

# Od keratynocyty do raka: patogeneza i model raka kolczystokomórkowego skóry

Vladimir Ratushny, Michael D. Gober, Ryan Hick, Todd W. Ridky, John T. Seykora

Department of Dermatology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, Stany Zjednoczone

Adres do korespondencji: John T. Seykora, University of Pennsylvania Medical School, 235a Clinical Research Building, 415 Curie Blvd, Philadelphia 19104, USA; e-mail: john.seykora@uphs.upenn.edu

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłosili żadnego konfliktu interesów

J Clin Invest. 2012;122(2):464-472.

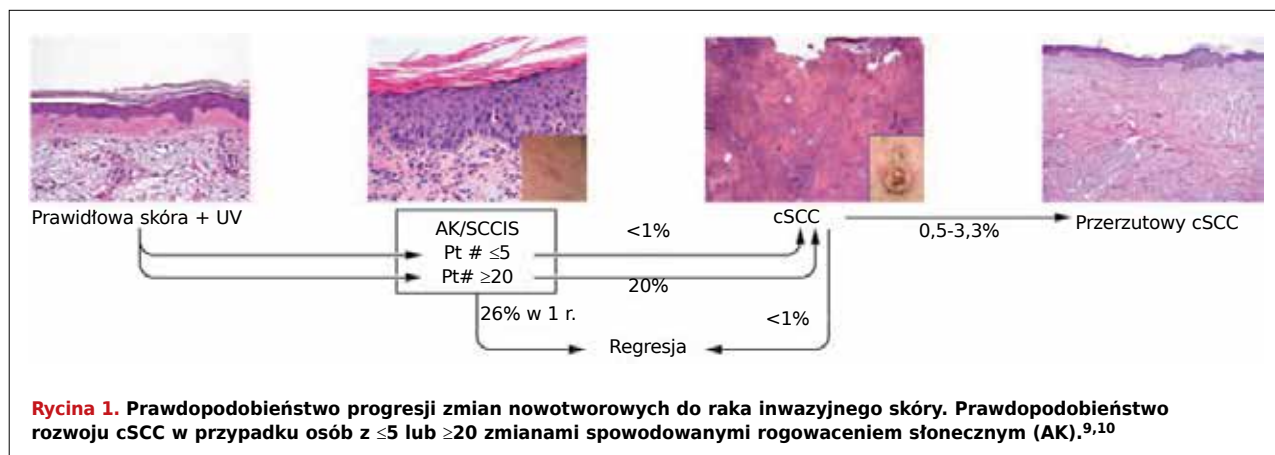
Dermatologia po Dyplomie 2012;3(6):38-50

**R**ak kolczystokomórkowy skóry (cSCC) jest drugim – po raku podstawnokomórkowym – najczęściej występującym nowotworem u człowieka. Rocznie w Stanach Zjednoczonych stwierdza się ponad 250 000 nowych przypadków. Objawy tego raka to zwykle kontinuum zmian o nasilającym się zaawansowaniu, począwszy od zmiany prekursorowej – rogowacenia słonecznego, raka kolczystokomórkowego *in situ*, inwazyjnego sSCC do przerzutowego SCC. W tym przeglądzie omówiono parametry kliniczne i molekularne stosowane do określenia nowotworów skóry i połączono je z licznymi podejściami eksperymentalnymi stosowanymi w badaniach tej choroby. Wyniki uzyskane w badaniach modeli cSCC wyznaczają nowe cele lecznicze.

## Wprowadzenie

Rogowacenie słoneczne (actinic keratosis, AK) jest prawdopodobnie najczęstszym wywodzącym się z keratynocytów stanem przedrakowym u ludzi, stwierdza się je głównie u osób o jasnej karnacji w okolicach ekspozowanych na promieniowanie słoneczne.<sup>1,2</sup> Głównym czynnikiem ryzyka AK jest skumulowana ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (UV) pochodzące ze słońca lub lamp opalających. Biorąc pod uwagę starzenie się populacji amerykańskiej, spodziewany jest wzrost częstości występowania AK.<sup>3-5</sup> Rogowacenie słoneczne często stwierdza się na skórze z ogniskami raka kolczystokomórkowego (cSCC).<sup>6</sup> AK postępuje do cSCC ze wskaźnikiem ocenianym na 0,025 do 16% dla pojedynczej zmiany rocznie.<sup>7,8</sup> U typowego chorego stwierdza się 6-8 zmian, dlatego u pacjenta z wieloma ogniskami AK roczne ryzyko rozwoju inwazyjnego raka kolczystokomórkowego (SCC) wynosi 0,15-80%.<sup>2,3,6,7</sup> Ta duża różnica ryzyka świadczy o braku szczegółowej wiedzy na temat rozwoju raka w naskórku. Ocenia się, że około 26% ognisk AK ulega regresji w ciągu roku.<sup>8</sup> Prawdopodobieństwo rozwoju cSCC lub zmian przerzutowych w przypadku AK lub u pacjenta z mnogimi AK przedstawiono na rycinie 1.<sup>9,10</sup>

Na poziomie histopatologicznym rogowacenie słoneczne charakteryzuje się dysplazją, z keratynocytami o atypowych, powiększonych, nieregularnych i hiperchromatycznych jądrach. Ogniska AK charakteryzują również dezorganizacją wzrostu, z zakłóconym procesem różnicowania, co prowadzi do pogrubienia warstwy rogowej z przetrwałymi jądrami. Do oceny dysplazji naskórkowej opracowano trzystopniową skalę, podobną do stosowanej przy dysplazji szyjki macicy.<sup>11</sup> Śródnaskórkowa neoplazja keratynocytów I stopnia (keratinocytic intraepidermal neoplasia, KIN I) charakteryzuje się atypią komórkową w obrębie keratynocytów warstwy podstawnej, ograniczającą się do jednej trzeciej dolnej naskórka. W KIN II atypowe keratynocyty zajmują dolne dwie trzecie naskórka, a w KIN III występują w całym naskórku; to ostatnie stadium jest równoznaczne z rakiem *in situ*.<sup>11</sup> Zlokalizowana atypia naskórkowa w rogowaceniu słonecznym odzwierciedla częściowe zaburzenia różnicowania,



podczas gdy całkowite zaburzenia różnicowania związane są z SCC *in situ* (SCCIS). Wskaźnik regresji AK wykazuje odwrotną zależność ze stopniem dysplazji, jak obserwuje się w nabłonku pochwy.<sup>12</sup> Podczas gdy kryteria stopniowania KIN oceniają makro- i mikroskopowe cechy AK, rozpoznanie genetycznych i molekularnych nieprawidłowości związanych z tymi zmianami dostarczyło danych mechanistycznych na temat patogenezy zmian (ryc. 2).








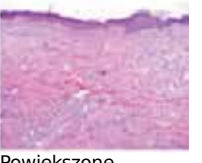
W zrozumieniu progresji od AK do sSCC przydatny jest klasyczny wielostopniowy model kancerogenezy.<sup>13</sup> Zgodnie z tym modelem mutacje w jednym genie, często w genie supresorowym guza, mogą prowadzić do rozwoju zmiany prekursorowej charakteryzującej się zwiększoną niestabilnością genetyczną i utratą kontroli cyklu komórkowego. Dodatkowe mutacje w innych onkogenach umożliwiają powstawanie dalszych cech neoplastycznych, prowadzących do rozwoju raka inwazyjnego; uważa się, że liczba zmian genetycznych potrzebnych do przejścia od prawidłowego nabłonka do raka przerzutowego narządów wewnętrznych waha się od czterech do sześciu.<sup>13</sup> W modelach 3D ludzkiego naskórka wykazano jednak, że do wywołania SCC wystarczą zaledwie dwie mutacje protoonkogenów.<sup>14,15</sup> Lepsze zrozumienie regulacji epigenetycznej ekspresji onkogenów i antyonkogenów dostarczy nowych informacji do już złożonej regulacji wielostopniowego modelu kancerogenezy.

