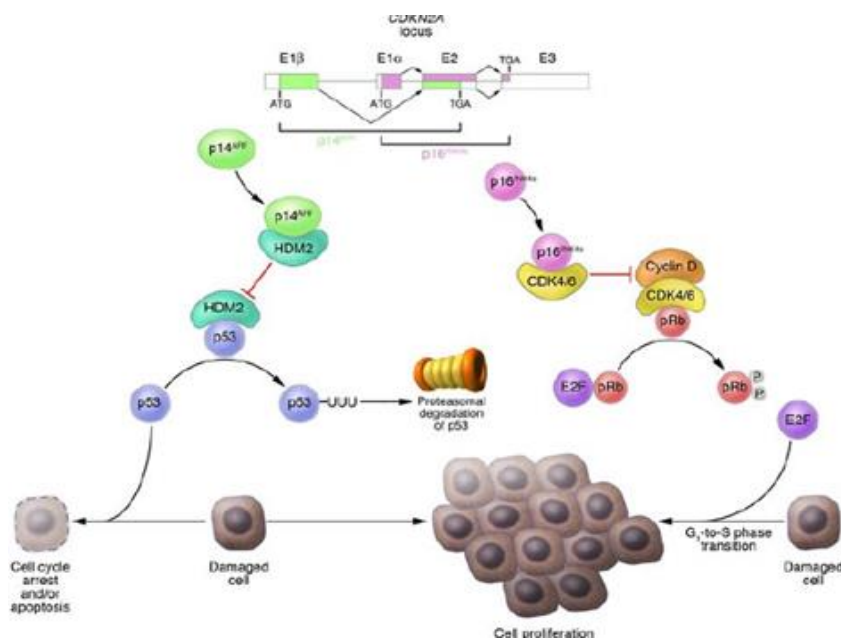
Isoforma P16/INK4

Isoforma 1 je složená ze 173 aminokyselin a je předlohou pro protein p16/INK4, který se skládá z exonu 1α, 2 a 3. Tento protein působí v kontrolním bodě G1 fáze buněčného cyklu, kde inhibuje komplex CDK4/6. Buňka tím pádem nemůže pokračovat do S fáze a dělit se. Struktura p16/INK4 je unikátní především ve čtyřech repeticích proteinu ankyrinu. Ten vytváří dva antiparalelní řetězce a formuje tak vazebnou štěrbinu pro CDK4/6. Vazba mezi těmito proteiny vykazuje vysokou afinitu. V případě, že dojde k záměně jediné aminokyseliny v p16/INK4, vysoká afinita protein-protein je porušena a buněčný cyklus může pokračovat do další fáze buněčného dělení (Scaini et al., 2014).

Za normální situace o toto vazebné místo kompetují dva proteiny p16/INK4 a cyklin D. Pokud růstové faktory nebo onkogeny způsobí nadprodukcii cyklinu D, vytvoří se komplex CDK4/6-cyklin D. Dále se fosforyluje protein retinoblastoma (RB) a to vede k uvolnění transkripčního faktoru E2F1, který v jádře stimuluje expresi cyklinu E. Opět se vytvoří komplex cyklinu tentokrát E a CDK2 a buňka přejde do S fáze. Mimo jiné, signální dráhu pro vznik p16/INK4 up-reguluje transkripční faktor MTF, který v buněčném cyklu melanocytů dohlíží na správnou funkci antiapoptotických a pro-proliferačních signálů a to tak, že musí být přítomen v přepisu genu pro antiapoptotický protein bcl-2 a CDK2 (Lee et al., 2014).

Isoforma p14/ARF

Menší transkript - isoforma 2 obsahuje 156 aminokyselin. Jedná se o protein p14/ARF a je sestaven z exonu 1 β , 2 a 3 (Onesti et al., 2011). P14/ARF zprostředkovává zdržení v G1 a G2 fázi pomocí interakce s proteiny Hdm2 a p53 (Soufir et al. 2004). P14/ARF se za normální situace váže na protein Hdm2. Mutovaný není schopen této vazby, tudíž volný Hdm2 ubikvitinací označí protein p53 a přednostně ho destrukuje (obrázek 8). Degradace p53 je pro buňku zásadní, proto se tomuto problému podrobně věnuji v kapitole s názvem Další geny důležité v patofyziologii melanomu.



Obr. 8: Role p16 a p14 v buněčné proliferaci (Chudnovsky et al., 2005).

Isoforma p12

Třetí možná varianta, která vzniká přepisem CDKN2A je protein p12. Molekulová hmotnost tohoto proteinu je 12kDa a obsahuje 116 aminokyselin. Do jisté míry se kódující oblast shoduje s p16/INK4A. S p16 mají společný promotor, který je složen také z exonu 1 α , navíc je zde alternativní donorová oblast intronu 2 s terminačním kodónem (Robertson et al. 1999). Tudíž p12 má jiný C-konec a neinteraguje s CDK4.

Protein p12 je exprimován především ve slinivce, v nádorových buňkách potlačuje aberantní růst buněk bez interakce s geny RB nebo TP53. Vznikající mRNA, která je předlohou pro p12 uniká mechanismu nonsense - mediated mRNA decay (NMD) kontrole. Tato kontrola je charakteristická pro eukaryota a zabezpečuje degradaci zkrácené mRNA díky přítomnosti předčasného stop kodónu ještě předtím, než dojde k translaci. Bližší informace o funkci p12 zatím nejsou známy (Robertson et al. 1999).

Isoforma p16 gamma

Další isoforma, p16 gamma má identický exon 1 a 2 s p16/INK4. Navíc obsahuje 197 bp dlouhý fragment (exon 2 gamma), který se nachází mezi exonem 2 a 3. Principiálně se jedná o isoformu p16/INK4, která vznikla alternativním splicingem, ne inzercí výše uvedeného fragmentu. S p16/INK4 se p16|gamma shoduje v terciární struktuře a stejně tak reguluje buněčný cyklus v G1 fázi inhibicí CDK4. Exprese isoformy p16gamma je nízká u normálních mononukleárních buněk, zatímco v buněčných liniích, které se rozvinuly v nádor, bylo množství tohoto proteinu prokazatelně vyšší. P16 gamma je za normální situace degradována procesem NMD, v nádorových buňkách ovšem tomuto procesu uniká, a proto je její hladina zvýšená (Lin et al. 2007).

Isoforma p19/ARF

Isoforma 5 se v literatuře uvádí jako protein p19/ARF. Jedná se o homologa k p14/ARF exprimovaného u myši. Ve srovnání s p14/ARF je p19/ARF delší, obsahuje 169 aminokyselin a převažuje zde arginin (22%). Exon 1 β je identický z 45% a celkově se tyto produkty shodují z 50%. V buněčném cyklu p19/ARF působí jako inhibitor proliferace díky interakci s proteinem

Mdm2 (homolog Hdm2 u myši) (Ouelle et al., 1995).

