

***Rhabdomyosarcoma* – zmiany genetyczne w patogenezie nowotworu**

Agnieszka Marcinowska

W pracy omówiono zaburzenia chromosomalne występujące w rhabdomyosarcoma. Szczególną uwagę zwrócono na konsekwencje pojawienia się w komórkach typu alweolarnego rhabdomyosarcoma białek fuzyjnych PAX3-FKHR oraz PAX7-FKHR, które są bezpośrednim wynikiem translokacji t(2;13) (q35;q14) oraz t(1;13) (p36;q14). Białka te deregulują transkrypcję i przenoszenie sygnałów w prawidłowej komórce, przyczyniając się w ten sposób do transformacji nowotworowej. Omówiono również zaburzenia genetyczne, występujące w podtypie embrionalnym rhabdomyosarcoma, o typie utraty fragmentu chromosomu 11. Fragment ten jest prawdopodobnie odpowiedzialny za hamowanie rozwoju komórek nowotworowych, sugerując obecność genu(ów) supresorowych dla guza w tym regionie.

***Rhabdomyosarcoma* – genetic changes in tumor pathogenesis**

This article reviews chromosomal alterations which are found in rhabdomyosarcoma. Particular attention is paid to the consequences of the presence of fusion proteins PAX3-FKHR and PAX7-FKHR which are the result of translocation t(2;13) (q35;q14) and t(1;13) (p36;q14) in alveolar rhabdomyosarcoma cells. These proteins deregulate transcription and signaling in the normal cell causing tumorigenesis. In the embryonal subtype of rhabdomyosarcoma genetic alterations like allelic loss at chromosome 11 were also presented. This particular part of chromosome is probably responsible for repressing tumor cell growth, suggesting the presence of tumor suppressor gene(s) in this region.

Słowa kluczowe: *rhabdomyosarcoma*, zmiany genetyczne, translokacja

Key words: *rhabdomyosarcoma*, genetic changes, translocation

Wstęp

Rhabdomyosarcoma (RMS) stanowi powyżej 50% wszystkich mięsaków występujących u dzieci [1]. Na podstawie cech histopatologicznych RMS dzieli się na 2 główne typy: alweolarny (ARMS) i embrionalny (ERMS) [2, 3]. ARMS występuje głównie u dorosłych i młodzieży. Lokalizuje się najczęściej w kończynach i tułowiu i charakteryzuje się gorszym rokowaniem, związanym z wczesnym i rozległym rozsiewem (często obejmującym szpik kostny) oraz ze słabą odpowiedzią na leczenie. Natomiast ERMS występuje u dzieci poniżej 10 r.ż. i jest zlokalizowany najczęściej w układzie moczowo-płciowym, głowie, szyi, przestrzeni zaotrzewnowej. Ten typ RMS charakteryzuje się lepszym rokowaniem, w porównaniu do ARMS. Diagnostyka histopatologiczna RMS obejmuje immunohistochemię, ocenę ekspresji określonych białek mięśniowych – takich jak MyoD, desmina, mioglobina, oraz mięśniowo-specyficzna aktyna. W mikroskopie elektronowym stwier-

dza się obecność miofilamentów [4]. Diagnostyka histologiczna RMS jest obarczona szeregiem trudności, wynikających z braku cech histologicznych, wyróżniających RMS od innych guzów, litych należących do grupy tzw. „*small round cell tumors*” oraz brakiem metody różnicującej ERMS i ARMS. Chociaż większość przypadków RMS objawia się jako sporadyczne, odosobnione guzy, istnieje mała podgrupa związana z zespołami genetycznymi. Zespół Beckwith-Wiedemanna (BWS) charakteryzuje się przerostem tkanki w trakcie rozwoju i zwiększoną predyspozycją do występowania guza Wilmsa, raka nadnerczy, *hepatoblastoma* lub ERMS. Zespół Li Fraumeni charakteryzuje rodzinne występowanie szerokiego spektrum nowotworów, m.in. raka piersi, *glioblastoma*, białaczek, *osteosarcoma*, RMS i innych guzów tkanek miękkich. Również u pacjentów z rodzinnie występującym siatkówczakiem obserwuje się częstsze przypadki mięsaków kości i tkanek miękkich, w tym również RMS [5].

Wymienione cechy kliniczne i patologiczne *rhabdomyosarcoma* zainicjowały szereg badań nad zmianami molekularnymi komórek tego nowotworu. Wyniki tych badań mają znaczenie zarówno dla rozwoju diagnostyki, poznania patomechanizmów molekularnych tego nowotworu, jak i dla terapii RMS.

Translokacje chromosomalne występujące w ludzkich mięsach tkanek miękkich

Przez ostatnie 20 lat badania cytogenetyczne i molekularne dowiodły, że mięsaki tkanek miękkich, do których zaliczamy RMS, charakteryzują się specyficznymi zaburzeniami chromosomalnymi o typie translokacji (Tab. I) [6]. Często dotyczą one genów kodujących czynniki transkrypcyjne. W wyniku translokacji powstają geny fuzyjne, które zawierają sekwencje pochodzące z obu genów macierzystych. Produktem fuzji genów jest nowe białko, mogące działać np. jako czynnik deregulujący transkrypcję i przenoszenie sygnałów, przyczyniając się tym samym do transformacji nowotworowej komórki poprzez zaburzenie procesu ekspresji genów docelowych [7]. Tego typu białkami są np. produkty genów fuzyjnych PAX3-FKHR i PAX7-FKHR. Coraz dokładniejsze poznawanie tego mechanizmu przyczynia się do rozwoju nowych technologii, umożliwiających molekularną diagnostykę tych nowotworów oraz stwarza możliwość blokowania białek fuzyjnych, powstających w wyniku niektórych z tych translokacji, za pomocą np. oligomerów antysensowych lub inhibitorów kinaz tyrozynowych [8].

