

MALIGN MELANOMADA p53 TUMÖR SÜPRESÖR GEN VE PROLİFERATING CELL NUCLEAR ANTİGEN EKSPRESYONLARI

Dr. Şükrü O. ÖZDAMAR (*), Bio. Necla ŞİMŞEK (*), Dr. Bedri KANDEMİR (*), Dr. Özgür ÖZYILKAN (**),
Dr. Esin ÖZYILKAN (**), Dr. A. Yaşar TURANLI (***)

ÖZET: p53, hücre çoğalmasında potent bir baskılayıcı olarak hareket eder, delesyon ve/veya mutasyonunun, bugün için insan neoplazmlarında saptanan en sık genetik anormallik olduğu bildirilmektedir. Mutasyona uğramasıyla hücre içi yarı ömrünün uzaması sonucu saptanabilir hale gelir. Geç G1 ve S fazındaki hücre nükleuslarında saptanan proliferating cell nuclear antigen (PCNA) pozitifliğinin gösterilmesi ve dağılım patterni de çeşitli lezyonlarda proliferasyon indeksi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada malign melanomada (MM) p53 ile PCNA ekspresyonları arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla; deride yerleşim gösteren 9 MM (5 kadın ve 4 erkek; ortalama yaş 55 yıl) üzerinde ve kontrol grubu olarak seçilen 7 intradermal nevüsü (IDN) olan (4 kadın ve 3 erkek; ortalama yaş 21 yıl) hastanın lezyonlu doku örneklerinde çalışıldı. % 10 tamponlu nötral formalinde fikse edilmiş doku örnekleri parafin kesitlerinde hücre içi intranükleer p53 (clone: BP53.12) ve PCNA (clone: P10) ekspresyonları immünohistokimyasal yöntemle (streptavidin biotin peroksidaz) araştırıldı. MM'li 7 hastada (6 grade I ve 1 grade II) ve IDN'li 2 hastada (1 grade I ve 1 grade III) p53 ekspresyonu saptandı ($p>0.05$). % 5'in üzerinde PCNA immünreaksiyonu 5 MM'li hastada saptanırken, hiçbir IDN'li hastada saptanmadı ($p=0.02$). Sonuçlarımız melanositik tümörlerde, beklenenin aksine p53 ekspresyonunun önemli bir parametre olmadığını, buna karşın PCNA immünreaksiyonunun daha değerli bir malign proses belirleyicisi olduğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMLER: p53 tümör süpresör gen, proliferating cell nuclear antigen, malignant melanoma

SUMMARY: The p53 gene encodes a nuclear phosphoprotein (normal or "wild type" p53 protein) which acts as a potent suppressor of uncontrolled cell division and is present at very low concentrations. Mutant p53 protein has a greatly extended intracellular half-life and can be detected immunohistochemically. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a nuclear protein required for DNA synthesis and is maximally elevated in late G1 and S phases of the cell cycle. PCNA is used as an indicator of proliferation. In order to compare PCNA immunostaining with p53 protein expression for the assessment of proliferative activity in malignant melanoma, surgically removed 9 malignant melanoma of the skin and 7 intradermal nevi as controls, had been fixed in formalin and processed through paraffin tissue samples, were examined. Nuclear p53 immunoreactivity (clone: BP 53-12) and PCNA immunoreactivity (clone:p10) were examined using streptavidin biotin peroxidase method. Nuclear p53 staining was observed in 7 malignant melanoma (6 grade I, 1 grade II) and in 2 intradermal nevi (1 grade I and 1 grade III) ($p>0.05$). More than %5 PCNA positive cells was designated PCNA (+) and PCNA immunoreactivity was observed in 5 malignant melanoma and in none of intradermal nevi ($p=0.02$). Our data shows that PCNA is a more useful marker for proliferation and tumour progression in melanocytic skin tumours than p53 protein.