Isoforma smARF

Poslední variantou je isoforma 6 jinak známá jako smARF. Je to kratší forma mRNA, která se vyskytuje u myši a je homologem k lidské mRNA pro protein p14/ARF. Má mitochondriální původ a je schopná indukovat apoptózu. SmARF je za běžných podmínek rychle degradována proteazomem. Jestliže buňka dostane špatný signál, může dojít ke kumulaci smARF. Vyšší koncentrace smARF je příčinou rozestoupení mitochondriální membrány a buněčné smrti, proto je exprese smARF regulována mitochondriálním proteinem p32, který je stejný u lidí i u myši (Reef et al. 2007).

1.10.2. Cyklin-dependent kinase 4 (CDK4)

Gen pro CDK4 se nachází na chromozomu 12q14 a obsahuje 8 exonů. Protein, který tento gen kóduje, je tvořen celkem 303 aminokyselinami a patří do rodiny serin-threoninových kináz. V buňce je jeho přítomnost esenciální v G1 fázi. Aktivita proteinu je však omezená od G1 do S fáze a je přísně kontrolována proteinem p16/INK4, který působí jako inhibitor na komplex CDK4/D-cyklin (Scaini et al., 2014).

CDK4 je nezbytná pro fosforylaci proteinu RB působícího jako tumorsupresor. Protein RB je za normální situace navázaný na E2F. Komplex cyklin D/CDK4/6 fosforyluje RB a uvolní tím transkripční faktor E2F, který se váže na promotor genu pro cyklin E. P16/INK4 je tedy zároveň inhibitorem CDK4 (Scaini et al., 2014).

1.10.3. Další geny důležité v patofyziologii melanomu

Tumor protein p53 (TP53) a retinoblastoma 1 (RB1)

TP53 a RB1 patří mezi nejvýznamnější tumor supresorové geny. K dysfunkci genů TP53 nebo RB1 a vzniku maligní transformace je zapotřebí, aby došlo k poškození obou alel (recesivní typ dědičnosti) - to je zásadní rozdíl oproti onkogenům.

TP53 bývá někdy označován jako “strážce genomu”. Protein p53 má za úkol odhalit poškozenou DNA, pakliže takové místo v genomu nalezne, buňka má na výběr ze dvou možností. Pozastaví proliferaci transkripce proteinu p21 a pokusí se o reparaci DNA nebo při velkém poškození navodí apoptózu.

Pro většinu tumorů je typická inaktivace signální dráhy pro protein p53. U kožního melanomu to ale není pravidlem. Z 645 testovaných melanomů bylo potvrzeno pouze 85 (13,2%) mutací v genu TP53. Co je ještě zajímavější, že 43 z nich, tedy více než 50% bylo způsobeno UV zářením (Hocker and Tsao 2007). Mechanismů jakými dojde k narušení funkce p53 je několik. Může dojít k amplifikaci Hdm2, což je častější případ nebo vzácně k mutaci v TP53. Přirozenou obnovu funkce zajišťují malé molekuly - antagonisti Hdm2 např. Nutlin-3 (Ji et al. 2012).

RB1 má za úkol udržovat buňku v interfázi. Produktem tohoto genu je p.105RB neboli RB protein. Za normální situace se RB protein váže na faktor E2F a působí jako negativní regulátor. Fosforylací lze RB protein inhibovat a buňka postoupí do S-fáze. Mutace v RB1 často vedou k maligním nádorům sítnice, u dědičné formy jsou to téměř vždy bilaterální formy.

1.11. Kinázy a signální dráhy

V buňce je řada enzymů a proteinů, které se podílejí na proliferaci, diferenciaci nebo přežívání melanocytů. Je zřejmé, že vše musí podléhat přísné kontrole, a proto buňka využívá složité signální dráhy, jako nástroj k regulaci buněčného cyklu.

V primárních epidermálních buňkách působí RAS onkogen na přechodné snížení exprese CDK4 přičemž je buněčný cyklus zastaven v G1 fázi. Má-li se buňka dělit, vytvoří se komplex CDK4 s cyklinem D. Při tumorigenezi CDK4 společně s RAS proteinem změní strukturu komplexů s cyklinem D a cyklinem E a umožní, aby buňka přešla do S fáze. V podstatě tak poskytnou ochranu před inhibítorem INK4 (Lazarov et al. 2002).

1.11.1. MAPK signální dráha-RAS/RAF/MEK/ERK

Celá signální dráha je zaměřena především na proliferaci a přežití buněk, tudíž dysregulace MAP kinázy vede ke špatné životaschopnosti melanocytů. Vzniklé mutace v MAPK mají somatický charakter a vyskytují se především u metastazujících melanomů například mutace BRAF způsobí hyperaktivaci této dráhy a urychlí proliferaci melanocytů (Mercer and Pritchard 2003).

Z lékařského hlediska se sledují mutace zahrnující MAPK signální dráhu v již rozvinutých nádorech (ne predispozičně) a to především kvůli specifické léčbě.

Protein RAS

Geny z rodiny RAS kódují malé molekuly patřící do skupiny GTP vazebných proteinů. Mají za úkol organizovat cytoskelet, napomáhat při transportu proteinů a diferenciaci buněk (Roberts, 2007). RAS geny představují v genomu oblasti, které jsou obzvláště náchylné ke změnám. Pokud dojde v tomto genu ke změně, RAS zůstane aktivní a buňka se nekontrolovatelně dělí, pokud ovšem nezasáhnou regulátory jako p53, p16INK4A a p14ARF (Roberts, 2007).

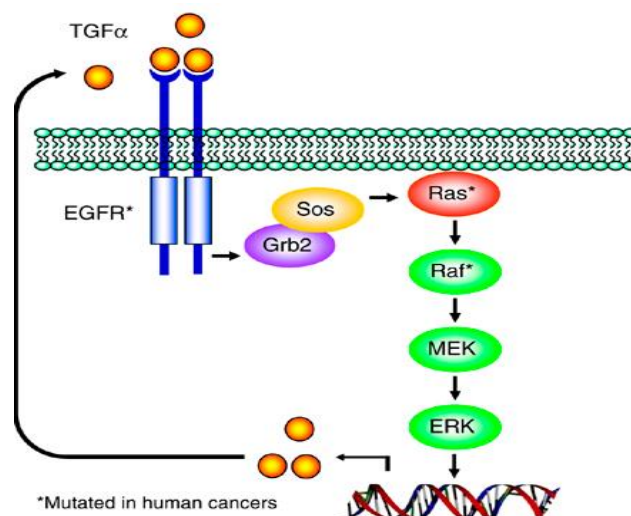
Protein RAF

Všechny proteiny z rodiny RAF, mají shodné tři konzervativní oblasti - CR1, CR2 a CR3. První doména obsahuje specifické místo pro navázání RAS proteinu, druhá oblast je zodpovědná za regulaci BRAF kinázy a třetí doména je zodpovědná za aktivaci RAF enzymu pomocí fosforylace (Mercer et al., 2003).