Translokacje chromosomalne występujące w ARMS

Komórki *rhabdomyosarcoma* charakteryzują różne zaburzenia cytogenetyczne. W typie alweolarnym RMS charakterystyczne są 2 typy translokacji: częstsza t(2;13) (q35-q37;q14), choć istnieją również inne warianty, jak 13q14, q35 i q36.1, rzadsza t(1;13) (p36;q14), oraz bardzo rzadka t(2;11) [9, 10] (Tab. I). Spostrzegane translokacje charakterystyczne dla tego nowotworu wykrywa się w 70% przypadków ARMS. Wyjątkowo rzadko obserwowano je w niealweolarnych typach RMS. W wyniku powyższych

translokacji w komórce gromadzą się białka fuzyjne (PAX3-FKHR oraz PAX7-FKHR), które są czynnikami transkrypcyjnymi o zwiększonej aktywności. W ARMS produktem translokacji t(2;13) jest gen fuzyjny PAX3-FKHR, powstały po połączeniu dwóch genów: PAX3 z chromosomu 2 i FKHR z chromosomu 13 [11]. Natomiast gen fuzyjny PAX7-FKHR powstaje w wyniku translokacji t(1;13): PAX7 z chromosomu 1 i FKHR z chromosomu 13.

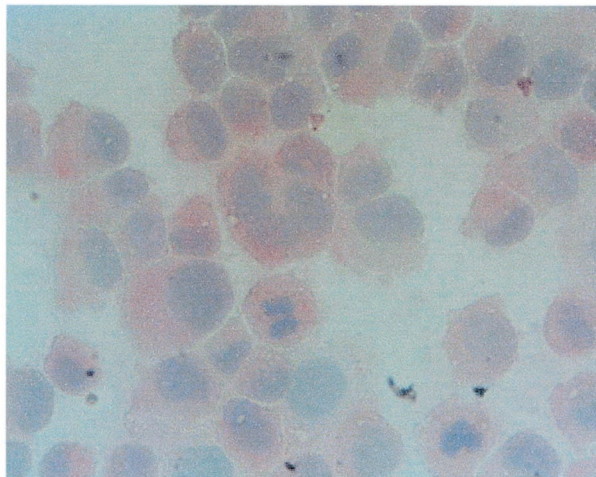
Powstałe białka fuzyjne PAX3-FKHR i PAX7-FKHR wykazują 10-100 razy większą aktywność transkrypcyjną, w porównaniu z prawidłowymi białkami PAX-3 i PAX-7. Miejsca wiążące PAX-3 i PAX-7 występują w promotorach wielu genów, kodujących m.in. receptory powierzchniowe komórki, czynniki wzrostowe itp. Białka fuzyjne o zwiększonej aktywności transkrypcyjnej przyczyniają się do zapoczątkowania lub progresji procesu onkogenezy [12], wpływając na wzrost, ruchliwość, różnicowanie i apoptozę komórek nowotworowych.

Badania nad mysimi genami Pax wykazały, że geny te mają istotne znaczenie w rozwoju układu mięśniowego i nerwowego. U myszy *Splotch*, u których występuje mutacja genu Pax3, nie dochodzi do rozwoju mięśniówki kończyn, podczas gdy umięśnienie szkieletu osiowego jest nieco zredukowane. Ten defekt jest wynikiem braku migracji prekursorów miogennych z somitów do zawiązka kończyn [13-16]. Badania nad zmutowanymi szczepami mysimi sugerują więc potencjalną rolę Pax3 w stymulacji ruchu oraz żywotności rozwijającej się populacji komórek mięśniowych. Podłożem dla tego procesu jest pobudzenie wzrostu, hamowanie apoptozy, lub hamowanie przedwczesnego różnicowania miogennego komórek. Ponadto dowiedziono, że produkt genu Pax3 kontroluje ekspresję genu C-MET. U myszy *Splotch* zaobserwowano brak transkryptu genu C-MET, stąd wysunięto hipotezę, że

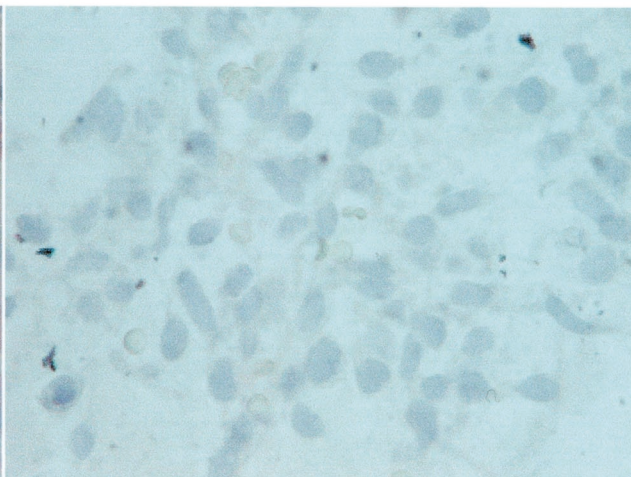
Tab. I. Translokacje i białka fuzyjne specyficzne dla mięsaków tkanek miękkich [7]