KEY WORDS: p53 tumor suppressing gen, proliferating cell nuclear antigen, malignant melanoma

GİRİŞ

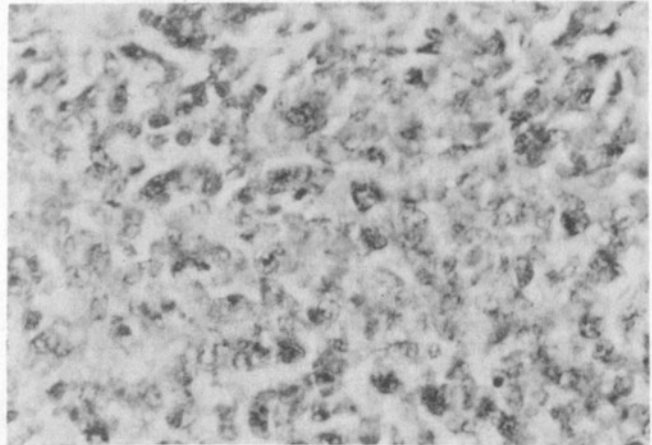
p53 geni hücre çoğalmasında potent bir baskılayıcı olarak hareket eden ve hücrede çok düşük konsantrasyonlarda bulunan bir nükleer fosfoproteini (normal veya "wild tip") kodlar. Mutant p53 protein, hücre içi yarı ömrünün uzaması sonucu immünohistokimyasal yöntemlerle saptanabilir hale gelir. Son zamanlarda yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda benign ve malign deri tümörlerinde p53 gen ekspresyonu gösterilmiş ve bunun prognostik önem taşıyabileceği ileri sürülmüştür (1,2).

Proliferating cell nuclear antigen [PCNA/Cyclin (p10)], DNA sentezi için gerekli olan ve hücre siklusunun geç G1 ve S fazlarında maksimum düzeyde saptanan bir nükleer protein olup, çeşitli lezyonlarda proliferasyon belirleyicisi olarak kullanılmaktadır (3,4).

Bu çalışmada malign melanoma'da p53 ile proliferating cell nuclear antigen ekspresyonları arasındaki ilişkiyi incelemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Öndokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji ve Patoloji Anabilim Dallarında takip ve tedavi edilen ve deride yerleşim gösteren 9 malign melanom ve kontrol grubu



Resim 1 : Malign melanomada PCNA ekspresyonu (Vaka: 1, Pf: 0.432, biotin streptavidin peroksidaz, x630, imm. oil)

olarak seçilen 7 intradermal nevüsü olan hastanın lezyonlu doku örneklerinde çalışıldı. Vakalara ait preparatlar tekrar incelendi. Vakaların Clark evrelendirmeleri yapıldı. %10 tamponlu nötral formalinde fikse edilmiş doku örnekleri parafin kesitlerinde anti-human, mouse, primer antikorlar kullanılarak, intranükleer p53 (clone:BP53.12) ve proliferating cell nuclear antigen (clone: P10) ekspresyonları streptavidin biotin peroksidaz yöntemiyle araştırıldı. Her olgu için p53 ekspresyonu, boyanma görülen hücrelerin oranlarına göre [% 1-%25= (+); % 26-50= (++) ; % 51-75= (+++) ve >%75= (++++)] derecelendirildi. PCNA indeksi (nükleer pozitivite gösteren hücreler/1000 neoplastik hücre) de hesaplandı (tablo 1). Gruplararası ilişkiler, Fisher'in Ki-Kare testi kullanılarak değerlendirildi.

* Öndokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Samsun

** Öndokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Samsun

*** Öndokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Samsun

**** Bu çalışma 28 Mayıs-2 Haziran 1995 tarihleri arasında Antalya'da yapılan 11. Ulusal Kanser Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

TABLO 1 : MALİGN MELANOMA VAKALARINDA PARAMETRELER

OLGU	YAŞ	CİNS	DÜZEY	p53 GRADE	PCNA İNDEKSİ
1	61	E	V	I	0.432
2	43	E	V	I	0.005
3	74	E	V	I	0.014
4	56	K	V	I	0.009
5	63	K	V	0	.320
6	65	K	V	0	0.210
7	65	K	V	I	0.004
8	53	K	V	II	0.055
9	20	E	III	I	0.320

TABLO 2 : İNTRADERMAL NEVÜS VAKALARINDA PARAMETRELER

OLGU	YAŞ	CİNS	p53 GRADE	PCNA İNDEKSİ
1	23	E	0	0.031
2	21	K	0	0.014
3	25	E	0	0.010
4	22	E	III	0.010
5	18	K	I	0.004
6	25	K	0	0.017
7	17	K	0	0.007

BULGULAR

Malign melanoma vakalarının dördü erkek (% 44.4); beşi kadın (% 55.6) olup, ortalama yaşları, sırasıyla 49.5 ve 60.4 yılıdır. Düzey III olan biri haricindeki bütün malign melanoma grubu lezyonları Clark düzeyi V olarak derecelendirildi. İntradermal nevüs vakalarının üçü erkek (% 42.8); dördü kadındı (% 57.2) ve ortalama yaşları sırasıyla 23.3 ve 20.2 yılıdır.

Intranükleer p53 boyanması malign melanoma'lı 7 hastada (6 grade I ve 1 grade II) ve intradermal nevüs'lü 2 hastada (1 grade I ve 1 grade III) saptandı (p>0.05). 5 malign melanoma'lı hastada % 5'in üzerinde PCNA immünreaksiyonu saptandı, buna karşın, hiçbir intradermal nevüs'de bu oranda reaksiyon gözlenmedi. Malign melanoma vakalarında % 5'in üzerinde PCNA ekspresyonu intradermal nevüslerde izlenen immünreaksiyon profilinden anlamlı derecede farklı bulundu (p=0.02) (tablo 1,2) (resim 1-2).

TARTIŞMA

Benign ve malign melanositik tümörlerde incelenen p53 ekspresyonu sonuçları değişkendir. Cristofolini ve ark., intradermal nevüslerin % 15'inde reaktivite saptamışlar, ancak yoğunluğu çok zayıf-% 1- bulmuşlardır, % 30 malign melanoma vakasında ise yoğun ekspresyon izlenmiştir (5). McGregor ve ark. da, 27 melanositik nevüsde % 0; 18 primer malign melanomda % 71.5; 7 kütanöz metastatik malign melanoma vakasında ise % 86 oranında ekspresyon saptamışlardır ve bu reaksiyonların çoğu kuvvetli boyanma tarzındadır (6). Ro ve ark. deri tümörleri içinde p53 ekspresyonu sıklığını en az malign melanomlarda bulmuşlar, 19 melanositik nevüsde % 0; 27 malign melanoma vakasının ise sadece 1 tanesinde -% 0.3- ekspresyon saptamışlardır (7). Yamamoto ve Takahashi ise, 42 vakalık serilerinde primer malign melanomda % 38, metastatik malign melanomda

ise % 57 oranında pozitivite saptamışlardır. Bu oran 45 melanositik nevüs vakasında ise % 0.3 olarak bulunmuştur (8).

p53 pozitifliği gösteren displazik lezyonların daha yüksek hız veya olasılıkla malignensiye ilerleyebileceği düşünülmektedir, bazı serilerde p53 pozitifliğinin malign lezyonlarda displazik alanlarda daha yoğun izlenmesi de bunu desteklemektedir (7). Malign transformasyon gen mutasyon sıklığı ne olursa olsun protein yıkımını azaltıp, wild tip protein birikimini sağlayabilir, ayrıca mutan ürün artabilir, mutan ve wild tip protein kompleksleri oluşabilir. Böylece total p53 protein birikimi artar. p53 ekspresyonu ile malign transformasyonun derecesi arasında ilişki olabileceği de mukozal melanomlarda hastalık daha iyi seyirlidir ve bunlar daha az p53 protein ekspresyonu gösterirler-ileri sürülmektedir (8). Sadece kuvvetli pozitif homojen p53 immünreaktivitesi gösteren tümörlerin p53 boyanmalarının wild-tip proteinin post translasyonel stabilizasyonuna bağlı olması muhtemeldir (6,8).