RAF, tvoří homo nebo hetero dimery, které jsou pozitivně regulovány RAS proteiny. Následkem vytvoření dimeru dojde k aktivaci enzymu RAF. Ze všech členů kináz RAF rodiny, má BRAF nejsilnější enzymatickou aktivitu. Díky tomu stimuluje proliferaci buňky a zabraňuje, aby docházelo k apoptóze. Je to jeden z hlavních genů, ve kterém dochází k mutacím u nádorových buněk (Mercer et al., 2003).

Regulační kinázy MAPK a ERK

Spouštěčem pro signální dráhu MAPK je malý protein RAS, který je spjatý s receptorem EGFR na vnější straně buněčné membrány (Roberts, 2007). Tento protein existuje ve dvou formách, podle toho, na jakou molekulu se váže Ras-GTP/Ras-GDP, což ovlivňuje, jestli je anebo není funkční. Komplex RAS-GTP předá signál o aktivaci serin - threoninové kinázy RAF, která dále aktivuje kinázy MAPKK (mitogen - activated protein kinase - kinase) v literatuře nazývanou také jako MEK a ERK (extracellular regulated kinase) (Roberts, 2007). Aktivovaná ERK vstupuje do jádra, kde fosforyluje různé transkripční faktory a ovlivňuje tak expresi mnoha genů. Nejdůležitější je stimulace přepisu genu pro ligand TGF α , který se váže na EGFR a působí jako zpětná vazba v signální dráze (Roberts, 2007). Mutace v genu pro RAS, RAF nebo overexprese EGFR způsobí stálou aktivaci MAPK signální dráhy, což je znázorněno na obrázku 9 (Roberts, 2007).



Obr. 9: Signální dráha, která vede k proliferaci buňky cestou PI3K a přes MAPK (Roberts et al., 2007).

1.12. Přehled mutací a jejich důsledek

Mutace v genu CDKN2A nejsou běžné u sporadicky vzniklých melanomů, naopak jsou typické pro familiární melanomy, tudíž se jedná o zárodečné mutace (Soufir et al., 2004). Nejčastěji afektovanou oblastí je exon 2, který je společný pro p16/INK4 i pro p14/ARF (Scaini et al., 2014).

Bylo nalezeno velké množství různých bodových mutací v genu CDKN2A. Některé jsou více frekventované, jiné se vyskytují sporadicky, bohužel nelze u většiny z nich s jistotou stanovit, zda jsou patogenní, proto v další kapitole uvádím konkrétní studii, která zahrnovala vzorek pacientů pocházejících z celého světa.

Frekvence mutace v genu CDKN2A stoupá:

- s větším počtem postižených příbuzných
- s přítomností mnohonásobného melanomu
- s rozvojem rakoviny pankreatu. (Soufir et al., 2004)

1.12.1. Meta-analýza výskytu CMM - GenoMEL

Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL) vytvořil doposud největší výzkumný projekt týkající se familiárního melanomu. GenoMel byl založen v roce 1977 a představuje největší vědeckou neziskovou organizaci se zaměřením na familiární melanom. Cílem je sdílení získaných dat a sdružování výsledků v celosvětovém měřítku.

Podle studie, která zahrnovala 466 rodin (celkem 2 137 vyšetřených jedinců) s nejméně 3 případy CMM v rodině, byla detekována u 190 rodin (41%) mutace. Z toho u 178 rodin se týkala isoformy p16/INK4, u 7 rodin byla mutace detekována v isoformě p14/ARF a u 5 - ti rodin v genu CDK4. V tomto genu se obecně mutace vyskytují jen velice vzácně, a pokud ano, zasahují především exon 2, který kóduje vazebné místo pro p16.

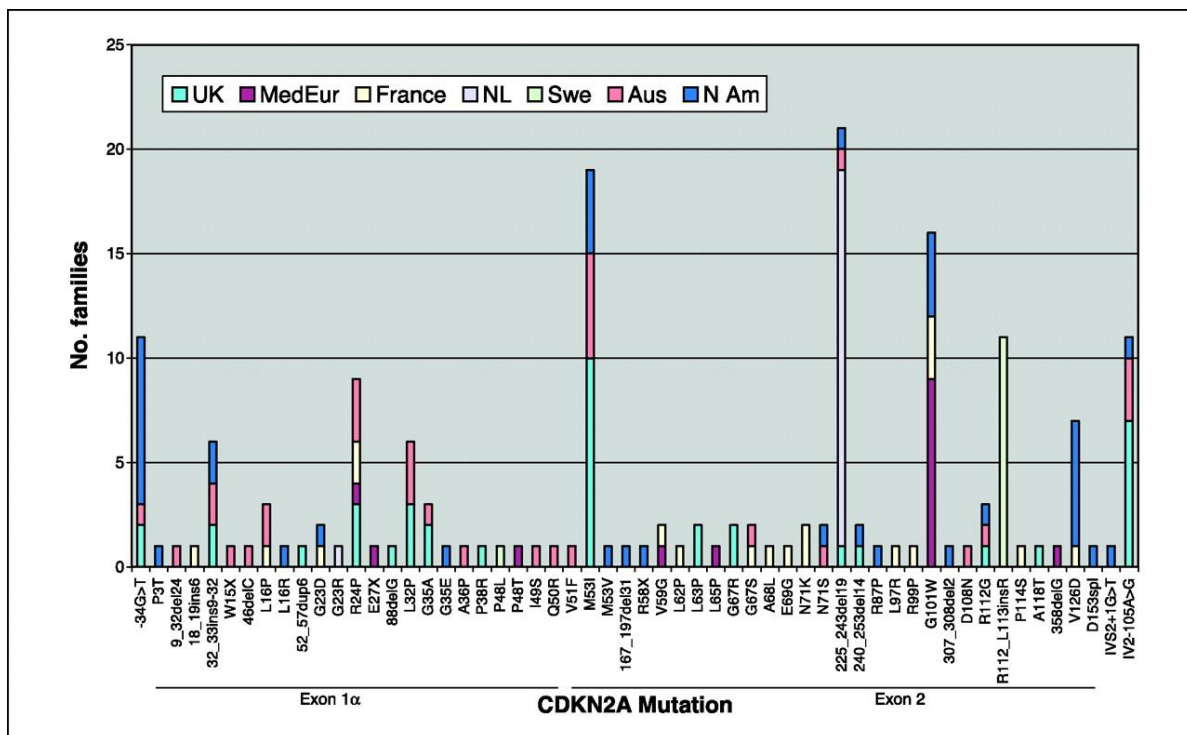
Celkem bylo detekováno 66 různých mutací u 190 postižených rodin. V genu pro CDKN2A bylo odhaleno 65% missense mutací, 16% delecí, 7% inzercí nebo delecí a 5% ostatních typů mutací (nesmyslné nebo sestříhové). Mutace byly detekovány v 40% v exonu 1 α a v 53% v exonu 2 (Goldstein, et al. 2006).

