

Določanje mutacije V600E v genu *BRAF*

P. Cerkovnik, A. Ličar in S. Novaković

Povzetek

Mutacija V600E predstavlja več kot 90 % vseh opisanih mutacij v genu *BRAF* pri različnih vrstah tumorjev. Protein, ki nastane kot produkt onkogenega *BRAF* z mutacijo V600E (*BrafV600E*), sproža nenehno signaliziranje prek signalne poti RAS-RAF-MAPK, kar povzroči številnejše delitve celice in njeno maligno transformacijo. Zato ima onkogen *BrafV600E* pomembno vlogo pri indukciji in napredovanju tumorja ter verjetno predstavlja zgodnji dogodek v procesu maligne transformacije. Po podatkih iz literature je čezmerno izražen v različnih vrstah solidnih tumorjev, kot so melanom, metastatski rak debelega črevesa in danke, papilarni rak ščitnice, rak ledvic (RCC), hepatocelularni karcinom (HCC), velikocelični rak pljuč (NSCLC) in serozni rak jajčnikov.

Na Oddelku za molekularno diagnostiko smo uvedli metodo za določanje mutacije V600E v genu *BRAF*. Metoda temelji na PCR-pomnoževanju in uporabi specifičnih sond. Izkazala se je kot primerna za rutinsko diagnostiko. V primerjavi z neposrednim sekvenciranjem, ki velja za zlati standard, sta bili njeni občutljivost in specifičnost 100-odstotni. Zaradi velike specifičnosti je zanesljiva za ločevanje med normalnim in mutiranim genotipom *BRAF* in je primerna za hitro rutinsko diagnostiko.

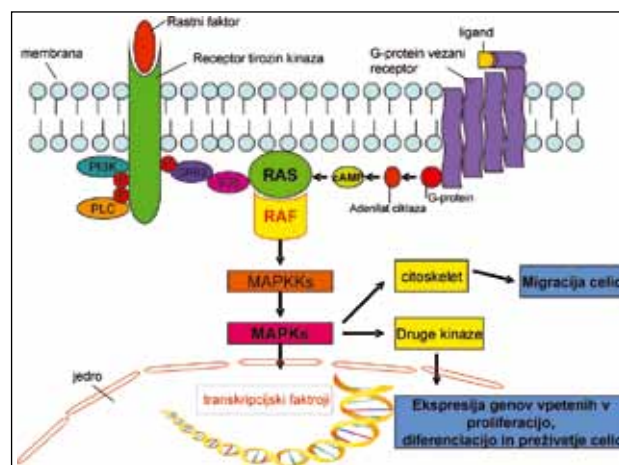
Uvod

Med molekularne mehanizme nastanka raka in njegovega napredovanja spadajo tudi spremembe (mutacije, epigenetske spremembe), ki prizadenejo gene, odgovorne za kodiranje proteinov, ki so vključeni v znotrajcelične signalne poti. Serin/treonin kinaze RAF so ključne molekule znotraj signalne poti RAS-RAF-MAPK in so pomembne pri prenosu signalov za rastne in za mitogene dejavnike (slika 1). Prek teh poti se uravnavajo osnovni celični procesi, kot so delitev, diferenciacija in preživetje celic, adhezija in migracija celic.

Geni, ki kodirajo serin/treonin kinaze RAF, spadajo med protoonkogene. Mutacije v njih vodijo v nastanek onkogenov, kar povzroči nenadzorovano prepisovanje gena in nastajanje njegovega produkta. V procesu maligne transformacije take mutacije povzročijo povečano delitev tumorskih celic in posredno vplivajo na prilagajanje tumorskih celic in njihovo boljše preživetje ter metastaziranje. Ker se onkogeni dominantno izražajo na celični ravni, za onkogeno delovanje proteina zadošča že samo en mutiran alel. Mutacije v protoonkogenih so večinoma povezane s sporadičnimi oblikami raka. Pri ljudeh so znani 3 različni geni RAF: *ARAF*, *BRAF* in *CRAF* (ali *RAF-1*). Somatske mutacije so najpogostejše v genu *BRAF* (v približno 7 % poznanih rakov), medtem ko so mutacije v genu *CRAF* redke. V genu *ARAF* ni opisana še nobena mutacija.