Jak w przypadku innych nowotworów, cSCC jest wyrazem upośledzonej stabilności genomu, która ułatwia nowe mutacje.<sup>16</sup> Mechanizm prowadzący do niestabilności genomu keratynocytów prawdopodobnie wynika z indukowanej UVB inaktywacji białka p53, ponieważ około 58% cSCC cechuje się sygnaturowymi mutacjami UVB typu tranzycji CC→TT i C→T.<sup>17</sup>

Znaczenie p53 w kancerogenezie indukowanej UVB zostało potwierdzone u myszy *p53*<sup>-/-</sup>, które charakteryzuje zwiększona skłonność do rozwoju zmian typu AK i sSCC wtórnych do ekspozycji na UVB.<sup>18</sup> Od czasu początkowych obserwacji mutacji w p53 indukowanych promieniowaniem UV, inne zespoły badawcze potwierdziły obecność mutacji p53 w istotnym odsetku przypadków cSCC.<sup>19-21</sup>

Gen *p53* jest często zmutowany w ogniskach AK, co wskazuje na to, że zmiany dysplastyczne cechują się nabytymi początkowymi mutacjami genetycznymi jeszcze zanim przekształcą się w cSCC.<sup>20,22</sup> W dodatkowych badaniach wykazano duże rozpowszechnienie (74%) mutacji *p53* w niezmienionej skórze ekspozowanej na słońce w porównaniu do skóry nieekspozowanej (5%)<sup>23</sup> i ustalono, że do nabywania mutacji dochodzi na poziomie onkogenów. Spójne z tymi odkryciami jest stwierdzenie mutacji w białku p53 w 40% SCCIS, co wskazuje, że utrata p53 nastąpiła wcześniej niż pojawienie się guza.<sup>24</sup> Natomiast niektóre nowotwory złośliwe narządów wewnętrznych wykazują mutację genu *p53* jako ostatnie zdarzenie w rozwoju nowotworu po powstaniu zmiany inwazyjnej.<sup>25-27</sup>

W cSCC u człowieka ma miejsce nieprawidłowa aktywacja EGFR i Fyn, kinazy tyrozynowej z rodziny Src (SFK), prowadząca do zmniejszenia syntezy mRNA dla p53 oraz stężenia tego białka przez mechanizm zależny od c-Jun,<sup>28,29</sup> co ujawnia kolejny mechanizm kontroli funkcji p53. Dodatkowe zdarzenia molekularne związane z rozwojem AK obejmują zwiększoną aktywację lub stężenie SFK, EGFR, Myc i ATF-3.<sup>30-33</sup> Ponadto w AK stwierdzano również zwiększoną aktywność 5'-fosfatazy polifosforanu inozytoli, co może powodować wzrost natężenia przekazywania sygnału PI3K/Akt.<sup>34</sup>

	Prawidłowa skóra	Rogowacenie	Słoneczny cSCC	Przerzutowy cSCC
Opis kliniczny				
Histopatologia				
Opis histologiczny	Dobrze odgraniczona warstwa podstawna, warstwa kolczysta i warstwa ziarnista z łuską ortokeratocytzną	Powiększone, atypowe keratynocyty z łuską parakeratocytzną	Powiększone, atypowe keratynocyty wnikające do skóry właściwej	Powiększone, atypowe keratynocyty w skórze właściwej, węzłach chłonnych lub narządach wewnętrznych, zazwyczaj bez połączenia z naskórkiem
Nasilenie przekazywania sygnałów (pobudzenie, nadekspresja, amplifikacja)		ras Fyn/SFKs bcl-2	ras Fyn/SFKs c-myc bcl-2 STAT-3 β-1 integryna MMP	Oprócz takich zmian jak w cSCC: VEGF (ras) MMP2 MMP7 MMP12 (ras)
Redukcja przekazywania sygnałów (deaktywacja, represja transkrypcji lub translacji lub delekcja genu)		p53 Srcasm	P53 Srcasm Notch (p53) PKC δ E-kadheryna	Oprócz takich zmian jak w cSCC: E-kadheryna P-kadheryna
Zmiany w genomie		Niestabilność genomowa z kilkoma zmianami chromosomalnymi	Zwiększona niestabilność genomowa prowadząca do translokacji chromosomów, izochromosomów, delekcji genów i amplifikacji	

**Rycina 2. Kliniczne, histologiczne i molekularne porównanie AK, SCC i przerzutowego cSCC. Przedstawiono częste kliniczne, histologiczne i molekularne cechy nowotworów skóry człowieka.**

W badaniach immunohistochemicznych AK oceniających stężenie p53 uzyskiwano różne wyniki, ale wiele z nich potwierdziło zwiększone stężenie tego białka w komórkach pochodzących ze zmian, co prawdopodobnie jest wynikiem zwiększonej stabilności zmutowanego białka p53.<sup>35</sup> Aby powiązać swoje mutacje p53 obserwowane w ludzkich AK ze zmienionym stanem czynnościowym i stabilnością białek, potrzeba większej liczby badań mechanistycznych.

W badaniach dotyczących utraty heterozygotyczności w AK wykazano zmiany genetyczne w następujących loci: 3p, 9p, 9q, 13q, 17p i 17q; dane te

wskazują, że istotna niestabilność genomowa jest już obecna na etapie przednowotworowym AK.<sup>36</sup> Nie stwierdzono jednak, aby zmienione geny, microRNA (miRNA) i długie niekodujące RNA (lncRNA) były związane z mechanizmami prowadzącymi do rozwoju nowotworu.

Utratę heterozygotyczności obserwowano w cSCC na chromosomie 9p w przypadku 13 spośród 16 guzów pierwotnych.<sup>37</sup> Utrata heterozygotyczności p16, regulatora cyklu komórkowego mieszczącego się w tym obszarze, może być związana z przejściem AK w cSCC (38), a utrata funkcji p16 jest częstsza w przypadku

cSCC w porównaniu ze zmianami przednowotworowymi.<sup>39-41</sup> Dodatkowe loci utraty heterozygotyczności w cSCC włączają 3p, 2q, 8p i 13 oraz dodatkowe allele na 3q i 8q.<sup>37</sup>

Amplifikacja i mutacje aktywujące onkogeny *Ras* zostały stwierdzone w przypadkach SCC i AK.<sup>42,43</sup> Spośród trzech genów *Ras*, onkogen *Hras* (Harvey rat sarcoma virus) jest zwykle zmutowany w populacji ogólnej.<sup>44</sup> Członki *Ras* są rodziną białek wiążących GTP, które należą do najczęściej zmutowanych genów w nowotworach człowieka.<sup>45</sup> Ostatnie dane z katalogu mutacji somatycznych w nowotworach (COSMIC; Sanger Institute) wskazują, że 21% cSCC ma mutacje aktywujące *Ras* (9% *Hras*, 7% *Nras*, 5% *Kras*).<sup>46</sup> Wszystkie charakterystyczne mutacje w kodonach 12, 13 i 61 *H-Ras* są zlokalizowane naprzeciwko dimerów pirymidynowych (C-C) i prawdopodobnie wynikają z ekspozycji na UVB.<sup>42</sup>

### Znaczenie macierzy pozakomórkowej i składowych błony podstawnej w SCC

Interakcje między komórkami guza a macierzą pozakomórkową i błoną podstawną (basement membrane zone, BMZ) są ważnymi determinantami nowotworzenia i mają znaczenie w cSCC.<sup>47</sup>

Laminina 332 i jedno z łączących się z nią białek, integryna  $\alpha 6 \beta 4$ , okazały się potrzebne w nowotworzeniu na modelu mysim ksenograftu ludzkiego SCC.<sup>14</sup> W tym modelu powstawanie guza z ludzkich keratynocytów zmienionych w wyniku ekspresji *HRAS* i *I $\kappa$ B $\alpha$*  za pośrednictwem retrowirusów zostało całkowicie zahamowane przez skierowane przeciwko lamininie 332 lub  $\beta 4$  integrynie przeciwciała blokujące. Kolagen VII jest składową włókien kotwiczących błonę podstawną w skórze właściwej. W modelu 3D SCC deplecja kolagenu VII pośredniczona si-RNA promowała migrację, inwazję, dezorganizowała różnicowanie i przejście nabłonkowo-mezenchymalne.<sup>48</sup> Do określenia profili ekspresji genów komponentów nabłonkowych i mezenchymalnych guzów ważnych dla kancerogenezy wykorzystano model 3D.<sup>49</sup> Ekspresja  $\beta 1$ -integryn i ich ligandów koreluje z progresją guza w skórze człowieka, tak więc dalsza charakteryzacja mitogennych mechanizmów sygnałowych między *HRAS* i kompleksem integryna/BMZ prawdopodobnie wzbogaci wiedzę na temat patogenezy cSCC.