Výskyt nejfrekventovanějších mutací v genu CDKN2A uvádím níže v tabulce VII společně s počtem rodin, u kterých byl defekt zachycen.

Tab. VII: Nejfrekventovanější mutace v genu CDKN2A (Goldstein, et al. 2006).

Lokace mutace	Typ	Počet rodin s detekcí
5'-UTR CDKN2A	c.-34G>T	11
Exon 1 α	c.32_33ins9-32	6
Exon 1 α	c.71G>C	9
Exon 1 α	c.95T>C	6
Exon 2 α	c.159G>A	19
Exon 2 α	c.225_243del19	21
Exon 2 α	c.301G>T	16
Exon 2 α	c.331_332insGTC	11
Intron 2	c.IVS2-105A>G	11

Výskyt konkrétních mutací koreluje nejen s familiární zátěží, ale i s geografickou lokalizací. Výše popsaná studie, která zahrnovala 466 rodin z těchto oblastí: Velká Británie, Španělsko, Itálie, Francie, Nizozemsko, Švédsko, Austrálie a Severní Amerika, potvrdila, že některé mutace mohou být lokálně specifické, jak ukazuje graf na obrázku 10.



Obr. 10: Graf závislosti výskytu konkrétních mutací na geografickém měřítku (Goldstein et al., 2006).

Jak jsem uvedla výše, gen CDK4 je mutovaný jen zřídka. Zpravidla bývá zasažen exon 2 a téměř vždy se jedná o bodové mutace, konkrétně substituce. Do roku 2008 bylo pozorováno pouhých 15 případů rodin s mutacemi v CDK4 na celém světě. U pacientů byly nejčastěji pozorovány mutace - Arg24His a Arg24Cys v exonu 2, který kóduje vazebné místo pro p16 (Goldstein et al., 2002).

1.12.2. Velké genové přestavby v genech CDKN2A a CDK4

Velké genové přestavby v genech CDKN2A a CDK4 nejsou obvyklé. Často jsou spojovány se společným výskytem melanomu a nádoru centrální nervové soustavy (Pasmant et al., 2007). Ve studii Leuseura et al. (2008) bylo testováno 214 osob a mutace byly zachyceny u 48 jedinců. Delece byla detekována pouze u jednoho pacienta (exon 1 α +1712bp_exon 2 +873 bp) (Lesueur et al., 2008).

1.12.3. Mutace u metastazujících nádorů

NRAS

Mutace v NRAS jsou hojné u metastazujících melanomů, proto je genetické testování tohoto genu důležité z hlediska správného léčebného postupu. Změny v genu NRAS jsou nejčastěji bodové mutace a zahrnují zejména kodón 61. Dále jsou to 181 C>A (Q61K - záměna glutaminu za lysin) a 182 A>G (Q61R - záměna glutaminu za arginin) (Ekedahl et al, 2013).

BRAF

Přítomnost mutace v genu pro BRAF kinázu je zvýšená u metastazujících nádorů (59 % pacientů s CMM) a nepřímě koreluje s věkem (Curtin et al., 2006). Diagnostika této aberace je významná pro navržení účinné terapie, například použití léku vemurafenibu průkazně vedlo ke zmenšení nádoru u pacientů s BRAF mutací, naopak stejný lék u nádorů bez mutace nepůsobil.

BRAF mutace, konkrétně V600E - záměna valinu za kyselinu glutamovou (1799 T>A) má za následek ztrátu schopnosti melanocytů se samostatně transformovat. Mutace V600E se vyznačuje jednak tím, že dochází k mnohočetnému zesílení účinku enzymu, a taktéž lze BRAF aktivovat bez signálního proteinu RAS. Navazuje kaskáda procesů jako je zesílení MAPK signální dráhy, což vede k zvýšené proliferaci a odolnosti buněk (Mercer et Pritchard, 2003). Vznikají nové cévy a nádor je tím lépe zásobován živinami.

Druhou nejčastější mutací je V600K - záměna valinu za lysin (1798_1799 GT>AA). Dále byly pozorovány varianty: V600R (1798_1799 GT>AG), V600G (1799 T>G), V600D (1799_1800 TG>AT) (Qi, He et al, 2011).

1.13. Různé přístupy k detekci mutací v genech CDKN2A a CDK4

V této kapitole uvádím nejrozšířenější metody používané k analýzám genů podle typů zjišťovaných mutací. Vzhledem k tomu, že v genech CDKN2A a CDK4 jsou popisovány především bodové mutace, nejpoužívanější metodou v laboratořích se stalo přímé sekvenování daných genů. Mezi další používané metody lze zařadit Real time PCR pro detekci konkrétních bodových mutací, multiple ligation - dependent probe amplification (MLPA), která slouží ke zjištění delecí a inzercí. Pro detekci ztráty heterozygoty jsou využívány mikrosatelity a v neposlední řadě se analyzuje délka restričních fragmentů pomocí restriction fragment length polymorphism (RFLP) PCR.

1.14. Diagnostika

Pro včasnou diagnózu jsou důležitá preventivní opatření, obecně se doporučují pravidelné kontroly dermatologem. Vzhledem k špatným prognózám CMM u pokročilých stádií je vhodné u rizikových skupin provádět jedenkrát ročně celkové tělesné kožní vyšetření TBSE - total body skin examinations a jedenkrát měsíčně SSE - skin self examinations (Aspinwall et al. 2008).

Pacientům, kteří již podstoupili léčbu kožního melanomu, jsou doporučeny pravidelné kontroly dermatologem v rozmezí 3-12 měsíců podle individuálních případů (Onesti et al., 2011).

U nově zachycených případů závisí navržení vhodné léčby na důsledném klinickém vyšetření a určení závažnosti onemocnění. Od roku 1985 se používá mnemotechnická pomůcka ABCD, která určuje kritéria diagnostiky. Zkratka A pochází z anglického asymmetry - tvar, B border - okraje, C colour - barvu, D diameter - velikost pigmentové léze (URL 2). Dle diagnostické významnosti následuje zařazení typu melanomu mezi benigní či maligní nádory. Pro maligní melanom je typická změna velikosti, tvaru, barvy a povrchu. Konkrétně jde o rozšíření plochy (>6mm), asymetrický tvar, ztmavnutí či depigmentace okrsků névů a nepravidelný povrch (URL 2).

Dermatologické vyšetření se provádí pomocí manuálního nebo digitálního dermatoskopu. Oba dermatoskopy fungují jako lupa s osvětlením. Manuální umožňuje zvětšení struktur 10x, digitální 20x až 50x. U digitálního dermatoskopu je navíc možné srovnávat obrázky počátečních stádií (URL 2).