Guz	Translokacja	Białkowy produkt fuzji
<i>Rhabdomyosarcoma alveolare</i>	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	PAX3-FKHR PAX7-FKHR
Mięsak Ewinga	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12)	EWS-FLI1 EWS-ERG
<i>Liposarcoma myxoides</i>	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	TLS-CHOP EWS-CHOP (rzadkie)
<i>Melanoma malignum</i>	t(12;22)(q13;q12)	EWS-ATF1
<i>Desmoplastic small-round cell tumor</i>	t(11;22)(p13;q22)	EWS-WT1
<i>Sarcoma synoviale</i>	t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX1&SYT-SSX2, SYT-SSX4 (rzadkie)
<i>Chondrosarcoma myxoides</i>	t(9;22)(q22;q12) t(9,17)(q22;q11)	EWS-CHN TAF2N-CHN (rzadkie)
<i>Dermatofibrosarcoma protuberans</i>	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB
<i>Fibrosarcoma congenitum</i>	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3

a.



b.



Ryc. 1. Preparat histologiczny guza – *rhabdomyosarcoma alveolare* barwiony immunocytochemicznie na obecność C-MET (badania własne)
a. Preparat guza barwiony na obecność C-MET
b. Kontrola negatywna

brak ekspresji C-MET jest podstawową przyczyną zaburzeń w rozwoju układu mięśniowego i nerwowego. Czynniki zwiększającymi ekspresję C-MET w komórce jest PAX3 oraz wymienione wcześniej białko fuzyjne, będące wynikiem translokacji t(2;13)- PAX3-FKHR [15, 17, 18]. Produktem protoonkogenu C-MET jest $\alpha\beta$ dimer, którego podjednostka β ma wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej, a podjednostka α stanowi część znajdującą się na powierzchni komórki. Protoonkogen C-MET działa jako receptor dla czynnika wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor* – HGF), zwanego inaczej czynnikiem rozproszenia (ang. *scatter factor* – SF) [19]. HGF produkowany jest przez komórki mezenchymalne, fibroblasty, makrofagi, limfocyty T, komórki glejowe oraz komórki mięśniówki gładkiej naczyń. HGF reguluje proliferację, ruchliwość komórki nowotworowej, a także jest silnym czynnikiem angiogenetycznym. Zwiększoną produkcję mRNA dla C-MET, jak i jego translację zaobserwowano w mięsakach tkanek miękkich, np. w mięsaku Kaposi'ego. Zwiększonej ekspresji C-MET towarzyszyła zwiększona ekspresja HGF, sugerując mechanizmy regulacyjne na drodze parakrynej lub autokrynej. Na Rycinie 1 przedstawiono preparat histologiczny guza ARMS barwiony immunocytochemicznie, na którym widoczna jest zwiększona ekspresja C-MET na powierzchni komórek nowotworowych. Na Rycinie 2 przedstawiono z kolei preparaty dwóch linii komórkowych RMS (CW9019-ARMS i SMS-CTR-ERMS), barwione immunocytochemicznie na obecność C-MET i HGF. Na komórkach tych linii stwierdza się zwiększoną ekspresję receptora C-MET oraz obecność cytoplazmatycznego HGF. Wiązanie ligandu HGF do receptora prowadzi do zmian właściwości komórek, np. komórki nabywają zdolności do migracji i inwazji otaczającej tkanki łącznej. Może to stanowić jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za większą inwazyjność tego typu RMS oraz gorsze rokowanie. Badania prowadzone przez nasz zespół pokazują, że komórki li-

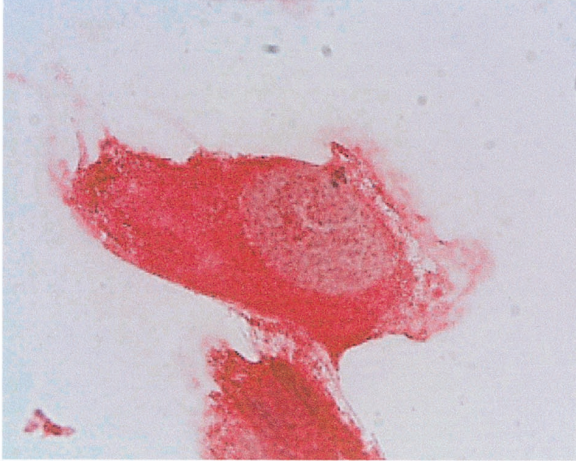
nii RMS (m.in. CW9019-ARMS i SMS-CTR-ERMS) w obecności HGF [20] wykazują większą zdolność do migracji (Ryc. 3).

Zespół nasz ostatnio wykazał, że białko fuzyjne PAX3-FKHR bierze również udział w regulacji ekspresji receptora chemokinowego CXCR4, który pełni ważną rolę w przerzutowaniu komórek RMS do szpiku kostnego i węzłów chłonnych [20]. Jak wynika z Ryciny 3 swoisty ligand receptora CXCR4, którym jest α -chemokina SDF-1, również zwiększa lokomocję komórek RMS.