### Identyfikacja pochodzenia komórek w SCC

Komórki macierzyste zlokalizowane w wybrzuszeniu mieszków włosowych, w warstwie podstawnej naskórka międzymieszkowego oraz komórki macierzyste naskórka mają potencjał samoodnawiania się i wielokierunkowego różnicowania. Podejrzewano, że są to komórki, z których powstaje cSCC.<sup>50</sup> W chemicznym modelu kancerogenezy cSCC 7,12-dimetylo-1,2-benzantracen (DMBA) inicjował tworzenie się guza w naskórku myszy leczonych 5-fluorouracylem (5-FU), substancją, która zabija komórki naskórka w fazie czynnej cyklu komórkowego.<sup>51</sup> Dane te wskazują, że guzy powstają z komórek macierzystych naskórka niewrażliwych na 5-FU pozostających w fazie spoczynku, a nie z szybko dzielących się komórek naskórka. Przy ekspresji onkogennej *Hras* w ponadpodstawnych komórkach mysiego naskórka pod wpływem promotora genu keratyny 10 w miejscu zranienia obserwowano łagodne brodawczaki i łagodne nowotwory skóry.<sup>52</sup> Kiedy ten sam onkogen ulegał ekspresji w mieszkach włosowych pod wpływem promotora genu dla keratyny 5, u dorosłych myszy dochodziło do rozwoju cSCC i niektórych raków wrzecionowatokomórkowych.<sup>53</sup> Innym sposobem identyfikacji pierwotnych komórek cSCC była ekspresja konstytutywnie czynnej zmutowanej postaci *KRAS* (G12D) na poziomach fizjologicznych w kilku przedziałach naskórkowych wykorzystujących układ CRE-Lox indukowany tamoksyfenem.<sup>54</sup> Ekspresja zmutowanego *KRAS* w komórkach macierzystych wybrzuszenia pochwłki mieszków włosowych, ale nie w komórkach macierzystych, prowadziła do rozwoju brodawczaków. Chociaż ekspresja *KRAS* G12D sama w sobie nie była wystarczająca do wywołania złośliwej transformacji, połączenie tego onkogeny z utratą p53 w komórkach macierzystych wybrzuszenia pochwłki spowodowało rozwój inwazyjnego SCC; połączenie to nie prowadziło do powstania nowotworu w przejściowych, namnażających się komórkach macierzystych. Dostępne są również dowody na to, że w odpowiedzi na zranienie skóry w regionie wybrzuszenia pochwłki naskórka komórki pochodzące ze szpiku kostnego mogą osiedlać się i różnicować się w kierunku komórek macierzystych keratynocytów.<sup>55</sup> Komórki pochodzące ze szpiku kostnego cechują się zdolnością transformacji złośliwej przy utrzymującej się stymulacji (np. przewlekłym stanie zapalnym) w ich nowym środowisku.<sup>50,56,57</sup> Biorąc pod uwagę różnice w komórkach macierzystych naskórka i determinantach nowotworzenia między myszami a ludźmi,



dalsze badania na temat znaczenia namnażających się komórek nowotworu są uzasadnione.

#### CECHY PATOFIZJOLOGICZNE CSCC

Protoonkogeny z rodziny Ras przekazują sygnały dotyczące wzrostu komórki i proliferacji przez związane z błoną kinazy tyrozynowe receptorów (receptor tyrosine kinase, RTK). Ras może ulegać aktywacji przez amplifikację genów, mutacje aktywujące lub nadekspresję RTK. Nieprawidłowa aktywacja Ras sprzyja kilku kluczowym cechom guza, takim jak mitogeneza, oporność na apoptozę, oporność na leki oraz angiogeneza.<sup>45</sup>

Wykazano doświadczalnie, że aktywacja samej onkogennej Ras jest niewystarczająca do indukcji SCC w ludzkich keratynocytach.<sup>58</sup> Istotne jest natomiast połączenie nadekspresji Ras z pobudzeniem mediatora CDK4 progresji cyklu komórkowego lub zmianą aktywności NF- $\kappa$ B, mającą na celu ominięcie fazy spoczynku G1 pośredniczonej przez Ras i wywołanie nowotworzenia w naskórku.<sup>14</sup> NF- $\kappa$ B jest istotne dla zahamowania wzrostu keratynocytów, blokada tego szlaku wywołuje cSCC w doświadczalnych modelach mysich.<sup>59,60</sup> Hiperproliferyacja naskórka wtórna do blokady NF- $\kappa$ B wiązała się z wyższymi poziomami białka CDK4, co powodowało powiązanie kontroli fazy G1/S cyklu komórkowego z regulującymi wzrost funkcjami NF- $\kappa$ B.<sup>59</sup> Wywołane eksperymentalnie guzy przypominały ludzkie cSCC, wykazując obniżenie E-kadheryny i indukcję angiogennych i inwazyjnych czynników komórkowych.<sup>14,15,45</sup>

W jednym z ostatnich badań z wykorzystaniem linii komórkowej ludzkich keratynocytów (HaCaT) wykazano, że kinaza Fyn jest efektem onkogennej Ras.<sup>61</sup> W tych badaniach onkogen Hras powodował silną indukcję mRNA Fyn, ale niezwiązanych kinaz Src lub Yes.<sup>61</sup> Fyn była potrzebna do inwazji komórek i ich ruchliwości, jak również do aktywacji ogniskowej kinazy adhezyjnej indukowanej Hras.<sup>61</sup> Hras powoduje zwiększenie mRNA Fyn przez mechanizm zależny od Akt, a ponieważ Fyn pobudza szlak PI3K/Akt, może wzmacniać ekspresję przez mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego.<sup>29</sup> Dane te sugerują obecność ciekawego związku biologicznego między Ras i Fyn w nowotworach skóry, który powinien być dalej zbadany i który mógłby być wykorzystany przez stosowanie miejscowe drobnocząteczkowych inhibitorów kinazy (SMKI) wykorzystywanych w leczeniu nowotworów układowych i mających właściwości fizyczne konieczne do penetracji przez skórę. Celem idealnego SMKI jest Fyn, związane kinazy tyrozynowe oraz kinazy szlaku Ras.

Zahamowanie tych sygnałów mogłoby działać chemopreventywnie na AK i cSCC. Jednym z potencjalnych kandydatów jest dazatynib, którego masa cząsteczkowa jest mniejsza niż 500 daltonów, a jego celem są liczne kinazy tyrozynowe, w tym Fyn.<sup>62</sup>

Wykazano, że kinazy tyrozynowe z rodziny SFK, w tym Fyn, będące regulatorami proliferacji komórek, inwazji i tworzenia przerzutów, odgrywają rolę w patogenezie cSCC.<sup>29,61,63-65</sup> Cząsteczka Scram (Src-activating and signalling molecule) jest substratem i negatywnym regulatorem SFK.<sup>66,67</sup> Scram zmniejsza proliferację keratynocytów, promuje różnicowanie i negatywnie reguluje sygnalizację EGFR i SFK w pierwotnych keratynocytach człowieka.<sup>68,69</sup> W badaniach immunohistochemicznych wykazano, że stężenie Scram w ludzkich AK i cSCC jest zmniejszone w porównaniu z przylegającym niezmiennym naskórkiem.<sup>44,68</sup> Zdolność Fyn do wywoływania nowotworzenia skóry potwierdzono w mysim modelu K14-Fyn Y528F (opisanym poniżej), w którym dochodzi do przednowotworowych zmian przypominających AK i cSCC między 5-8 tygodniem życia.<sup>29</sup> W analizie tych zmian wykazano aktywację trzech protoonkogennych szlaków przekazywania sygnałów: PDK-1/Akt/mTOR, MEK/ERK i STAT3. Pobudzenie tych szlaków wraz z wywołaniem przez Fyn zmniejszeniem p53 i Notch1 jest silnym onkogennym sygnałem mogącym spowodować samoistny rozwój guza nawet na podłożu C57BL/6 opornym na rozwój nowotworów.<sup>29</sup> Zwiększające się stężenie Scram wraz z transgenem K14-Scram całkowicie hamuje nowotworzenie skóry wywołane Fyn. Znaczenie tych przeprowadzonych na myszach obserwacji *in vivo* potwierdzono przez odkrycie, że u człowieka cSCC cechuje się zwiększonym stężeniem Fyn i aktywnością SFK wraz ze zmniejszoną aktywnością Scram w porównaniu z przyległą niezmienną skórą.<sup>29</sup> Dane te potwierdzają hipotezę, że Scram działa jako supresor guza w ludzkim cSCC i że hamowanie SFK lub wzmacnianie działania Scram może być potencjalną strategią terapeutyczną w nowotworach skóry.

W ostatnich badaniach wykazano, że mRNA PKC- $\delta$  jest znacząco zmniejszone w ludzkich cSCC w porównaniu z naskórkiem, co sugeruje, że zmniejszone stężenie PKC- $\delta$  jest istotne w nowotworzeniu indukowanym UVB.<sup>70</sup> Fyn powoduje fosforylację PKC- $\delta$ , a PKC- $\delta$  z kolei jest ważnym regulatorem apoptozy wywołanej UVB; istotne będzie określenie, jak Fyn i Scram regulują fosforylację PKC- $\delta$  i poziom białka/mRNA oraz jak to koreluje z apoptozą indukowaną UVB.<sup>71,72</sup>