Ukázalo se, že budoucí prognózu ovlivňuje i lokalizace nádoru na těle. Například osoby s axiálními melanomy (na končetinách mimo plosek nohou a dlaní) měly výrazně delší přežití, než pacienti s melanomem na trupu a hlavě. Rovněž je potvrzen vliv věku postižených osob. U pacientů starších 65. let má onemocnění výrazně horší průběh (URL 2).

1.15. Prevence vzniku nádoru

Prevenci vzniku nádoru můžeme rozdělit na primární a sekundární. Rozvoji melanomu (ale i jinému typu rakoviny) můžou předcházet jak nenosiči mutace, tak osoby s detekovanou změnou genomu. Je důležité brát ohled na doporučení odborníků a dbát na prevenci - primární a sekundární. Včasný záchyt kožního melanomu je zcela zásadní a vede k výrazně lepším léčebným výsledkům.

1.15.1. Primární prevence

Při primární prevenci je kladen důraz na snížení incidence melanomu, a to v důsledku informovanosti veřejnosti. Bereme-li v úvahu, že CMM je multifaktoriální onemocnění, měli bychom do primární prevence zahrnout především dodržování určitých zásad. Některé z nich jsou uvedené níže (Krajsová, 2006).

- Ochrana zraku slunečními brýlemi s UV filtrem, zabránění spálení pokožky.
- Vyhnout se soláriím a opalování na prudkém slunci. Doporučuje se používat ochranné krémy s ochranným faktorem SPF 40 a více proti UVA i UVB.
- Nemalý vliv má i složení jídelníčku.
- Je známo, že konzumace alkoholu společně s kouřením ve větší míře okyseluje organismus a napomáhá rozvoji nádorů (Foretová et al. 2009).

1.15.2.Sekundární prevence

Při sekundární prevenci je kladen důraz na snížení mortality pacientů s melanomem, a to v důsledku informovanosti veřejnosti i lékařů. Předpokladem je povědomí široké veřejnosti o vzhledu počínajícího nádoru a taktéž včasná diagnóza odborníka. Do programu sekundární prevence jsou zahrnuty níže uvedená vyšetření (Krajsová, 2006). U diagnostikovaných nádorů se navíc sledují i další tělní orgány pro včasné rozpoznání případných metastáz.

- Samovyšetření pokožky s intervalem 1 měsíc a u specialisty po půl roce. To platí u osob se zachycenou mutací a taktéž u nenosičů mutace z tzv. rizikových rodin, ve kterých se v minulosti melanom již objevil.
- Fotodokumentace nezvyklých znamének, bližší prověření digitálním dermatoskopem případně chirurgické odstranění s histologickou verifikací.
- Alespoň jednou ročně kontrola u očního specialisty a popřípadě také neurologa.
- Ultrazvukové vyšetření břišních orgánů od 30 let, pokud se však v rodině vyskytovala rakovina slinivky, je dobré použít i jiné metody – endoskopickou sonografií.
- Od 40 let by měly být prováděny testy na krev ve stolici pomocí koloskopie.
- Urologické kontroly a u žen ještě gynekologické prohlídky a kontroly prsů od 35 let, od 45 let s použitím mamografu či ultrazvuku (Foretová et al. 2009).

1.15.3.Indikace ke genetickému vyšetření

Prediktivní genetika si klade za cíl na základě analýzy DNA a anamnézy s co největší přesností určit možná rizika vzniku chorob u analyzovaných jedinců, odhalit genetické pozadí narušených molekulárně fyziologických okruhů, které k onemocnění mohou vést, a společně s analýzou osobní a rodinné anamnézy doporučit a analyzovanému jedinci individuální preventivní opatření, které by zamezilo nebo podstatně oddálilo propuknutí choroby (Brdička, 2014).

Familiární a sporadický výskyt onemocnění FAMMM

Pokud onemocnění splňuje kritéria pro familiární nebo sporadický výskyt CMM, je pacientovi doporučeno genetické vyšetření. V případě záchytu mutace by měli screening podstoupit i příbuzní pacienta.

Familiární výskyt

- 1) V rodině byly nalezeny dva maligní melanomy 1-2. stupně s diagnostikou <50 let.
- 2) Tři a více maligních melanomů bez zřetele na věk.
- 3) Dva maligní melanomy společně s nádorovým onemocněním prsu nebo pankreatu.

Sporadický výskyt

- 1) Opakovaný výskyt maligního melanomu u lidí 1.dg. s věkem <50 let.
- 2) Vícečetnost – melanom a další rakovina taktéž 1.dg. s věkem <50 let.

(Foretová et al. 2009)

1.16. Etika testování

Testování jedinci by měli být na začátku vyšetření obeznámeni s možným pozitivním nebo negativním výsledkem genetické analýzy a následně se zdravotním dopadem případného výsledku vyšetření. Každému genetickému testování předchází vyplnění formuláře (informovaného souhlasu), kde jsou tato opatření uvedena. Psychické procesy mají na organismus nemalý vliv a pacient v zásadě může svým chováním napomoci k rozvoji choroby. Například v případě pozitivních, ale i negativních výsledků se může začít chovat rizikově, tj. přestane dbát na dostatečnou ochranu před UV zářením nebo díky stresu navodí v organismu podmínky vhodné k rozvoji rakoviny.

1.17. Léčba

Případy, které jsou jasně diagnostikovány, a je známá tloušťka melanomu, jsou vhodné pro chirurgickou excizi včetně ochranného lemu. Pokud je diagnóza nejednoznačná, je lepší odstranit pouze samotný nádor a později, podle histologických testů dodatečně (po 1-3 týdnech) odstranit i lem v okolí jizvy (URL 2).

Jelikož melanom patří mezi často metastazující nádory, začalo se v poslední době provádět mapování sentinelových uzlin, což jsou lymfatické uzliny lokalizované nejbližší k nádoru. K vyšetření se využívá lymfoscintigrafie, kdy se vpichuje do okolí nádoru koloidní roztok technecia 99. Po 2-24 hodinách lze viditelně rozpoznat, kde má být proveden chirurgický zákrok (URL 2).

Po chirurgickém odstranění je pacient pod pravidelným lékařským dohledem. Je to z důvodu vzniku duplicitního melanomu nebo metastáz, které průměrně nastoupí u 50% případů během 5 - ti let od excize. U vyšších stádií CMM se díky sonografii břicha, vyšetření mízních uzlin a rentgenu plic ověřuje, zda po chirurgickém odstranění nedošlo k zasažení jiných orgánů v těle. (URL 2)

Ve druhém a třetím stádiu onemocnění se podává interferon alfa nebo se provádí excize metastáz. Lze použít i aktinoterapii, kryoterapii (zmrazení konkrétní tkáně), laserovou terapii nebo lokální terapii specifickými léky. Jedinci se vzdálenými metastázami podstupují chemoterapii. V rámci této léčby jsou využívány různé inhibitory kináz s ohledem na jiné mutace v nádorových buňkách např. BRAF. Pro BRAF se nejčastěji užívá vemurafenib v pokročilých stádiích, alternativou je dabrafenib. Trametinib je vhodný, vysoce specifický inhibitor MEK kinázy u pacientů s BRAF mutací V600E nebo V600K (Homet et Ribas. 2014).