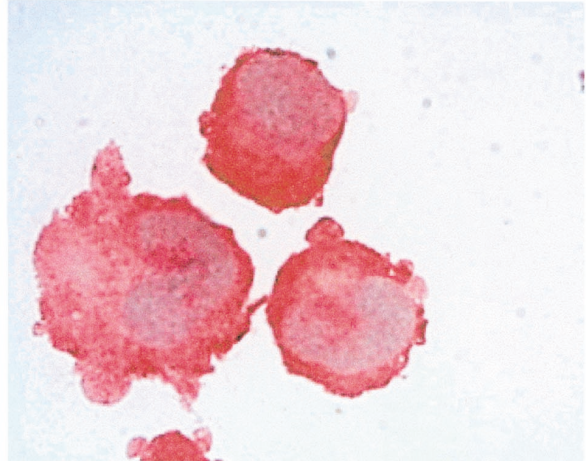
W przeciwieństwie do utraty funkcji związanej z mutacją PAX3, zaburzenia PAX3, związane z translokacją t(2;13), powodują zwiększenie czynności tego genu. Potwierdzono to szeregiem badań linii komórkowych z wprowadzonym genem PAX3-FKHR. Wyniki jednych z nich wykazały, że PAX3-FKHR był bardziej efektywny niż PAX3 w hamowaniu różnicowania miogenne mioblastów [21]. W innym badaniu wykazano, że PAX3 nie wpływa na transformację komórek NIH3T3 oraz embrionalnych fibroblastów kurzych, podczas gdy PAX3-FKHR posiadał aktywność prowadzącą do transformacji [22, 23]. Ponadto wykazano, że zmniejszenie ekspresji PAX3-FKHR w komórkach RMS wywołuje śmierć komórki, najprawdopodobniej drogą apoptozy [24]. U embrionów mysich z wprowadzonym genem PAX3-FKHR spostrzeżono zaburzenia w rozwoju, dotyczące głównie zmian w pigmentacji brzucha, ogona i tylnych kończyn oraz szereg zaburzeń neurologicznych przy braku rozwoju guza. Istnieje możliwość, że guzy mogą rozwijać się, ale w tkankach już dorosłych osobników [25].

Na szczególną uwagę zasługuje fenotyp myszy, u której za pomocą techniki homologicznej rekombinacji wyłączono (*knock-out*) gen kodujący inny czynnik transkrypcyjny z rodziny PAX, tzw. PAX-7. Wykazano bowiem, że myszy z mutacją tego genu nie posiadają komórek satelitarnych w mięśniach szkieletowych. Komórki te są komórkami progenitorowymi mięśni [13].

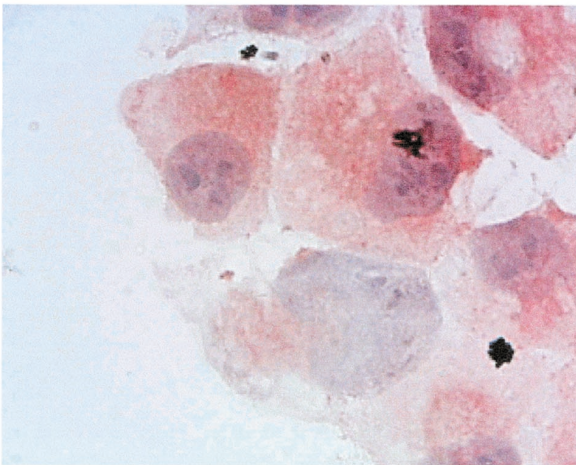
a.



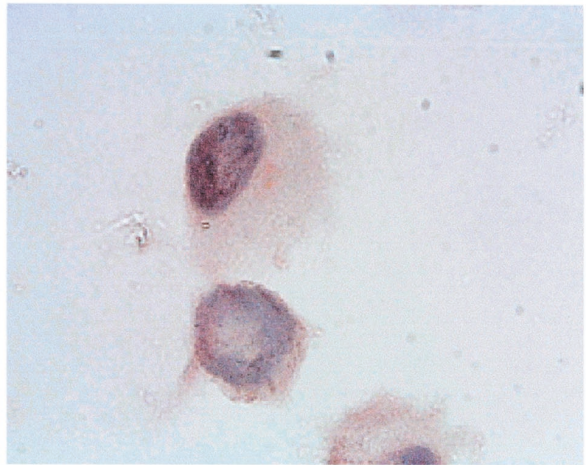
d.



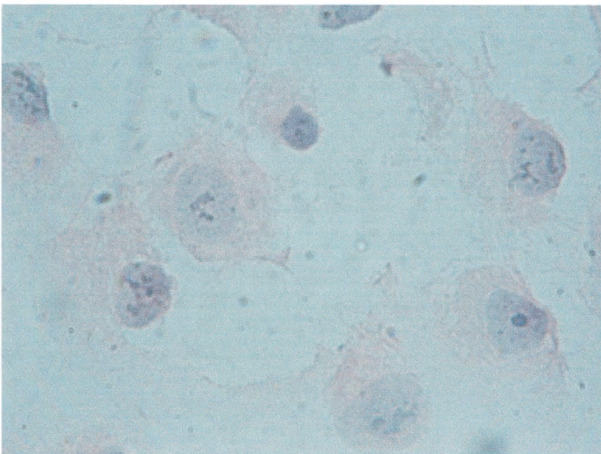
b.