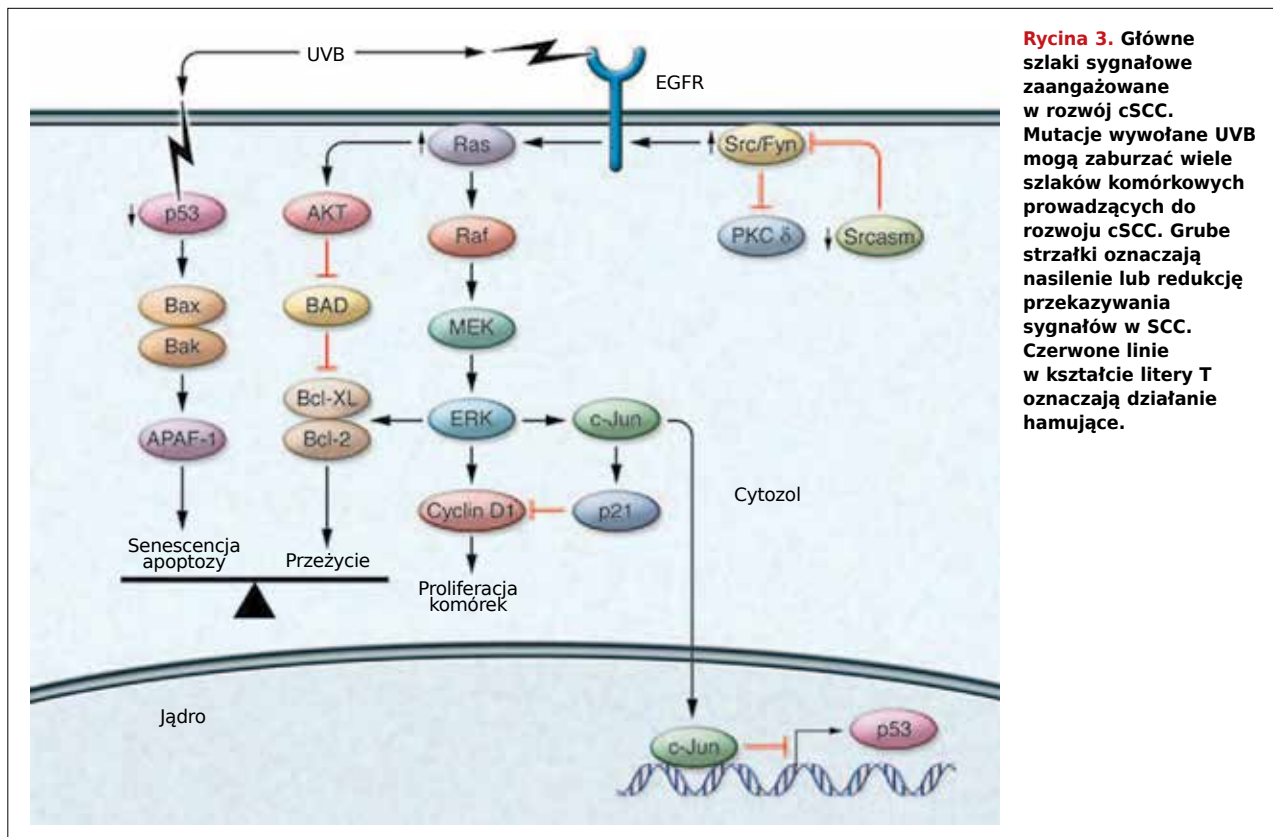
Szlak przekazywania sygnałów Notch jest zaangażowany zarówno w rozwój prawidłowego naskórka, jak i w patogenezę cSCC.<sup>73</sup> Szlak Notch reguluje wiele ważnych procesów komórkowych, włączając utrzymanie komórek macierzystych, decyzje o losie komórek, różnicowaniu, proliferacji i apoptozie.<sup>74</sup> U saków występują cztery białka Notch; Notch 1 ulega ekspresji we wszystkich warstwach ludzkiego naskórka, podczas gdy Notch 2 ulega ekspresji w warstwie podstawnej naskórka.<sup>73</sup> Szlak przekazywania sygnałów Notch promuje różnicowanie keratynocytów na drodze kilku mechanizmów, w tym indukcję inhibitora cyklu komórkowego p21, wykazano, że zmniejsza proliferację i zwiększa różnicowanie keratynocytów zarodka przez aktywację kaspazy 3 i PKC- $\delta$ .<sup>75</sup> W kilku chirurgicznie usuniętych ludzkich cSCC ekspresja Notch 1 była niższa w porównaniu z grupą kontrolną bez zmian skórnych.<sup>76</sup> Notch 1 jest bezpośrednim celem transkrypcyjnym p53 w ludzkich keratynocytach<sup>76</sup> i biorąc pod uwagę częstość mutacji p53 na wczesnych etapach patogenezы AK i cSCC, spadek ekspresji Notch 1 może być skutkiem modyfikacji białka p53 w zmianach skórnych. Stężenie Notch 1 spada pod wpływem EGFR i Fyn na drodze zahamowania transkrypcji p53 w mechanizmie, który angażuje również c-Jun.<sup>28,29</sup> Z tego względu skutkami onkogennej aktywacji EGFR i Fyn są zmniejszenie ekspresji p53 i Notch 1. Wykazano, że wykorzystany jako supresor keratynocytów Notch 1 hamuje szlaki sygnałowe Wnt i Sonic hedgehog (Shh) odpowiedzialne za powstawanie nowotworu u myszy pozbawionych Notch 1.<sup>74,77</sup> Utrata czynnego szlaku przekazywania sygnałów Notch 1 w pierwotnych ludzkich keratynocytach oraz naskórku myszy prowadzi do nieprawidłowej aktywacji  $\beta$ -kateniny, efektora szlaku sygnałowego Wnt. Natomiast ekspresja dominującej aktywnej postaci Notch 1 w keratynocytach pierwotnych hamuje aktywację za pośrednictwem  $\beta$ -kateniny i zmniejsza stężenie  $\beta$ -kateniny w zmianach typu SCC i BCC w mysich modelach chemicznie wywołanej kancerogenezy.<sup>77</sup> Utrata Notch może hamować mechanizmy naprawcze DNA i szlaki proapoptotyczne, uwrażliwiając komórki na mutageny chemiczne.<sup>77</sup> Rzeczywiście, wstrzyknięcie myszom pierwotnych keratynocytów pozbawionych Notch 1, z ekspresją aktywowanego białka Ras lub keratynocytów wykazujących ekspresję Ras, leczonych inhibitorem szlaku sygnałowego Notch powoduje tworzenie się słabo zróżnicowanych, bardzo inwazyjnych cSCC.<sup>76</sup> Wyniki te wskazują, że pronkogenne mutacje przy braku Notch 1 mogą zwiększać potencjał złośliwości nowotworu.

STAT3 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych modelujących różne geny docelowe zaangażowane w apoptozę, angiogenezę i regulację cyklu komórkowego. Znaczenie STAT3 i nowotworzenia indukowanego UVB oceniano wykorzystując modele myszy transgenicznych i pozbawionych genu, z konstytutywnie aktywnym STAT3 ulegającym ekspresji w skórze (K5-Stat3C) lub bez ekspresji STAT3 w skórze.<sup>78</sup> Po ekspozycji na UVB, myszy K5-Stat3C rozwijały cSCC z większą częstością i mnogością w porównaniu z myszami z grupy kontrolnej.<sup>78</sup> Brak STAT3 w naskórku chronił myszy przed nowotworzeniem indukowanym przez UVB. Naskórek myszy K5-STAT3 charakteryzował się zwiększoną ekspresją mediatora antyapoptotycznego Bcl-xl, a w konsekwencji keratynocyty w tym modelu były odporne na apoptozę indukowaną przez UVB.<sup>47</sup> Diagram kluczowych zdarzeń sygnałowych promujących tworzenie cSCC przedstawiono na rycinie 3.

## Mysie modele SCC

Zrozumienie nowotworów człowieka opiera się na modelach doświadczalnych wykorzystywanych do badania inicjacji i progresji nowotworzenia, a jednocześnie jest przez te modele ograniczane. Myszy transgeniczne i pozbawione wybranych genów (knock-out) okazały się przydatnymi modelami *in vivo* badania nowotworzenia naskórkowego. Ekspresja transgeniczna kinaz ErbB2, Src, Fyn i MEK-1 napędzana promotorami keratyny w naskórku może samoistnie spowodować raka skóry, prowadząc do rozwoju cSCC.<sup>29,64,65,79</sup> U myszy transgenicznych K14-Fyn Y528F wykazujących ekspresję pobudzonej postaci Fyn w naskórku rozwijają płaskie zmiany przednowotworowe przypominające AK u człowieka, a nie brodawczaki, które są obserwowane w klasycznym dwustopniowym modelu kancerogenezy chemicznej, ale nie w skórnych nowotworach człowieka indukowanych UVB.<sup>29</sup> Badania te wskazują na to, że pobudzenie szlaku EGFR/Fyn/Src/Erk jest kluczowe dla tworzenia cSCC. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że myszy transgeniczne K14-ER:Ras z indukowanym tamoksyfenem Hras G12V wykazują hiperplazję naskórkową zależną od Ras z upośledzonym różnicowaniem przypominającym SCCIS.<sup>80</sup> Inne linie myszy transgenicznych o zwiększonej aktywności STAT3 również wykazują samoistną i indukowaną UVB neoplazję skóry prowadzącą do vSCC.<sup>78</sup>

Chociaż myszy transgeniczne są dobrym modelem *in vivo* do badania tworzenia się cSCC, różnice w budowie



**Rycina 3.** Główne szlaki sygnałowe zaangażowane w rozwój cSCC. Mutacje wywołane UVB mogą zaburzać wiele szlaków komórkowych prowadzących do rozwoju cSCC. Grube strzałki oznaczają nasilenie lub redukcję przekazywania sygnałów w SCC. Czerwone linie w kształcie litery T oznaczają działanie hamujące.

skóry między myszami a ludźmi ograniczają bezpośrednią korelację modeli mysich z chorobą człowieka (ryc. 4). Ponadto, istnieją różnice w przekazywaniu sygnałów w komórce i profilach czynnościowych onkogenów i genów supresorowych guza między myszami a ludźmi. Na przykład część transformacji Ras przebiega za pośrednictwem aktywacji Ral w komórkach ludzkich, podczas gdy u myszy odbywa się to za pośrednictwem Raf.<sup>81</sup> Dlatego korelacja obserwacji doświadczalnych z modelami mysich z tkankami ludzkimi jest kluczowa do wykazania znaczenia u ludzi.