Najpogostejša mutacija v genu *BRAF* je V600E; predstavlja več kot 90 % vseh opisanih mutacij v tem genu pri različnih vrstah

tumorjev. Mutacija V600E je posledica zamenjave enega nukleotida, in sicer timina v adenin na mestu 1799 v eksonu 15 (c.1799T > A). Z mutacijo nastane protein, in sicer onkogen *BrafV600E*. Spremenjeni onkogen sproža nenehno (stalno) signaliziranje prek signalne poti RAS-RAF-MAPK, kar povzroči povečano delitev celic in njihovo maligno transformacijo. Zato ima pomembno vlogo pri indukciji in napredovanju tumorja in verjetno predstavlja zgodnji dogodek v procesu maligne transformacije.



Slika 1. Signalna pot serin/treonin kinaze *BRAF*.

BRAF je del signalne poti RAS-RAF-MAPK (z mitogenom aktivirane proteinske kinaze). Vezava različnih rastnih dejavnikov (epidermalnega rastnega dejavnika – EGF, transformirajočega rastnega dejavnika alfa – TGF- α , vaskularnega endotelnega rastnega dejavnika – VEGF) na ustrezne receptorje na celični membrani (npr. EGFR, VEGFR-2/-3) ali vezava ligandov na G-proteinske receptorje sproži aktivacijo RAS (GTP-vezavni protein) prek adaptorskih proteinov GRB2 (z receptorjem za rastne dejavnike vezani protein 2) in SOS (RAS-gvanin izmenjevalni faktor) (levo na sliki) ali s cAMP (desno na sliki). Aktivirani RAS se nato veže na *BRAF*, ki se konformacijsko spremeni in s tem aktivira. Aktivirani *BRAF* fosforilira in s tem aktivira različne MAPK-kinaze. Kinaze nato fosforilirajo in uravnavajo aktivacijo različnih substratov, kot so transkripcijski faktorji, komponente citoskeleta in druge kinaze. Aktivacija te signalne poti vodi v izražanje genov, vpletenih v delitev in diferenciacijo celic.

Po podatkih iz literature je onkogen *BrafV600E* čezmerno izražen v različnih vrstah solidnih tumorjev, kot so melanom (44–60 %), metastatski rak debelega črevesa in danke (5–20 %), papilarni rak ščitnice (29–83 %), rak ledvic (RCC), hepatocelularni karcinom (HCC) in velikocelični rak pljuč (NSCLC) (3 %) ter serozni rak jajčnikov (v 30 %).

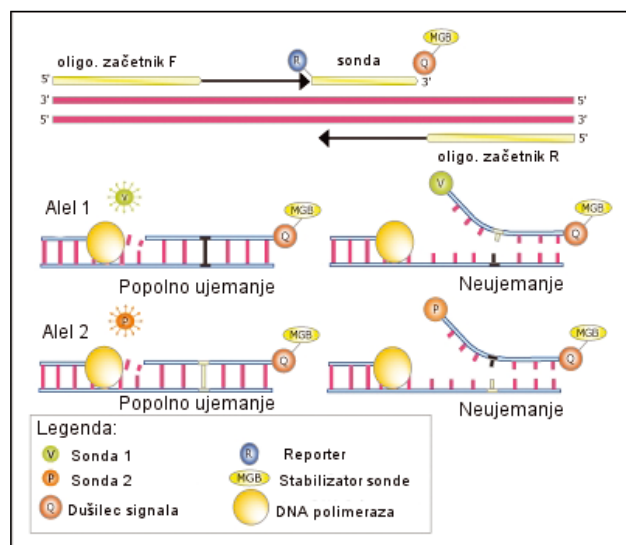
Metode za določanje mutacije V600E v genu *BRAF* so različne. Najpogosteje se uporablja neposredno sekveniranje, ki velja za zlati standard določanja mutacij. Ta metoda je časovno zelo zamudna in zato neprimerna za hitro rutinsko diagnostiko. Na Oddelku za molekularno diagnostiko smo se zato odločili, da za določanje mutacije V600E v genu *BRAF* uvedemo metodo, ki temelji na PCR-pomnožitvi in uporabi specifičnih sond ter odkrivanju z aparatom LyghtCycler480. Metoda predstavlja alternativo neposrednemu sekveniranju, saj v preiskovanem vzorcu razlikuje med t. i. mutiranim in normalnim genotipom. Je hitrejša in tudi cenejša.