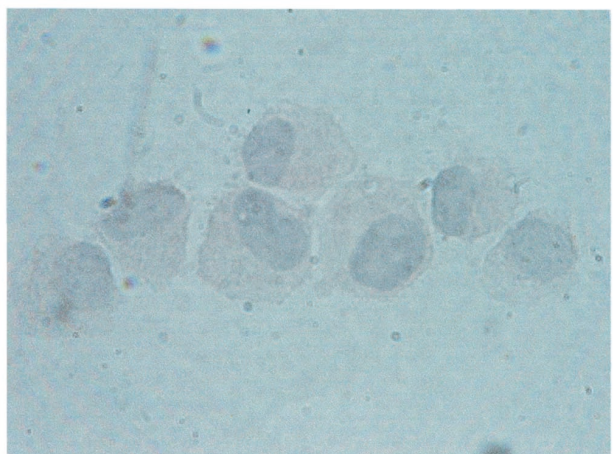
e.



c.

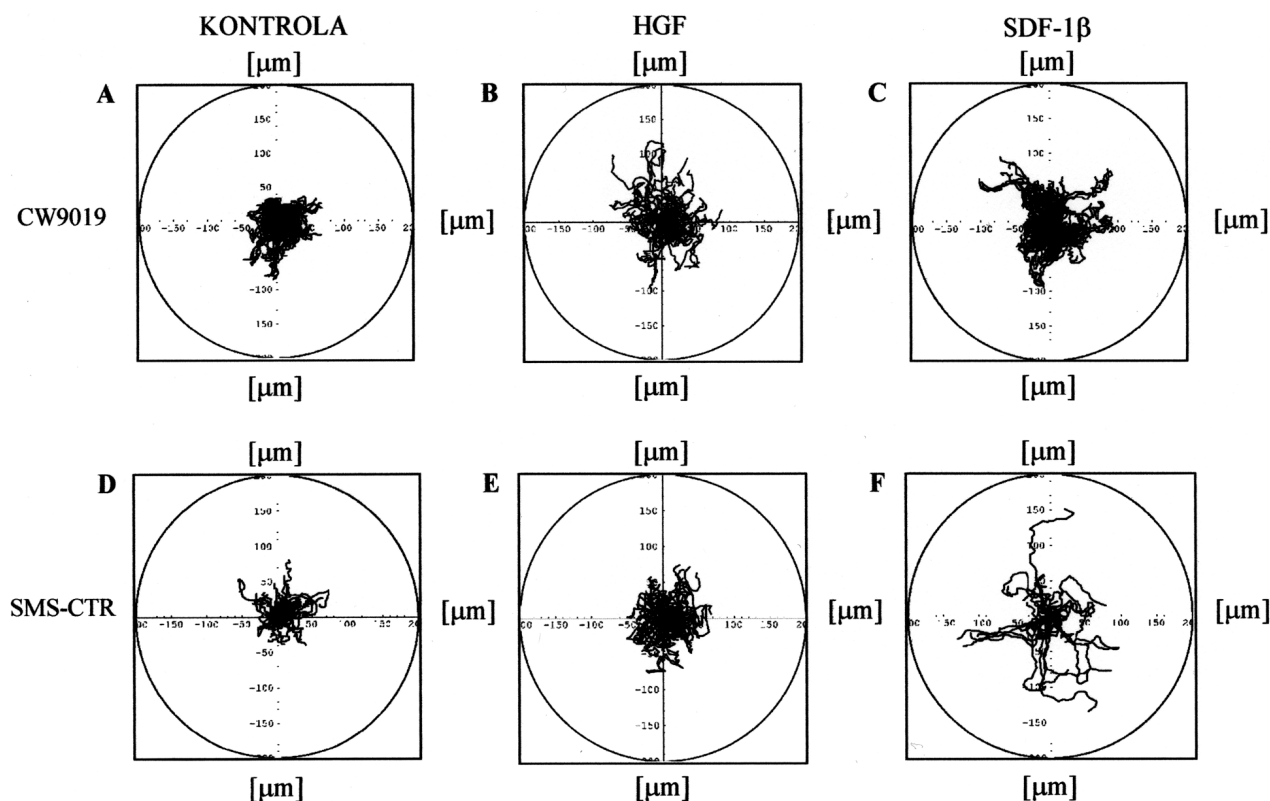


f.



Ryc. 2. Preparaty linii komórkowych RMS (CW9019, SMS-CTR) barwione immunocytochemicznie na obecność C-MET, HGF oraz kontrole negatywne (badania własne):

- a. Preparat linii komórkowej CW9019 barwiony na obecność C-MET
- b. Preparat linii komórkowej CW 9019 barwiony na obecność HGF
- c. Preparat linii komórkowej CW9019 – kontrola negatywna
- d. Preparat linii komórkowej SMS-CTR barwiony na obecność C-MET
- e. Preparat linii komórkowej SMS-CTR barwiony na obecność HGF
- f. Preparat linii komórkowej SMS-CTR – kontrola negatywna



Ryc. 3. HGF i SDF-1 zwiększają ruchliwość komórek RMS (badania własne). Trajektorie linii *rhabdomyosarcoma* – CW9019 (RMS *alveolare*), SMS-CTR (RMS *embryonale*) poruszających się w medium RPMI-1640 (warunki kontrolne: A, D), w obecności HGF (10 ng/ml; B, E), w obecności SDF-1 (300 ng/ml: C, F). Przedstawiono w diagramach kołowych, gdzie punkt wyjścia każdej trajektorii stanowi centrum koła. Całość nagrania trwała 200 min, co 5 min rejestrowano pozycję komórki. Poszczególne punkty określające pozycję komórki łączone linią ciągłą, uzyskując w ten sposób drogę ich przemieszczenia. Każdy wykres stanowi 100 trajektorii dla 100 różnych komórek.