### Niekodujące RNA w SCC

Oprócz mutacji w klasycznych genach kodujących białka rozwój i progresja SCC pozostaje prawdopodobnie pod wpływem zmian w swoistych niekodujących transkryptach RNA, włączając krótkie, o zbliżonej strukturze, około 22-nukleotydowe miRNA i długie (200-nt do 100 kb) o strukturze zróżnicowanej lncRNA. Ponieważ ten aspekt jest badany od niedawna, brakuje mechanistycznych szczegółów na temat roli tych czą-

steków w nowotworach skóry. Biorąc pod uwagę ich wzrastające znaczenie jako czynników regulujących zarówno główne szlaki związane z nowotworami, takie jak p53 w tkankach, jak i związane z utrzymywaniem się komórek macierzystych w naskórku,<sup>83</sup> jest prawdopodobne, że będą one odgrywać podobną rolę w cSCC.

Zgodnie z prawdopodobnym znaczeniem miRNA w rozwoju cSCC guzy SCC są związane ze zwiększoną aktywnością Drosha, kluczowego elementu potrzebnego do dojrzewania miRNA.<sup>84</sup> Ponadto profil miRNA w naskórku jest w SCC zmieniony, zarówno nowotwór, jak i keratynocyty ekspozowane na UVA wykazują podwyższone stężenie miR21.<sup>85</sup> Mocne dowody przemawiają za znaczeniem miR21 jako onkomiru, który hamuje geny supresorowe guza w nowotworach nabłonkowych.<sup>86,87</sup> W guzach SCC również stwierdza się mniejsze stężenie miR203,<sup>85</sup> antagonisty czynnika transkrypcyjnego p63 niezbędnego do proliferacji i utrzymania naskórkowych komórek macierzystych i podwyższonych w SCC.

Mdm2 jest ujemnym regulatorem p53, a allel *Mdm2* SNO309 G jest związany z nieznacznie zwiększonym

Model	Hodowla skóry 2D	Organotypowa hodowla skóry	Ksenograft <i>in vivo</i>	Transgeniczne modele mysie	Eksplanty hodowli ludzkiej skóry
					
Zalety	Łatwość zastosowania i manipulacji genetycznych	Bezpośrednie manipulacje genetyczne za pomocą lentiwirusów Dokładna architektoniczna matryca i zręb 3D Replikacja komórka-ecm interakcja i inwazja	Jedyna metoda badania tkanki ludzkiej <i>in vivo</i> w 3D opracowana metodami inżynierii genetycznej Pozostałe zalety takie same jak w hodowli organotypowej	Bezpośrednia inżynieria genetyczna Możliwość analizy wielu genów	Pełna skóra ludzka
Wady	Brak cech tkanki 3D Bez immunoregulacji Bez krążenia Podatne na drift związany z selekcją	Bez immunoregulacji Bez krążenia, ograniczona dyfuzja	Bez regulacji immunologicznej Biologia myszy	Skóra myszy różni się od skóry człowieka	Musi być wykorzystana w krótkim czasie Trudne jednakowe manipulacje genetyczne

**Rycina 4. Analiza porównawcza modeli stosowanych w badaniu cSCC. Wady i zalety powszechnie stosowanych modeli.**

ryzykiem rozwoju cSCC.<sup>88</sup> Odpowiedź na zniszczenie DNA włącza indukcję lncRNA, takich jak ncRNA związane z p21 aktywowane uszkodzeniem DNA (p21 associated ncRNA DNA-damage, PANDA), które reguluje zależną od p53 transkrypcję genów proapoptotycznych, takich jak FAS.<sup>89</sup> Do tej pory nie jest jednak jasne, czy PANDA lub inne lncRNA biorą udział w odpowiedzi na uszkodzenie DNA pod wpływem UVB pośredniczone przez p53. Obecnie brakuje wyników badań wiążących lub ustalających znaczenie lncRNA dla rozwoju cSCC, chociaż ostatnie dowody wskazują, że co najmniej jeden transkrypt, którego ekspresja związana jest z gorszym rokowaniem (HOTAIR), zwiększa inwazyjność komórek raka piersi.<sup>90</sup> Ponieważ ponad 90% genomu ulega transkrypcji, z czego większość stanowią sekwencje niekodujące, przyszłe badania analizujące transkrypty mogą wykryć swoiste lncRNA związane z SCC, z pewnymi swoistymi sekwencjami lub motywami strukturalnymi odgrywającymi istotną rolę w powstawaniu nowotworu.

## SCC wywołane lekami

Jest wiele sytuacji klinicznych, w których zwiększone tworzenie cSCC wiąże się z chorobami i stosowaniem leków. Zrozumienie działań biologicznych tych

leków na skórę daje nowy wgląd w biologię ludzkiego SCC *in vivo*.

### PACJENCI PO PRZESZCZEPIENIU NARZĄDÓW

Populacją szczególnie wysokiego ryzyka rozwoju cSCC są pacjenci po przeszczepieniu narządów. Leczenie immunosupresyjne jest kluczowe w zapobieganiu odrzucania przeszczepu, ale może predysponować do wielu działań niepożądanych, włączając zakażenia skóry, nowotwory i nie tylko.<sup>91</sup> cSCC jest najczęstszym nowotworem u pacjentów po przeszczepieniu narządów, a jego ryzyko wzrasta 60-100-krotnie w tej populacji chorych w porównaniu z osobami bez upośledzonej odporności.<sup>92,93</sup> Dwoma podstawowymi lekami stosowanymi w immunosupresji w tej grupie chorych są azatiopryna, inhibitor syntezy puryn oraz cyklosporyna, inhibitor kalcyneuryny. Wykazano, że azatiopryna zwiększa wrażliwość na UVA.<sup>94</sup> W odróżnieniu od UVB energia wysyłana przez światło UVA zwykle nie jest wystarczająca do spowodowania bezpośredniego uszkodzenia DNA.<sup>93</sup> Promieniowanie UVA może jednak bezpośrednio uszkadzać DNA przez stres oksydacyjny, wykazano, że azatiopryna nasila powstawanie reaktywnych form tlenu spowodowanych uszkodzeniem DNA.<sup>94</sup> Cyklosporyna i inne inhibitory kalcyneuryny niezależnie od swojego działania na układ



immunologiczny gospodarza promują tworzenie się nowotworu.<sup>93,95,96</sup> Cyklosporyna powoduje pobudzenie wzrostu guza u myszy ze SCID, u których nie występuje odpowiedź immunologiczna typu komórkowego.<sup>96</sup> Dodatkowo, w przeprowadzonym niedawno badaniu wykazano, że cyklosporyna może wpływać na tworzenie się SCC u osób po przeszczepach narządów, przez przeciwdziałanie starzeniu się komórek, zależnemu od p53.<sup>95</sup> Poza immunosupresją farmakologiczną również inne elementy wpływające rozwój guza, takie jak uszkodzenie DNA indukowane UV, wirusy brodawczka ludzkiego czy interakcje guz-zrąb, okazały się brać udział w rozwoju zmian u biorców przeszczepów.<sup>92,93</sup>

Worykonazol jest triazolem drugiej generacji, lekiem przeciwgrzybiczym szeroko stosowanym w leczeniu aspergillozy inwazyjnej i kandydozy, szczególnie u osób z upośledzeniem odporności. Od czasu dopuszczenia leku przez FDA w 2002 roku, przewlekła terapia worykonazolem wiązała się ze zwiększonym ryzykiem inwazyjnego cSCC u pacjentów z immunosupresją, włączając biorców narządów wewnętrznych lub szpiku, pacjentów z zakażeniem HIV lub przewlekłą chorobą ziarniniakową.<sup>97</sup> Ostatnio przeprowadzone badanie kliniczno-kontrolne wykazało, że worykonazol jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju cSCC u osób po przeszczepie płuca.<sup>98</sup> Mechanizm kancerogenezy indukowanej worykonazolem nie jest znany, ale ekspozycja na UV ma najprawdopodobniej znaczenie, szczególnie biorąc pod uwagę, że u pacjentów stwierdza się powodowaną lekiem nadwrażliwość na światło.<sup>97</sup> Worykonazol nie pochłania światła w zakresie UV, ale jego pierwotny metabolit N-tlenek worykonazolu może absorbować promieniowanie UVA i UVB. Lek jest metabolizowany do formy N-tlenku przez enzymy cytochromu p450 umiejscowione w wątrobie i nabłonku jelita. Keratynocyty również wykazują ekspresję wielu enzymów cytochromu p450, co zwiększa prawdopodobieństwo bezpośredniej oksydacji worykonazolu mediowanej keratynocytami.<sup>99</sup> Szlaki przekazywania sygnałów pobudzane przez worykonazol i jego metabolit są obecnie przedmiotem badań. U osób przewlekle stosujących worykonazol zalecane jest regularne badanie skóry oraz stosowanie filtrów przeciwsłonecznych.