2. Experimentální část práce

2.1. Metodika pro analýzu vybraných oblastí genu CDKN2A a CDK4

Přehled použitých metod:

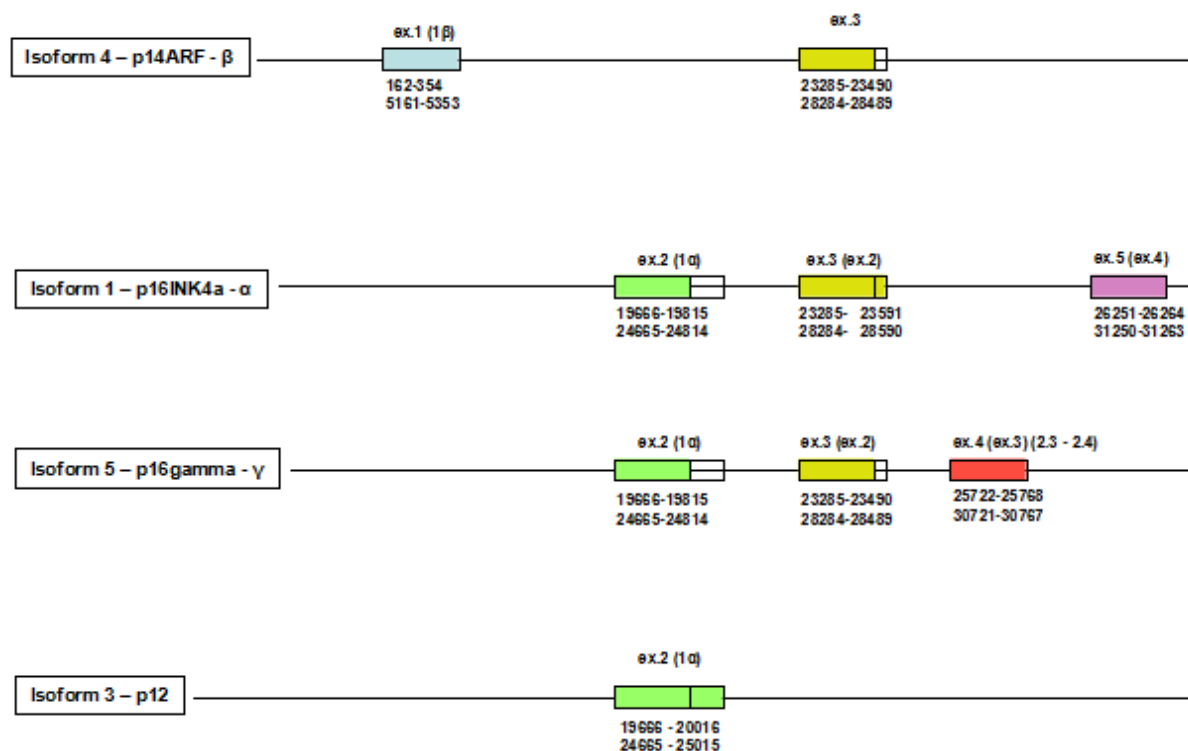
- izolace DNA z bukalního stěru nebo z nesražené periferní krve
- PCR reakce se specifickými primery
- identifikace PCR produktů na agarózovém gelu
- příprava PCR produktů pro přímou sekvenaci
- sekvenace PCR produktů
- analýza získaných sekvencí

Pro izolaci genomické DNA byly použity dvě metody - z bukalního stěru nebo z nesražené periferní krve. Vzhledem k minimálním odchylkám v koncentraci DNA nebyla volba izolační metody zásadní. Pro bukalní stěr byl použit DDK Isolation Kit od firmy Isohelix a pro nesraženou periferní krev ISOLATE II Blood DNA Kit od firmy Bioline.

Vzhledem k široké škále mutací, které mohou být přítomny v genech CDKN2A a CDK4, bylo vhodné provést analýzu exonů 1 α , 1 β , 2, 3 a přilehlých oblastí pokrývajících intron-exonová spojení. Dále byla analyzována část intronu 4 genu CDKN2A (pro případnou detekci mutace IVS2-105A/G) a exon 2 genu CDK4.

Pomocí alelově specifické PCR reakce byly amplifikovány výše uvedené části genu a ty byly dále přímo sekvenovány. Na obrázku 11 jsou znázorněny testované isoformy včetně oblastí exonů, které je tvoří (formální značení exonů je zde uvedeno v závorce). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny níže v tabulce VIII společně s velikostí PCR produktů.

CDKN2A



Obr. 11: Isoformy genu CDKN2A, které jsou tvořeny různými exony (formální značení je uvedeno v závorce). Čísla sekvencí jsou zapsána pod exony (schéma vytvořil RNDr. Petr Grossmann).

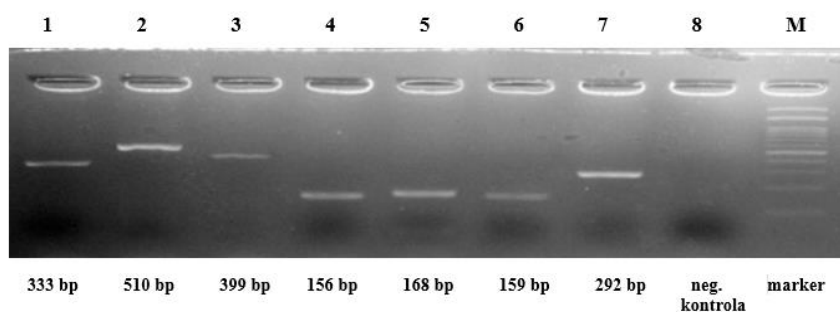
PCR reakční mix (50 μ l) pro jednu reakci obsahoval: 40ng gDNA, 10 μ l My Taq Red Reaction Buffer 5 \times (Bioline), 0,2 μ M forward primer, 0,2 μ M reverse primer, 2,5 U My Taq Red DNA Polymerase (Bioline), 33 μ l ddH₂O, 5% DMSO.

Takto připravený reakční mix byl připraven pro PCR reakci, která proběhla v cycleru MultiGene (Labnet). Teplotní profil PCR reakce byl následující: počáteční denaturace 9 min při 95°C následovalo 40 cyklů složených z 60 s při 95°C, 60 s při 60°C a 60 s při 72°C, poté proběhla závěrečná extenze 7 min při 72°C a chlazení při 14°C.

Tab. VIII: Sekvence primerů, které byly použity a délka PCR produktů.