Defekty osi PAX3-C-MET obserwuje się również w zespole Waardenburga. To zaburzenie w rozwoju mięśniówki wiąże się ze zmniejszoną ekspresją receptora C-MET na powierzchni prekursorów miogennych. Stąd też wysunięto hipotezę, że receptor C-MET stanowi prawdopodobnie cel dla transkrypcyjnego czynnika, jakim jest PAX3 oraz, że problemy związane z migracją prekursorów komórek miogennych mogą wynikać z upośledzonej regulacji ekspresji C-MET przez zmutowany czynnik transkrypcyjny PAX-3 [18].

Zaobserwowane różnice, zarówno histopatologiczne jak i kliniczne, między oboma typami RMS (alweolarnym i embrionalnym), mogą wynikać ze zmian cytogenetycznych, różniących oba typy RMS i mogą być tłumaczone w 69-87% przypadków obecnością fuzyjnych genów PAX3-FKHR i PAX7-FKHR [26]. Niemniej jednak w 13-31% przypadków guzów ARMS nie obserwuje się obecności translokacji chromosomowych t(2;13) (q35-37;q14), t(1;13) (p36;q14), jednak ekspresja ta stanowi nadal podstawowy element różnicujący typy RMS, gdyż w większości przypadków ERMS nie wykazano obecności genów fuzyjnych. W niektórych przypadkach obserwuje się również amplifikację genów fuzyjnych [27]. Stwierdzono taką amplifikację np. w 1 (na 22) przypadku guza z obecnym genem fuzyjnym PAX3-FKHR, i w 5 (na 7) przypadkach guzów z PAX7-FKHR. Analiza cech klinicznych w ARMS

wykazała, że guzy z PAX7-FKHR mają większą tendencję do występowania u młodszych pacjentów, częściej lokalizują się w kończynach i wiążą się z dłuższym przeżyciem wolnym od objawów choroby (EFS – *event free survival*), w przeciwieństwie do częstszych i gorzej rokujących guzów z obecnością PAX3-FKHR. Badania nad diagnostyką molekularną RMS pokazały, że istnieje podgrupa przypadków, histologicznie klasyfikowanych jako ARMS, które nie zawierały żadnej opisanej fuzji genów, oraz podgrupa ERMS, posiadająca ekspresję genów fuzyjnych. Sugeruje to istnienie związku pomiędzy histologicznym obrazem i molekularnymi zmianami komórek RMS.

Translokacje chromosomalne występujące w ERMS

W typie embrionalnym RMS zaobserwowano szereg zmian związanych z zaburzeniami ilościowymi i strukturalnymi chromosomów, jak trisomia chromosomu 8, czy też zmiany w chromosomach 2 i 11. Analiza cytogenetyczna wykazała częsty brak fragmentu chromosomu 11 [28]. Zaburzenia chromosomów określono dzięki zastosowaniu metody *Southern blot*, PCR – *polymerase chain reaction*, RT-PCR – *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* oraz FISH – *fluorescence in situ hybridization*. Brak jednego spośród dwóch alleli w komórce nowotworowej może świadczyć o zmianie genetycznej, takiej jak utrata chromo-

somu, delecja, czy rekombinacja mitotyczna, która eliminuje jeden allel i sąsiadujący region w chromosomie. Wykrycie utraty fragmentu chromosomu 11 w większości przypadków ERMS stanowi charakterystyczne zaburzenie genetyczne w tym podtypie RMS, gdyż w ARMS nie obserwuje się defektu w obrębie chromosomu 11. Najmniejszy region utraty fragmentu chromosomu w ERMS jest zlokalizowany w chromosomie 11p15.5. Jednak podobny region utraty allelu zaobserwowano również w guzach występujących w zespole Beckwith-Wiedemanna, takich jak guz Wilmsa oraz *hepatoblastoma*. Zwykle brak allelu w komórce nowotworowej świadczy o obecności w tym miejscu chromosomu prawidłowej komórki genu supresorowego dla guza. Ta hipoteza została potwierdzona dzięki badaniom nad linią komórkową RD ERMS, do której przeniesiono prawidłowy chromosom 11. Okazało się, że komórki te utraciły zdolność proliferacyjną, w znacznym stopniu, co sugeruje, że wprowadzenie prawidłowego genu przywróciło prawidłową funkcję. Dokładną lokalizację miejsca supresorowego w regionie 11p określano właśnie dzięki zastosowaniu transferu fragmentów chromosomu do komórek RD [29]. Wykazanie zahamowania wzrostu, spowodowanego przez wszystkie fragmenty zawierające region 11p15, dowodzi obecności genu supresorowego guza w miejscu, gdzie wcześniej zaobserwowano brak fragmentu chromosomu (allelu). Dalsze badania nad mechanizmem utraty genu supresorowego, mieszczącego się w chromosomie 11, pokazują, że jest to proces dwuetapowy, w którym utrata jednego allelu, np. poprzez mutację punktową, prowadzi do inaktywacji drugiego allelu oraz, że w komórkach ERMS tracony jest głównie allel pochodzenia matczynego. W regionie 11p15.5 kandydatami są dwa geny. Jeden z nich to gen H19, którego produktem jest RNA, powstający podczas rozwoju płodowego i związany z różnicowaniem komórki, jednak nie ulegający translacji do białka. Gen ten, po transferze do komórek RD ERMS, powodował zahamowanie ich wzrostu. Drugi gen to CDKN1C, który koduje inhibitor kinazy cyklicznej, mający zdolności hamowania cyklu komórkowego. Ulega on ekspresji w trakcie rozwoju szeregu tkanek, m.in. mięśni. Zarówno gen H19, jak i CDKN1C ulegają ekspresji preferencyjnie z allelu dziedzicznego od matki (zjawisko „*genomic imprinting*”). Jednak H19 nie znajduje się wśród małych fragmentów chromosomu 11p15 hamujących wzrost guza, natomiast CDKN1C zawiera się w regionie określonym przez najmniejsze 11p15 fragmenty chromosomalne [30].