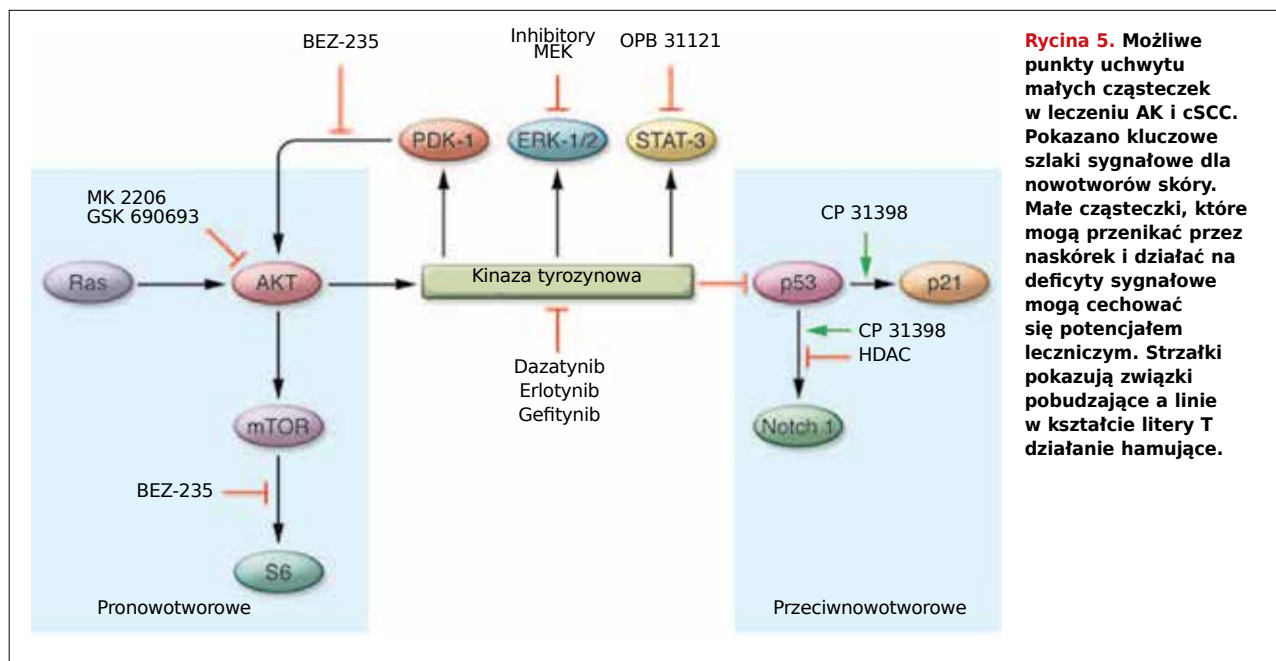
#### **METODY I MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNE**

Obecne metody leczenia AK to leczenie miejscowe lub zniszczenie zmiany. Najczęściej stosowanymi lekami miejscowymi do leczenia AK są fluorouracyl, imikwimod i diklofenak. Fluorouracyl jest chemioterapeu-

tykiem hamującym syntezę zarówno RNA, jak i DNA, którego celem są komórki dzielące się – odsetek tych komórek w AK jest większy w porównaniu z przylegającym naskórkiem.<sup>100,101</sup> Fluorouracyl powoduje istotne działania niepożądane, do których należy nasilony stan zapalny, owrzodzenia, a nawet bliznowacenie. Jego stosowanie wiąże się z wyraźnie gorszą jakością życia pacjentów,<sup>102</sup> dlatego ma wiele wad jako lek miejscowy pierwszego rzutu.

Imikwimod, agonista TLR7, działa przez mechanizm immunologiczny wywołujący stan zapalny prowadzący do eliminacji AK. Stan zapalny przypomina w swoim nasileniu i na poziomie molekularnym łuszczycę i jest związany z wywoływaniem reakcji autoimmunologicznych, takich jak łysienie plackowate i bielactwo.<sup>103</sup> Innym lekiem miejscowym często stosowanym w leczeniu AK jest diklofenak, miejscowy niesteroidowy lek przeciwzapalny o niejasnym mechanizmie działania na AK. W ostatnio przeprowadzonych badaniach dotyczących diklofenaku i imikwimodu stwierdzono słabe działanie terapeutyczne z niskimi wskaźnikami ustępowania zmian i istotnym podrażnieniem.<sup>104</sup> Najczęściej stosowane w AK leki miejscowe cechują się istotnymi wadami, włączając podrażnienie, obniżoną jakość życia oraz ograniczoną skuteczność. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalne korzyści opracowania leczenia miejscowego ukierunkowanego na patofizjologię AK bez wywoływania podrażnienia skóry.

Ostatnie innowacje były związane ze stosowaniem małych cząsteczek korygujących deficyty sygnałowe w nowotworach. Podawanie ogólne małych cząsteczek wzmagających działanie p53, takich jak CP-31398, może hamować indukowaną UVB kancerogenezę u myszy (ryc. 5).<sup>105</sup> Imatynib (Gleevec) i związki pokrewne okazały się przydatne w leczeniu nowotworów związanych ze zwiększoną aktywnością kinazy tyrozynowej, w tym przewlekłej białaczki szpikowej i guzów podścieliska przewodu pokarmowego z mutacją c-kit (ryc. 5).<sup>106-109</sup> Jak wspomniano wcześniej, ogólne stosowanie małych cząsteczek ukierunkowanych na kinazy napędzające nowotwór lub aktywujące antyngogenne szlaki przekazywania sygnałów może być wykorzystane w terapii AK i cSCC; Pierwszym krokiem jest identyfikacja przenikających przez skórę małych cząsteczek, których celem byłyby szlaki istotne dla tworzenia się zmian. Dobrymi narzędziami przesiewowymi w identyfikacji potencjalnych leków miejscowych w leczeniu AK i cSCC są omówione w tym artykule mysie modele raka skóry i przeszczep ksenogeniczny ludzkiej skóry opracowanej metodami inżynierii genetycznej.



**Rycina 5. Możliwe punkty uchwytu małych cząsteczek w leczeniu AK i cSCC. Pokazano kluczowe szlaki sygnałowe dla nowotworów skóry. Małe cząsteczki, które mogą przenikać przez naskórek i działać na deficyty sygnałowe mogą cechować się potencjałem leczniczym. Strzałki pokazują związki pobudzające a linie w kształcie litery T działanie hamujące.**

## Podsumowanie

Różne techniki doświadczalne wyjaśniły liczne cechy patofizjologiczne nowotworów skóry człowieka. Lepsze zrozumienie szlaków molekularnych zaangażowanych w te nowotwory może otworzyć nowe opcje terapeutyczne dla tych częstych zmian.

## Informacje o finansowaniu

Opracowanie było wspierane przez NIH (National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases Grant AR051380 dla J.T. Seykora i grant P30-AR057257) i Department of Dermatology University of Pennsylvania.

© 2012 American Society for Clinical Investigation. All rights reserved. Reprinted from Journal of Clinical Investigation 2012 Feb 1;122(2):464-72 Vladimir Ratushny, Michael D. Gober, Ryan Hick, Todd W. Ridky, John T. Seykora From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma with permission of American Society for Clinical Investigation.

## Piśmiennictwo

- Rogers HW, et al. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Arch Dermatol.* 2010;146(3):283-287.
- Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(1 pt 2):4-7.
- Marks R. An overview of skin cancers. Incidence and causation. *Cancer.* 1995;75(2 suppl):607-612.
- Wolff KG, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* 7th ed. New York, New York, USA: McGraw-Hill; 2007.
- Thompson SC, Jolley D, Marks R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl J Med.* 1993;329(16):1147-1151.
- Mittelbronn MA, Mullins DL, Ramos-Caro FA, Flowers FP. Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol.* 1998;37(9):677-681.
- Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(1 pt 2):23-24.
- Marks R, Rennie G, Selwood TS. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet.* 1988;1(8589):795-797.
- Criscione VD, Weinstock MA, Naylor MF, Luque C, Eide MJ, Bingham SF. Actinic keratoses: Natural history and risk of malignant transformation in the Veterans Affairs Topical Tretinoin Chemoprevention Trial. *Cancer.* 2009;115(11):2523-2530.
- Stockfleth E. Actinic keratoses. *Cancer Treat Res.* 2009;146:227-239.
- Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(1 pt 2):11-17.
- Aho M, Vesterinen E, Meyer B, Purola E, Paavonen J. Natural history of vaginal intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 1991;68(1):195-197.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-767.
- Dajee M, et al. NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature.* 2003;421(6923):639-643.
- Lazarov M, et al. CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nat Med.* 2002;8(10):1105-1114.
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001; 411(6835):366-374.
- Brash DE, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(22):10124-10128.
- Jiang W, Ananthaswamy HN, Muller HK, Kripke ML. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene.* 1999;18(29):4247-4253.
- Kubo Y, et al. p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. *J Invest Dermatol.* 1994;102(4):440-444.
- Ziegler A, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994;372(6508):773-776.