Yıkım yollarında bir defekt gibi nedenlerle p53 proteinin normalden fazla birikimi söz konusu olduğunda ise yalancı pozitif durumlar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca yalancı pozitivite wild tipe bağlı olabilmekte ve p53 reaktivitesi bu proteinin aktif ras veya myc onkogenleri ile bilinmeyen mutasyon dışı yollarla stabilize edilmesine, dolayısı ile yıkılmamasına bağlı olarak demonstre olmasına yol açabilmektedir. Post translasyonel wild tip p53 stabilizasyonu, transformasyona uğrayan hücrelerde mutasyon olmadan da olabilir. p53 protein, fonksiyon görmediği hücrelerde immünhistokimyasal olarak, her iki p53 geni delesyona uğradığında veya kullanılan yöntemle saptanabilir düzeyin altındaysa veya kullanılan antikor tarafından tanınamayacak karakterde konfigürasyona uğramış mutan form varlığında saptanamayabilir. Ayrıca yalancı negatif sonuçlar, stabilize olmayan mutasyonlara veya stop kodon mutasyonlarına bağlı olabilir ve bu mutasyonların sıklığı da bilinmemektedir. Primer malign melanoma p53 pozitif iken metastazlarının negatif olması bu şekilde açıklanabilir (6). Yalancı negatif ve yalancı pozitif durumların sıklığı hakkında veri yoktur. Ancak çift delesyonların çok nadir olduğu bilinmektedir (5,7).

Çalışmamızda malign melanoma vakalarımızın % 77.7 sinde, intradermal nevüs vakalarımızın da % 28.5'unda p53 protein ekspresyonu saptandı. Malign melanomalarda zayıf izlenen reaksiyon patterni, pozitivite gözlenen nevüs vakalarında daha kuvvetliydi. Normal cilt ve benign nevüslerde saptanabilecek p53 ekspresyonu, DNA yapımı ve apoptozis, diferansiyasyona bağlı olarak oluşan fizyolojik wild tip p53 proteinin artımına bağlıdır. Nevüslerde p53 ekspresyonunun p53 mutasyonuna bağlı olma olasılığı düşüktür, çünkü bunlarda proliferatif aktivite azdır (5). Bizim çalışmamızda da p53 pozitifliği saptanan nevüsler benzer şekilde açıklanabilir. Ancak nevüslerde saptanan p53 immünreaksiyonu malign fenotipin göstergesi de olabilir. Bu durum, p53 proteinin immünhistokimyasının tanısal amaçla kullanımını sınırlandırmaktadır. Benign nevüslerde p53 reaktivitesinin gösterilmesi malignite lehine alınırken çok dikkatli olunmalıdır. Bazen pozitivite, farklı fiksasyon süreçlerine ve/veya nükleer transport sinyalinin değişikliğine bağlı olabilir (5,7).

Primer kütanöz melanositik tümörlerde proliferatif aktivite mitoz sayısı, thymidine işaretlemesi veya Ki-67 antigen'in immünhistokimyasal olarak gösterilmesi yoluyla incelenmiştir ve birçoğunda melanoma hücrelerinin proliferatif aktiviteleri ile Breslow indeksi ve/veya prognoz arasında ilişki gösterilmişse de melanositik nevüslerin hücre kinetiği henüz açıkça ortaya konmamıştır. Malign melanomda izlenen PCNA immünreaktivitesinin melanositik nevüslerde saptanan reaksiyona oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (9-

11). Az sayıda melanositik nevusda da PCNA ekspresyonu gösterilmişse de, bunun fiksasyon gibi teknik nedenler ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (11).