	Číslo PCR reakce	Exon / Intron	Sekvence 5' - 3'	F/R primer	délka primeru	Velikost PCR produktu (bp)
Gen CDKN2A	1	1β	AGTTAAGGGGGCAGGAGTG	F	19	333
			AAACAAAACAAGTGCCGAATG	R	21	
	2	1α	ACCGGAGGAAGAAAGAGGAG	F	20	510
			CCCTTCAGATCTTCTCAGCATT	R	22	
	3	2	AGCTTCCTTTCCGTCATGC	F	19	399
			GGGTACAAATTCTCAGATCATCA	R	23	
	4	3	CAGAAGCCAGAGCACATGAA	F	20	156
			CAGCTTGCGATAACCAAAGG	R	20	
	5	4	GGTAGGGACGGCAAGAGAG	F	19	168
			CCTGTAGGACCTTCGGTGAC	R	20	
	6	intron 4	TACATGCACGTGAAGCCATT	F	20	159
			TTCTTTCAATCGGGGATGTC	R	20	
Gen CDK4	7	2	GCGACTTTTGGTGATAGGAGTC	F	22	292
			CAACCCTCCACCACCTTCT	R	19	

PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy (obr. 12) na 2% agarózovém gelu (Fasgene Agarose for DNA I RNA, Elisabeth Pharmacon), pro vizualizaci byla použita barva Midori Green Advance DNA Stain (Nippon) a pro stanovení délky PCR fragmentů (Tab. VIII) hmotnostní marker 100bp DNA Ladder H3 RTU (Nippon).



Obr. 12: Vizualizace PCR produktů na 2% agarózovém gelu. V horní části je pořadí reakcí, spodní část obsahuje délku PCR produktů a M je hmotnostní marker 100bp DNA Ladder H3 RTU.

Pro přečištění PCR produktu do sekvenační reakce byla použita enzymatická směs ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix) dle protokolu od výrobce. K 5 μ l PCR produktu byly přidány 2 μ l EXO SAP - IT. Poté proběhla inkubace v termostatu TDB-120 Dry Block (Biosan) 15 min při 37°C a 15 min při 80°C. Pro sekvenaci bylo použito cca 50 ng PCR produktu a 0,5 μ l (0,2 μ M) primeru forward nebo reverse. Výběr primeru pro sekvenační reakci závisel na lokalizaci kódující oblasti a předchozích zkušenostech (vzorek 1/F, 2/F a R, 3/F a R, 4/F a R, 5/R, 6/R, 7/F a R).

Sekvence byla provedena pracovníky firmy SEQme s.r.o. Pro analýzu sekvenačních dat jsem využila program Chromas Version 2.4. Získanou sekvenci jsem porovnála v genové databázi NCBI BLAST s referenčními sekvencemi zkoumaných genů. Přístupové číslo (tzv. accession number) sekvence genu *CDKN2A* je NG_007485 a genu *CDK4* NG_007484. Na základě porovnání sekvenčních dat testovaného vzorku a referenční sekvence ve výše uvedené genové databázi jsem ověřila, zda je pacient nosič nebo nenosič mutace.

3. Závěr

V důsledku mnoha faktorů působících na organismus celosvětová incidence kožního melanomu stále roste, a proto včasná prevence a s tím spojené genetické testování zejména genů CDKN2A a CDK4 nabývá stále většího významu. Je proto nezbytné, aby byla široká laická veřejnost, ale i odborníci ve zdravotnictví s touto problematikou obeznámeni.

V této práci jsem se snažila poskytnout přehled o genetickém pozadí syndromu familiárního melanomu. Zabývala jsem se především geny CDKN2A a CDK4 a jejich úlohou v buněčné proliferaci. Buněčné procesy jako proliferace, přežívání melanocytů, pigmentace atd. jsou samy o sobě složité a komplexní děje, proto pro jejich správné pochopení bylo nezbytné genetickou podstatu rozšířit o molekulární pozadí.

Experimentální část bohužel nemohla být statisticky zpracovaná, vzhledem k nízkému počtu vyšetřených osob v laboratoři. Ačkoli jsem požádala řadu odborníků, zabývajících se syndromem FAMMM o poskytnutí základních údajů o zachycených mutacích, setkala jsem se pouze s negativní nebo žádnou odezvou. Přesto byla experimentální část přínosná, zejména pro rozšíření mých praktických dovedností v laboratoři a pro pochopení problematiky mutační analýzy genů.

4. Literatura

ASPINWALL L. G., et al., (2008): CDKN2A/p16 genetic test reporting improves early detection intentions and practices in high-risk melanoma families. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17(6): 1510-1519.

BADENAS C., Aguilera P., Puig-Butillé J. A., Carrera, C., Malveyh J. and Puig S. (2012): Genetic counseling in melanoma. *Dermatologic Therapy*, 25: 397–402.

BAJČIOVÁ, V. (2013): Maligní melanom u dětí a adolescentů. *Onkologie*, 7.2: 69-73.

BALCH C. M., Buzaid A.C., Soong S.J., et al. (2001): Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 19: 3635–3648.

BISHOP DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Paillerets BB, Chompret A, Ghiorzo P, Gruis N, Hansson J, et al. (2002): Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 94: 894–903.

BORG Å, Sandberg T, Nilsson K, Johannsson O, Klinker M, Mäsback A, Westerdahl J, et al. (2000): High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1260–1266.

BRDIČKA, Radim. *Genetika v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Galén, c2014-, 126s. ISBN 978-80-7492-106-3.

CARREIRA, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K. S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C. R. (2006): Mitf regulation of Dial1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.*, 20: 3426-3439.

CURTIN JA, Busam K, Pinkel D et al.(2006): Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*, 24(26): 4340 – 4346.

DIEPGEN T.L., MAHLER V., 2002: The epidemiology of skin cancer. *British Journal of Dermatology*, 146 (61): 1 – 6.

EKEDAHL, Henrik, et al. (2013): The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic- based metastatic melanoma cohort. *British Journal of Dermatology*, 169 (5): 1049-1055.

FORETOVÁ L., Macháčková E., Šachlová M., et al. (2009): Syndrom familiárního melanomu (s dysplastickými nevy či bez nich). *Klin Onkol*, 22: S32-S33.

FLORELL S.R., Boucher K.M., Garibotti G., et al. (2005): Population-based analysis of prognostic factors and survival in familial melanoma. *J Clin Oncol*, 23: 7168–77.

GOLDSTEIN A., et al. (2002): Rarity of CDK4 germline mutations in familial melanoma. *Melanoma research*, 12 (1): 51-55.

GOLDSTEIN A., Chan M., Harland M., et al. (2006): High-risk Melanoma Susceptibility Genes and Pancreatic Cancer, Neural System Tumors, and Uveal Melanoma across GenoMEL. *Cancer research*, 66(20): 9818-28.

GOLDSTEIN A., Chan M., Harland M., Azizi et al., (2007): Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *Journal of medical genetics*, 44(2): 99–106.