21. Nelson MA, et al. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett.* 1994;85(1):23–29.
22. Ortonne JP. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2002;146(suppl 61):20–23.
23. Nakazawa H, et al. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(1):360–364.
24. Campbell C, Quinn AG, Ro YS, Angus B, Rees JL. p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *J Invest Dermatol.* 1993;100(6):746–748.
25. Baker SJ, et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1990; 50(23):7717–7722.
26. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest.* 1993;91(4):1753–1760.
27. Uchida T, et al. p53 mutations and prognosis in bladder tumors. *J Urol.* 1995;153(4):1097–1104.
28. Kolev V, et al. EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):902–911.
29. Zhao L, et al. Srcasm inhibits Fyn-induced cutaneous carcinogenesis with modulation of Notch1 and p53. *Cancer Res.* 2009;69(24):9439–9447.
30. Kim MS, et al. Increased expression of activating transcription factor 3 is related to the biologic behavior of cutaneous squamous cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2011;42(7):954–959.
31. Lentini M, Schepis C, Cuppari DA, Batolo D. Tenascin expression in actinic keratosis. *J Cutan Pathol.* 2006;33(11):716–720.
32. Toll A, et al. MYC gene numerical aberrations in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2009;161(5):1112–1118.
33. Toll A, et al. Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Exp Dermatol.* 2010;19(2):151–153.
34. Sekulic A, et al. Loss of inositol polyphosphate 5- phosphatase is an early event in development of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3(10):1277–1283.
35. Einspahr JG, et al. Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis. *Neoplasia.* 1999;1(5):468–475.
36. Rehman I, Takata M, Wu YY, Rees JL. Genetic change in actinic keratoses. *Oncogene.* 1996; 12(12):2483–2490.
37. Purdie KJ, et al. Allelic imbalances and microdeletions affecting the PTPRD gene in cutaneous squamous cell carcinomas detected using single nucleotide polymorphism microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(7):661–669.
38. Mortier L, et al. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16(INK4a) tumor suppressor. *Cancer Lett.* 2002;176(2):205–214.
39. Pacifico A, Goldberg LH, Peris K, Chimenti S, Leone G, Ananthaswamy HN. Loss of CDKN2A and p14ARF expression occurs frequently in human nonmelanoma skin cancers. *Br J Dermatol.* 2008;158(2):291–297.
40. Burnworth B, et al. The multi-step process of human skin carcinogenesis: a role for p53, cyclin D1, hTERT, p16, and TSP-1. *Eur J Cell Biol.* 2007; 86(11–12):763–780.
41. Nindl I, et al. Low prevalence of p53, p16(INK4a) and Ha-ras tumour-specific mutations in lowgraded actinic keratosis. *Br J Dermatol.* 2007; 156(suppl 3):34–39.
42. Pierceall WE, Goldberg LH, Tainsky MA, Mukhopadhyay T, Ananthaswamy HN. Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol Carcinog.* 1991;4(3):196–202.
43. Spencer JM, Kahn SM, Jiang W, DeLeo VA, Weinstein IB. Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas. *Arch Dermatol.* 1995;131(7):796–800.
44. Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis.* 2005;26(10):1657–1667.
45. Khavari PA. Modelling cancer in human skin tissue. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):270–280.
46. Bamford S DE, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website; <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>. *Br J Cancer.* 2004;91(2):355–358.
47. Marinkovich MP. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(5):370–380.
48. Martins VL, et al. Increased invasive behaviour in cutaneous squamous cell carcinoma with loss of basement-membrane type VII collagen. *J Cell Sci.* 2009;122(pt 11):1788–1799.
49. Reuter JA, et al. Modeling inducible human tissue neoplasia identifies an extracellular matrix interaction network involved in cancer progression. *Cancer Cell.* 2009;15(6):477–488.
50. Kamstrup MR, Gniadecki R, Skovgaard GL. Putative cancer stem cells in cutaneous malignancies. *Exp Dermatol.* 2007;16(4):297–301.
51. Morris RJ, Coulter K, Tryson K, Steinberg SR. Evidence that cutaneous carcinogen-initiated epithelial cells from mice are quiescent rather than actively cycling. *Cancer Res.* 1997;57(16):3436–3443.
52. Bailleul B, et al. Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell.* 1990;62(4):697–708.
53. Brown K, Strathdee D, Bryson S, Lambie W, Balmain A. The malignant capacity of skin tumours induced by expression of a mutant H-ras transgene depends on the cell type targeted. *Curr Biol.* 1998; 8(9):516–524.
54. Lapouge G, et al. Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(18):7431–7436.
55. Brittan M, et al. Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion. *J Pathol.* 2005;205(1):1–13.
56. Li HC, Stoicov C, Rogers AB, Houghton J. Stem cells and cancer: evidence for bone marrow stem cells in epithelial cancers. *World J Gastroenterol.* 2006;12(3):363–371.
57. Jin H, et al. A homing mechanism for bone marrow- derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest.* 2006;116(3):652–662.
58. Ridky TW, Chow JM, Wong DJ, Khavari PA. Invasive three-dimensional organotypic neoplasia from multiple normal human epithelia. *Nat Med.* 2010;16(12):1450–1455.
59. Zhang JY, Tao S, Kimmel R, Khavari PA. CDK4 regulation by TNFR1 and JNK is required for NFKappaB- mediated epidermal growth control. *J Cell Biol.* 2005;168(4):561–566.
60. van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, Toftgard R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/ nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res.* 1999; 59(14):3299–3303.
61. Yadav V, Denning MF. Fyn is induced by Ras/PI3K/ Akt signaling and is required for enhanced invasion/ migration. *Mol Carcinog.* 2011;50(5):346–352.
62. Muller B. Imatinib and its successors—how modern chemistry has changed drug development. *Curr Pharm Des.* 2009;15(2):120–133.
63. Ayli EE, Li W, Brown TT, Witkiewicz A, Elenitsas R, Seykora JT. Activation of Src-family tyrosine kinases in hyperproliferative epidermal disorders. *J Cutan Pathol.* 2008;35(3):273–277.
64. Matsumoto T, et al. Overexpression of a constitutively active form of c-src in skin epidermis increases sensitivity to tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate. *Mol Carcinog.* 2002; 33(3):146–155.
65. Matsumoto T, et al. Targeted expression of c-Src in epidermal basal cells leads to enhanced skin tumor promotion, malignant progression, and metastasis. *Cancer Res.* 2003;63(16):4819–4828.