Zaburzenia regionu 11p15.5 stanowią prawdopodobnie podstawę zespołu Beckwith-Wiedemanna (BWS) [31]. Analiza sprzężenia genetycznego w rodzinach przekazujących to schorzenie pozwoliła na zlokalizowanie *locus* zmian w regionie 11p15.5. W kilku przypadkach BWS stwierdzono duplikację 11p, generującą dodatkowe kopie regionu dziedzicznego od ojca. W innych przypadkach translokacje wpływały na region 11p15, dziedziczony od matki. Ponadto wykazano pojedyncze przypadki BWS, bez udziału matczynego regionu 11p, będące przykładem duplikacji pochodzącej wyłącznie od ojca. Powyższe zmiany chromosomalne powodują nadmierną prezentację alle-

li pochodzących od ojca lub utratę alleli pochodzących od matki i wskazują na ważną rolę tzw. genowego „imprintingu” w etiologii tej choroby. Zostało to potwierdzone przez wykrycie ekspresji biallelicznej prawidłowo naznaczonego genu IGF2 u pacjentów z BWS. Opisano również genetyczne zaburzenia innych 11p15.5 loci: takich jak punktowa mutacja CDKN1C, rearanżacja KVLQT1. Te dane sugerują, że BWS jest związany z wieloma możliwymi zaburzeniami genetycznymi w określonym regionie chromosomu, obejmującymi szereg genów. Niektóre zmiany powodują zwiększenie liczby aktywnych alleli IGF2 i w ten sposób dochodzi do nadmiernej ekspresji tego płodowego czynnika wzrostu, natomiast inne zmiany wywołują mutację lub inaktywację ekspresji loci hamujących wzrost (H19 i CDKN1C).

Inne zmiany w ARMS i ERMS

W kilku przypadkach ARMS i ERMS, oprócz fuzji genów PAX3/PAX7 i FKHR oraz utraty allelu w chromosomie 11, stwierdzono również inne zaburzenia genetyczne. Zaburzenia te stanowią mutacje dotyczące zarówno genów supresorowych guza, jak i protoonkogenów. Zmiany te są również obecne w innych guzach, co dowodzi, jak złożonym (często mało swoistym) procesem jest onkogeneza.

W ARMS zaobserwowano częstsze niż w ERMS występowanie amplifikacji dotyczącej m.in. regionu 12q13-15 [32], a także amplifikacji N-MYC [7]. Natomiast w ERMS zauważono częstszą obecność dodatkowych chromosomów, m.in. 2, 7, 8, 12, 13, 17, 18, 19. Ponadto w ERMS zaobserwowano mutację, obejmującą protoonkogeny z rodziny RAS, m.in. K-RAS, H-RAS i N-RAS [33]. Oprócz charakterystycznej dla ERMS utraty allelu w regionie 11p15 spostrzeżono w tym miejscu inne zaburzenia genetyczne, zarówno w przypadku ERMS, jak i ARMS i była to m.in. duplikacja allelu IGF2 [34]. Spośród mutacji genów supresorowych guza spostrzeżono zmiany dotyczące genu *p53*, *RB1*.

Wnioski

Dzięki zastosowaniu najnowszych metod diagnostyki molekularnej komórek *rhabdomyosarcoma* [35] (RT-PCR, FISH, analiza cytogenetyczna) staje się możliwe precyzyjne rozpoznanie typu RMS, co umożliwi dokładne określenie rokowania i zastosowanie odpowiednich metod leczenia. Badania genów fuzyjnych mogą służyć do charakteryzowania danego procesu nowotworowego oraz pomagać w określeniu dalszego postępowania. Coraz dokładniejsze poznanie patomechanizmu choroby umożliwi zastosowanie nowych strategii leczenia, obejmujących np. związki blokujące ekspresję genów fuzyjnych, działanie produktów genów fuzyjnych, czy też specyficzne cytotoksyny lub immunoterapię. Badania nad zastosowaniem odpowiedniej szczepionki zostały już przeprowadzone na modelu mysim. Komórkami prezentującymi antygen-białko fuzyjne PAX3-FKHR, w powiązaniu z cząsteczkami MHC klasy I, były mysie splenocyty. Spostrzeżono brak

rozwoju guza *in vivo* oraz lizę komórek nowotworowych z PAX3-FKHR *in vitro* po dodaniu mysich cytotoksycznych limfocytów T [6]. Pozwala to mieć nadzieję, że wkrótce pojawią się nowe, bardziej efektywne metody leczenia dziecięcych mięsaków.

Podziękowania:

Składam serdeczne podziękowania dla dr hab. A. Pi-tuch-Noworolskiej za pomoc w ocenie preparatów oraz redagowaniu artykułu oraz mgr M. Kuci za pomoc w badaniu ru-chu komórek RMS.