GREENLEE, Robert T., et al (2000): *Cancer statistics, 2000*. CA: a cancer journal for clinicians, 50.1: 7-33.

HOCKER T., TSAO H. (2007): Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Human mutation*, 28(6): 578-588.

HOMET B., Ribas A. (2014): New drug targets in metastatic melanoma. *The Journal of pathology*, 232(2): 134-141.

CHUDNOVSK Y, et al. *J Clin Invest*, 1 April 2005, 115(4): 813–824

JAREŠOVÁ RŮŽIČKOVÁ L. (2013): Melanocyty, cévní a nervový systém v kůži, kapilaroskopie. *Dermatol. praxi*, 7(1): 36–38.

JI Z, Njauw CN, Taylor M, Neel V, Flaherty KT, Tsao H. (2012): p53 rescue through HDM2 antagonism suppresses melanoma growth and potentiates MEK inhibition. *J Invest Dermatol*, 132: 356–364.

KRAJSOVÁ, Ivana, *Melanom*. 1. vydání Praha: MAXDORF 2006. 332 s. ISBN-80-7345-096-8.

LAZAROV, M., Kubo, Y., Cai, T., Dajee, M., Tarutani, M., Lin, Q., Fang, M., Tao, S., Green, C. L., Khavari, P. A. (2002): CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nature Med*. 8: 1105-1114.

LEACHMAN S. A. et al. (2009): Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61(4): 677.e1 - 677.e14.

LEE, Jin-Young (2014): Down-regulation of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expressions by compounds isolated from *Pruni persicae* Flos in murine B16F10 melanoma. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57 (6): 827-834.

LESUEUR F., et al. (2008): The contribution of large genomic deletions at the CDKN2A locus to the burden of familial melanoma. *British journal of cancer*, 99 (2): 364-370.

LIN Y. C., et al. (2007): Human p16 γ , a novel transcriptional variant of p16INK4A, coexpresses with p16INK4A in cancer cells and inhibits cell-cycle progression. *Oncogene*, 26(49): 7017-7027.

LYNCH H. T., Brand R. E., Hogg D., et al. (2002): Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma–pancreatic carcinoma–prone families. *Cancer*, 94: 84–96.

MERCER, K. E., C. A. Pritchard (2003): Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta*, 1653(1): 25-40.

NOVOTNÝ (2013): Prekancerózní stavy a rizikové faktory karcinomu pankreatu a žlučových cest. *Klinická onkologie*, 26: 29–33.

ONESTI G. M., Fallico N., Ciotti M., Pacitti F., Lieto P., Clerico R. (2011): Management and follow-up of a patient with Familial Atypical Multiple Mole-Melanoma (FAMMM) Syndrome. *Giornate di Chirurgia*, 33(4): 132-135.

OUELLE, Dawn E., et al. (1995): Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, 83(6): 993-1000.

PALMER, James S., et al. (2000): Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype?. *The American Journal of Human Genetics*, 66 (1): 176-186.

PASMANT E. et al. (2007): Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer research*, 67 (8): 3963-3969.

PRICE, E. R., Ding, H. F., Badalian, T., Bhattacharya, S., Takemoto, C., Yao, T. P., Hemesath, T. J., Fisher, D. E. (1998): Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. *J.Biol.Chem.*, 273: 17983-17986.

QI, R. Q., L. He, et al. (2011): BRAF exon 15 T1799A mutation is common in melanocytic nevi, but less prevalent in cutaneous malignant melanoma, in Chinese Han. *J Invest Dermatol*, 131(5):1129-1138.

ROBERTS, P. J., DER, C. J. (2007): Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22): 3291-3310.

ROBERTSON K. D., Jones P. A. (1999): Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. *Oncogene*, 18: 3810-3820.

REEF S., et al. (2007): The autophagic inducer smARF interacts with and is stabilized by the mitochondrial p32 protein. *Oncogene*, 26(46): 6677-6683.

SCAINI M. CH., Minervini G., et al. (2014): CDKN2A Unclassified Variants in Familial Malignant Melanoma: Combining Functional and Computational Approaches for Their Assessment. *Human mutation*, 35: 828-840.

SOUFIR N., Lacapere J., Bertrand G., et al. (2004): Germline mutations of the INK4a-ARF gene in patients with suspected genetic predisposition to melanoma. British Journal of Cancer, 90: 503–509.

TSAO H., Chin L., Garraway L. A., Fischer D. E. (2012): Melanoma: from mutations to medicine. *Genes & Development*, 26: 1131-1155.

UDAYAKUMAR D., Bisundev Mahato, Tsao H. et al. (2010): Genetic Determinants of Cutaneous Melanoma Predisposition. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 29(3): 190-195.

VANNESTE R., Smith E., Graham G. (2013): Multiple neurofibromas as the presenting feature of familial atypical multiple malignant melanoma (FAMMM) syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 161A: 1425–1431.

Internetové zdroje:

URL 1: Arenbergerová M. a Arebenrg P. Maligní melanom kůže (článek pro širokou odbornou veřejnost). In Melanomy.cz [online]. Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FNKV Praha, 2005. [vid. 2015-01-15]. Dostupné z: <http://www.melanomy.cz/?touch=malignimelanom>

URL 2: Kružicová Z. Maligní melanom. In Postgraduální medicína [online]. Univerzita Karlova v Praze, 7.4.2010. [vid. 2014-12-14]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/maligni-melanom-450829>

URL 3: National Cancer institute. Surveillance, Epidemiology, and Results Program. National Cancer institute [online]. [vid-2015-2-27]. Dostupné z: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>

URL4: American cancer society. Cancer Facts and Figures [online]. [vid-2015-2-27]. Dostupné z: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/allcancerfactsfigures/index>

URL5: Globocan 2012. Incidence/Mortality>rates populations by cancer [online]. [vid-2015-1-14]. Dostupné z: http://globocan.iarc.fr/old/summary_table_site-html.asp?selection=23090&title=Pancreas&sex=0&type=0&window=1&america=2&europe=4&sort=0&submit=%C2%A0Execute

URL 6: Melanomy.cz. Co je to melanom? [online]. Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FNKV Praha, 2005. [vid. 2015-01-15]. Dostupné z: <http://www.melanomy.cz/?touch=cojetomelanom>

URL 7: Salátková D. Zdravé opalování neexistuje [online]. Praha, 24. 4. 2007 [vid. 2014-12-14]. Dostupné z: <http://ihned.cz/c1-20985280-zdrave-opalovani-neexistuje>

URL 8: Melanomy.cz. Prevence vzniku melanomu [online]. Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FNKV Praha, 2005. [vid. 2015-01-15]. Dostupné z: <http://www.melanomy.cz/?touch=prevence>

URL 9: Konrád P. Klasifikace, Diferenciální diagnostika a dispenzarizace. In Mateřská znaménka [online]. Kožní ambulance Dobřichovice. [vid. 2015-4-10]. Dostupné z: <http://www.znamenka.cz>