66. Li W, Marshall C, Mei L, Gelfand J, Seykora JT. Srcasm corrects Fyn-induced epidermal hyperplasia by kinase down-regulation. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1161–1169.
67. Seykora JT, Mei L, Dotto GP, Stein PL. 'Srcasm: a novel Src activating and signaling molecule. *J Biol Chem.* 2002;277(4):2812–2822.
68. Li W, et al. Srcasm modulates EGF and Src-kinase signaling in keratinocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280(7):6036–6046.
69. Li W, Marshall C, Mei L, Gelfand J, Seykora JT. Srcasm corrects fyn-induced epidermal hyperplasia by kinase down-regulation. *J Biol Chem.* 2007; 282(2):1161–1169.
70. Yadav V, Yanez NC, Fenton SC, Denning MF. Loss of protein kinase C delta gene expression in human squamous cell carcinomas: a laser capture microdissection study. *Am J Pathol.* 2010;176(3):1091–1096.
71. Denning MF, Wang Y, Nickoloff BJ, Wronce-Smith T. Protein kinase C delta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(45):29995–30002.
72. Joseloff E, et al. Src family kinases phosphorylate protein kinase C delta on tyrosine residues and modify the neoplastic phenotype of skin keratinocytes. *J Biol Chem.* 2002;277(14):12318–12323.
73. Dotto GP. Notch tumor suppressor function. *Oncogene.* 2008;27(38):5115–5123.
74. Okuyama R, Tagami H, Aiba S. Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J Dermatol Sci.* 2008; 49(3):187–194.
75. Okuyama R, et al. High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell.* 2004;6(4):551–562.
76. Lefort K, et al. Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases. *Genes Dev.* 2007;21(5):562–577.
77. Nicolas M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet.* 2003;33(3):416–421.
78. Kim DJ, Angel JM, Sano S, DiGiovanni J. Constitutive activation and targeted disruption of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in mouse epidermis reveal its critical role in UVB-induced skin carcinogenesis. *Oncogene.* 2009; 28(7):950–960.
79. Scholl FA, Dumesic PA, Khavari PA. Mek1 alters epidermal growth and differentiation. *Cancer Res.* 2004;64(17):6035–6040.
80. Tarutani M, Cai T, Dajee M, Khavari PA. Inducible activation of Ras and Raf in adult epidermis. *Cancer Res.* 2003;63(2):319–323.
81. Hamad NM, et al. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev.* 2002;16(16):2045–2057.
82. Huarte M, et al. A large intergenic noncoding rna induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell.* 2010;142(3):409–419.
83. Zhang L, Stokes N, Polak L, Fuchs E. Specific microRNAs are preferentially expressed by skin stem cells to balance self-renewal and early lineage commitment. *Cell Stem Cell.* 2011;8(3):294–308.
84. Sand M, et al. Expression levels of the microRNA processing enzymes drosha and dicer in epithelial skin cancer. *Cancer Invest.* 2010;28(6):649–653.
85. Dziunycz P, et al. Squamous cell carcinoma of the skin shows a distinct microRNA profile modulated by UV radiation. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(11):2686–2689.
86. Lou Y, Yang X, Wang F, Cui Z, Huang Y. MicroRNA- 21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through inhibiting the expression of PTEN protein. *Int J Mol Med.* 2010;26(6):819–827.
87. Moriyama T, et al. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(5):1067–1074.
88. Almquist LM, et al. The role of TP53 and MDM2 polymorphisms in TP53 mutagenesis and risk of non-melanoma skin cancer. *Carcinogenesis.* 2011; 32(3):327–330.
89. Hung T, et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet.* 2011;43(7):621–629.
90. Gupta RA, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010;464(7291):1071–1076.
91. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med.* 2003; 348(17):1681–1691.
92. Berg D, Otley CC. Skin cancer in organ transplant recipients: Epidemiology, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47(1):1–17.
93. Hofbauer GF, Bouwes Bavinck JN, Euvrard S. Organ transplantation and skin cancer: basic problems and new perspectives. *Exp Dermatol.* 2010; 19(6):473–482.
94. O'Donovan P, et al. Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science.* 2005;309(5742):1871–1874.
95. Wu X, et al. Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer. *Nature.* 2010; 465(7296):368–372.
96. Hojo M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature.* 1999;397(6719):530–534.
97. Cowen EW, et al. Chronic phototoxicity and aggressive squamous cell carcinoma of the skin in children and adults during treatment with voriconazole. *J Am Acad Dermatol.* 2010;62(1):31–37.
98. Vadnerkar A, et al. Voriconazole exposure and geographic location are independent risk factors for squamous cell carcinoma of the skin among lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29(11):1240–1244.
99. Baron JM, et al. Expression of multiple cytochrome P450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2001;116(4):541–548.
100. Carpenter PM, et al. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(12):1996–2002.
101. Talghini S, Halimi M, Baybordi H. Expression of P27, Ki67 and P53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease. *Pak J Biol Sci.* 2009;12(12):929–933.
102. Weinstock MA, Lee KC, Chren MM, Marcolivio K. Quality of life in the actinic neoplasia syndrome: The VA Topical Tretinoin Chemoprevention (VATTC) Trial. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(2):207–215.
103. van der Fits L, et al. Imiquimod-induced psoriasislike skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol.* 2009;182(9):5836–5845.
104. Kose O, Koc E, Erbil AH, Caliskan E, Kurumlu Z. Comparison of the efficacy and tolerability of 3% diclofenac sodium gel and 5% imiquimod cream in the treatment of actinic keratosis. *J Dermatolog Treat.* 2008;19(3):159–163.
105. Tang X, et al. CP-31398 restores mutant p53 tumor suppressor function and inhibits UVB-induced skin carcinogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3753–3764.
106. Druker BJ, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1038–1042.
107. Druker BJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001; 344(14):1031–1037.
108. Druker BJ, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2(5):561–566.
109. Joensuu H, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med.* 2001; 344(14):1052–1056.



## KOMENTARZ

**Dr hab. n. med.****Mariola Pawlaczyk**Zakład Profilaktyki Chorób  
Skóry Katedry Biologii i Ochrony  
Środowiska Uniwersytetu  
Medycznego im. Karola  
Marcinkowskiego w Poznaniu

Zmieniona nowotworowo komórka ulega niekontrolowanym podziałom i staje się niewrażliwa na sygnały, co powoduje stopniowy rozrost guza w tkance macierzystej i niszczenie otaczających struktur. Proces prowadzący do powstania nowotworu nosi nazwę procesu nowotworzenia albo kancerogenezy. Artykuł opisuje szczegółowo zmiany zachodzące w keratynocycie, doprowadzające do transformacji nowotworowej. Dla pełnego zrozumienia tych skomplikowanych przemian warto przypomnieć najważniejsze jego etapy.

Kancerogeneza to proces długotrwały, wiążący się ze zmianami genetycznymi i epigenetycznymi w komórce, w rezultacie czego zmienia się ekspresja genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego: protoonkogenów, genów supresorowych lub genów mutatorowych. Komórka nowotworowa jest niewrażliwa na sygnały kierujące ją na drogę samobójczej śmierci.

W procesie kancerogenezy wyróżnia się trzy zasadnicze etapy: inicjację, promocję i progresję. Inicjacja to wystąpienie pierwszej nieodwracalnej mutacji. W drugim etapie dochodzi do nagromadzenia zmian genetycznych i epigenetycznych doprowadzających do konwersji komórki zmutowanej w nowotworową, która dalej ulega niekontrolowanym podziałom, co może trwać wiele lat. Podczas progresji nowotwór rozwija się, nabiera zdolności do naciekania tkanek i tworzenia przerzutów. Wyróżnia się także niekiedy etap preinicjacji, określający ekspozycję na czynniki kancerogenne. Najważniejszym kancerogenem związanym z rozwojem raka kolczystokomórkowego skóry jest promieniowanie ultrafioletowe. Ekspozycja na czynnik kancerogeny może jednak trwać przez całe życie i nie prowadzi do powstania nowotworu. Zwiększona podatność niektórych komórek na działanie kancerogenów wiąże się z występowaniem niestabilności genetycznej, która

może ujawniać się jako niestabilność chromosomalna, czyli nagromadzenie aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów. Zmiana długości alleli powstała w wyniku zwiększenia bądź zmniejszenia liczby powtórzeń nukleotydowych określana jest jako niestabilność mikrosatelitarna, której wynikiem jest powstanie krótkich sekwencji tandemowych, równomiernie rozłożonych, o nie do końca poznanej roli. Za pomocą analiz wybranych sekwencji mikrosatelitarnych można oznaczyć utratę heterozygotyczności, określającą utratę dwóch alleli tego samego genu, co może wystąpić na każdym etapie rozwoju nowotworu.

Zmiany w ekspresji genów niezwiązane bezpośrednio z sekwencją DNA określane są jako niestabilność epigenetyczna i w przypadku nowotworów pojęcie to dotyczy genów odpowiedzialnych za procesy różnicowania i proliferacji komórek, regulację cyklu komórkowego, naprawę DNA, aktywność czynników wzrostu i apoptozę.

Kluczową rolę w procesie nowotworzenia odgrywają onkogeny; geny, które ulegając ekspresji powodują przekształcenie się zdrowej komórki w nowotworową. Prawidłowe wersje onkogenów nazywa się protoonkogenami. Ich aktywacja zachodzi przez mutację lub amplifikację, przy czym mutacje protoonkogenów mają charakter dominujący. Onkogeny określane są trzycyfrowymi kodami i wyróżnia się onkogeny związane z czynnikami wzrostu (sis, fms, ras) oraz onkogeny jądrowe, kodujące czynniki transkrypcyjne, regulujące ekspresję innych genów (myc, jun, fos, erbA).

Geny mutatorowe odpowiadają za utrzymanie integralności DNA i biorą udział w procesach naprawczych uszkodzonego materiału genetycznego. Mutacje genów mutatorowych prowadzą do mikrosatelitarnej niestabilności genomu i warunkują zwiększoną predyspozycję do nowotworzenia. W prawidłowych komórkach geny supresorowe transformacji nowotworowej funkcjonują jako ujemne regulatory cyklu komórkowego. Właściwości onkogennych nabierają w wyniku mutacji powodujących utratę ich prawidłowej funkcji.

Właściwości genów supresorowych wykazuje gen p53, który chroni komórkę przed uszkodzeniami prowadzącymi do transformacji nowotworowej. Mutacje genu p53 obserwuje się w około 50% nowotworów człowieka, w tym w raku kolczystokomórkowym skóry.