Opis metode za določanje mutacije V600E v genu *BRAF*

Testna skupina vzorcev

Za uvedbo metode določanja mutacije V600E v genu *BRAF* smo izbrali tumorje bolnikov z rakom ščitnice in tumorje bolnikov z metastatskim rakom debelega črevesa in danke. Testna skupina je zajemala 31 vzorcev tumorskega tkiva bolnikov z rakom ščitnice, 30 vzorcev normalnega tkiva istih bolnikov in 239 vzorcev tumorskega tkiva bolnikov z metastatskim rakom debelega črevesa in danke.

Najprej smo parafinske rezine, v katere je bilo vloženo tkivo, deparafinizirali, potem pa smo s kompletom HighPure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija) izolirali genomsko DNK. Uspešnost izolacije in količino DNK smo preverili s spektrofotometrom NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, ZDA). Izolirano DNK smo do izvedbe testa hranili pri +4 °C.



Slika 2. Princip delovanja specifičnih sond TaqMan.

Specifične oligonukleotidne sonde so označene z različnimi fluorescentnimi barvili (fluorofori) na 3'-koncu in z dušilec signala (quencher) na 5'-koncu (na sliki označeni z V in P). Dušilec signala (quencher) prek prenosa resonančne energije prepreči (zaduši) signal fluorescence fluorofora, kadar sta obe molekuli dovolj blizu druga drugi. Med potekom PCR se sonde v fazi naleganja vežejo na ustrezna specifična zaporedja v DNK. V naslednji fazi PCR – t. i. fazi podaljševanja – pa encim DNK-polimeraza s svojo 5'- do 3'-eksonukleazno aktivnostjo razgradi popolnoma prilegajoče se sonde in s tem loči fluorofor od dušilca signala. To povzroči porast intenzitete fluorescence za to fluorescentno barvilo. Nepopolno prilegajoče se sonde DNK-polimeraza ne razgradi, zato ni fluorescence.

Opis metode

Za določanje mutacije V600E v genu *BRAF* smo uporabili za alel specifični PCR (verižno reakcijo s polimerazo). Metoda je primerna za določanje znanih in dobro opredeljenih sprememb v zaporedju DNK in temelji na uporabi specifičnih sond, ki se vežejo na nukleotidno zaporedje DNK v območju, kjer pričakujemo mutacijo. V primeru mutacije V600E v genu *BRAF* gre za spremembo nukleotida T v nukleotid A na mestu 1799. Ker je ta mutacija vedno heterozigotna, bosta v vzorcu z mutacijo oba alela – mutirani in normalni.

Specifične oligonukleotidne sonde so označene z različnimi fluorescentnimi barvili (fluorofori) na 3'-koncu in z dušilec signala na 5'-koncu. Dušilec signala (quencher) prek prenosa resonančne energije prepreči (zaduši) signal fluorescence fluorofora, kadar sta obe molekuli dovolj blizu druga drugi. Med PCR se sonde v fazi naleganja vežejo na ustrezna specifična zaporedja v DNK. V naslednji fazi PCR – t. i. fazi podaljševanja – pa encim DNK-polimeraza s svojo 5'- do 3'-eksonukleazno aktivnostjo razgradi popolnoma prilegajoče se sonde in s tem fluorofor loči od dušilca signala. Zaradi tega se poveča intenziteta fluorescence za neko fluorescentno barvilo. Nepopolno prilegajoče se sonde DNK-polimeraza ne razgradi, zato ni fluorescence (slika 2).

V naši metodi smo uporabili sonde TaqMan MGB proizvajalca Applied Biosystems (Foster City, ZDA). Sekvence sond in oligonukleotidnih začetnikov smo povzeli po literaturi. Na sondo, ki se veže prek mesta z mutiranim alelom, smo vezali barvilo FAM (rdeči signal), na drugo sondo, ki zazna normalni (wild-type) alel, pa barvilo VIC (zeleni signal). Po poteku PCR smo glede na določeno fluorescence v posameznem vzorcu lahko ločili normalen genotip (samo VIC-signal oz. alel T) od mutiranega genotipa (oba signala oz. alela: signal FAM oz. alel A in signal VIC oz. alel T – prisotnost mutacije V600E v vzorcu DNK) (slika 3).