Lek. med. Agnieszka Marciniowska

Zakład Transplantologii
Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii Collegium
Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków, Poland
e-mail: agamarcinow@wp.pl

Piśmiennictwo

- Arndt CAS, Crist WM. Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N Engl J Med* 1999; 341: 342-52.
- Barr FG. Molecular genetics and pathogenesis of *rhabdomyosarcoma*. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19: 483-91.
- Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM. Rhabdomyosarcomas: biology and treatment. *Pediatr Clin North Am* 1997; 44: 953-72.
- Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in *alveolar rhabdomyosarcoma*. *Oncogene* 2001; 20: 5736-46.
- Slominski A, Wortsman J, Carlson A i wsp. Molecular pathology of soft tissue and bone tumors. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1246-59.
- Tomescu O, Barr FG. Chromosomal translocations in sarcomas: prospects for therapy. *Trends Mol Med* 2001; 7: 554-9.
- Bennicelli JL, Barr FG. Genetics and the biologic basis of sarcomas. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 267-74.
- Maulik G, Shrikhande A, Kijima T i wsp. Role of hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 41-59.
- Bell RS, Wunder J, Anrulis I. Molecular alterations in bone and soft-tissue sarcoma. *CJS* 1999; 42: 259-65.
- Bennicelli JL, Edwards RH, Barr FG. Mechanism for transcriptional gain of function resulting from chromosomal translocation in *alveolar rhabdomyosarcoma*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5455-9.
- Barr FG. The role of chimeric paired box transcription factors in the pathogenesis of pediatric *rhabdomyosarcoma*. *Cancer Res* 1999; 59: suppl 1711s-1715s.
- Fredericks WJ, Galili N, Mukhopadhyay S i wsp. The Pax3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in *alveolar rhabdomyosarcomas* is a more potent transcriptional activator than Pax3. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1522-35.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A i wsp. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000; 102: 777-86.
- Corti S, Salani S, Del Bo R i wsp. Chemotactic Factors Enhance Myogenic Cell Migration across an Endothelial monolayer. *Exp Cell Res* 2001; 268: 36-44.
- Epstein JA, Shapiro DN, Cheng J i wsp. Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4213-8.
- Daston G, Lamar E, Olivier M i wsp. Pax3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development* 1996; 122: 1017-27.
- Ginsberg JP, Davis RJ, Bennicelli JL i wsp. Up-Regulation of MET but not Neural Cell adhesion Molecule Expression by the PAX3-FKHR Fusion Protein in Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 1998; 58: 3542-6.
- Barber TD, Barber MC, Tomescu O i wsp. Identification of target genes regulated by PAX3 and PAX3-FKHR in embryogenesis and *alveolar rhabdomyosarcoma*. *Genomics* 2002; 79: 278-84.
- Dietrich S, Abou-Rebyeh F, Brohmann H i wsp. The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* 1999; 126: 1621-9.
- Libura J, Drukala J, Majka M i wsp. CXCR4-SDF-1 signaling is active in *rhabdomyosarcoma* cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* 2002; 100: 2597-606.
- Epstein JA, Lam P, Jepeal L i wsp. Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 11719-22.
- Lam PYP, Sublett JE, Jeon IS i wsp. Oncogenic potential of the *alveolar rhabdomyosarcoma* PAX3/FKHR fusion protein. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1996; 37: 577.
- Sheidler S, Fredericks WJ, Rauscher FJ i wsp. The hybrid Pax3-FKHR fusion protein of *alveolar rhabdomyosarcoma* transforms fibroblasts in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9805-9.
- Bernasconi M, Remppis A, Fredericks WJ i wsp. Induction of apoptosis in *rhabdomyosarcoma* cells through down-regulation of PAX proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13164-9.
- Anderson MJ, Shelton GD, Cavenee WK i wsp. Embryonic expression of the tumor-associated PAX3-FKHR fusion protein interferes with the developmental functions of Pax3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1589-94.
- Collins MH, Zhao H, Womer RB i wsp. Proliferative and apoptotic differences between *alveolar rhabdomyosarcoma* subtypes: a comparative study of tumors containing PAX3-FKHR or PAX7-FKHR gene fusions. *Med Pediatr Oncol* 2001; 37: 83-9.
- Davis RJ, Barr FG. Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in *alveolar rhabdomyosarcoma*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8047-51.
- Koufos A, Hansen MF, Copeland NG i wsp. Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism. *Nature* 1985; 316: 330-4.
- Loh WE, Crable HJ, Livanos E i wsp. Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal *rhabdomyosarcoma*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1755-9.
- Tycko B. Genomic imprinting: mechanism and role in human pathology. *Am J Pathol* 1994; 144: 431-43.
- Junien C. Beckwith-Wiedemann syndrome, tumorigenesis and imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 1992; 2: 431-8.
- Weber-Hall S, Anderson J, McManus A i wsp. Gains, losses, and amplification of genomic material in *rhabdomyosarcoma* analyzed by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1996; 56: 3220-4.
- Wilke W, Maillet M, Robinson R. H-ras-1 point mutation in soft tissue sarcomas. *Mod Pathol* 1993; 6: 129-32.
- Pedone PV, Tirabosco R, Cavazzana AO i wsp. Mono- and bi-allelic expression of insulin-like growth factor II gene in human muscle tumors. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1117-21.
- Barr FG, Chatten J, D'Cruz CM i wsp. Molecular Assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas. *JAMA* 1995; 273: 553-7.

Otrzymano: 5 grudnia 2002 r.

Przyjęto do druku: 15 stycznia 2003 r.