PCNA ile sağkalım ilişkisi ortaya konmamakla birlikte benign ve malign lezyonlar arasında ekspresyon önemli farklılık göstermektedir. Niemann ve ark. P10 klonu kullandıkları çalışmalarında, malign melanom olgularının % 80'inde diffüz ve yoğun, % 20 olguda da zayıf olmak üzere bütün vakalarında PCNA reaksiyonu izlemişlerdir (10). Rieger ve ark. da melanositik tümörlerde benign formlardan primer ve metastatik melanomlara doğru gidildiğinde PCNA reaktivitesinin arttığını göstermişlerdir (11). Takahashi ve ark., 19A2 klonu kullandıkları çalışmalarında, Clark düzey I-III arasındaki primer malign melanoma vakalarının % 62.5'inde, metastatik melanomaların % 93.3'ünde, melanositik nevusların ise ancak % 11.4'ünde pozitif PCNA immünreaksiyonu saptamışlardır (12). Çalışmamızda melanomalarda yüksek PCNA reaktivitesi saptanmış, ancak nevüs grubumuzda % 5'in üzerinde PCNA ekspresyonu izlenmemiştir. PCNA immünreaksiyonu; q hücre replikasyonuna bağlı olarak eksprese edilmesine, DNA onarımı sonucu oluşun PCNA'nin yeniden dağılımına ve/veya PCNA geninin az veya fazla eksprese edilmesine bağlı değişikliklere ya da düzeni bozulan PCNA transkripsiyon veya translasyonuna bağlı olabilir. PCNA mRNA'sını stabilize eden büyüme faktörleri salgılayan tümörlerde DNA sentezi uyarılmadan da PCNA birikimi olabilir (13). Çalışmamızda p53 ve PCNA ekspresyonları arasında benzerlik olmaması da bu nedene bağlı olsa gerektir.

Literatürde melanositik lezyonlarda p53 ve PCNA ekspresyonlarının ilişkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sonuçlarımız melanositik tümörlerde, p53 proteine göre proliferating cell nuclear antigen immünreaktivitesinin daha yararlı bir proliferasyon ve malign süreç belirleyicisi ol-

duğunu göstermektedir. Melanositik lezyonlarda PCNA ve p53 ekspresyonunun beraberce gösterilmesi malign karakteri desteklemektedir düşüncesindeyiz. Daha geniş hasta gruplarında yapılacak çalışmalar konuyu açıklığa kavuşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Urano Y, Arase S. Immunohistologic p53 expression in normal skin. *J Am Acad Dermatol* 31:518, 1994
2. Helander SD, Peters MS, Pittelkow MR. Expression of p53 protein in benign and malignant epidermal pathologic conditions. *J Am Acad Dermatol* 29: 741-748, 1993
3. Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162:285-294, 1990
4. Geary WA, Cooper PH. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in common epidermal lesions. *J Cutan Pathol* 19: 458-468, 1992
5. Cristofolini M, Boi S, Girlando S, et al. p53 Protein expression in nevi and melanomas. *Arch Dermatol* 129: 739-743, 1993
6. McGregor WM, Yu CC-W, Dublin EA, et al. p53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic naevi. *Bri J Dermatol* 128: 606-611, 1993
7. Ro YS, Cooper PN, Lee JA, et al. p53 Protein expression in benign and malignant skin tumours. *Bri J Dermatol* 128: 237-241, 1993
8. Yamamoto M, takahashi H. Immunohistochemical detection of the p53 oncoprotein in tumours of melanocytic origin. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 422: 127-132, 1993
9. Kuwata T, Kitagawa M, Kasuga T. Proliferative activity of primary cutaneous melanocytic tumours. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 423: 359-364, 1993
10. Niemann TH, Argenyi ZB. Immunohistochemical study of spitz naevi and malignant melanoma with used of antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. *J Cutan Pathol* 20: 229-236, 1993
12. Takahashi H, Strutton GM, Parsons PG. Determination of proliferating fractions in malignant melanomas by anti-PCNA/Cyclin monoclonal antibody. *Histopathol* 18: 221-227, 1991
13. Woosley JT, Dietrich DR. Prognostic significance of PCNA grade in malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 20: 498-503, 1993.