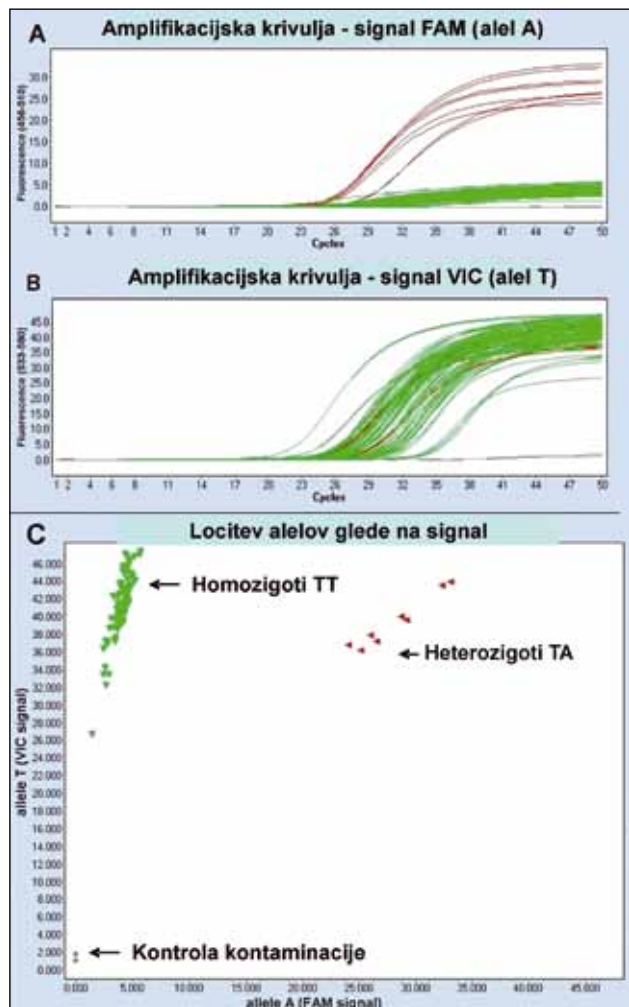
Izvedba testa za določanje mutacije V600E v genu *BRAF*

V vsako reakcijsko mešanico s končnim volumnom 20 µl smo dodali 10 µl LyghtCycler480 Probes Master Mix (Roche), 2 oligonukleotidna začetnika (»forward« in »reverse«) s končno koncentracijo 0,9 µM, obe sondi TaqMan MGB (Applied Biosystems) s končno koncentracijo 0,15 µM in 5 µl vzorčne DNK. Vsak vzorec smo analizirali v dvojniku. Vedno smo sočasno analizirali tudi pozitivno kontrolo (DNK, izolirano iz celične linije HT-29, ki ima heterozigotno mutacijo V600E), negativno kontrolo (vzorec DNK brez mutacije) in kontrolo kontaminacije (vodno kontrolo). Pomnožitev PCR-produktov in odkrivanje fluorescence smo izvedli na aparatu LyghtCycler480 (Roche). Analizo fluorescence v posameznem vzorcu smo izvedli z računalniškim programom LyghtCycler480 End-Point Genotyping, ki omogoča razlikovanje med normalnim in mutiranim genotipom. Rezultati so prikazani v obliki razpršenega diagrama (slika 3). Vedno smo preverili tudi amplifikacijske krivulje za posamezni analizirani vzorec.

Potrditev rezultatov z metodo neposrednega sekveniranja

Ker metoda neposrednega sekveniranja velja za zlati standard pri določanju mutacij v preiskovanem vzorcu, smo 20 izbranih vzorcev sekvenirali, da bi potrdili rezultate, dobljene z metodo end-point genotyping. Metodo smo izvedli po standardnem postopku. Vzorec DNK smo pomnožili s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki. Za sekvenčno reakcijo smo uporabili kit ABI PRISM Big Dye Terminator v1.1 (Applied

Biosystems), ki poleg navadnih nukleotidov vsebuje različno fluorescentno označene dideoksinukleotide. Posamezne vzorce smo analizirali na sekvenatorju ABI 310 (Applied Biosystems). Dobljeni kromatogram (izpis sekvence) smo primerjali z originalno sekvenco iz baze podatkov GeneBank (slika 4).



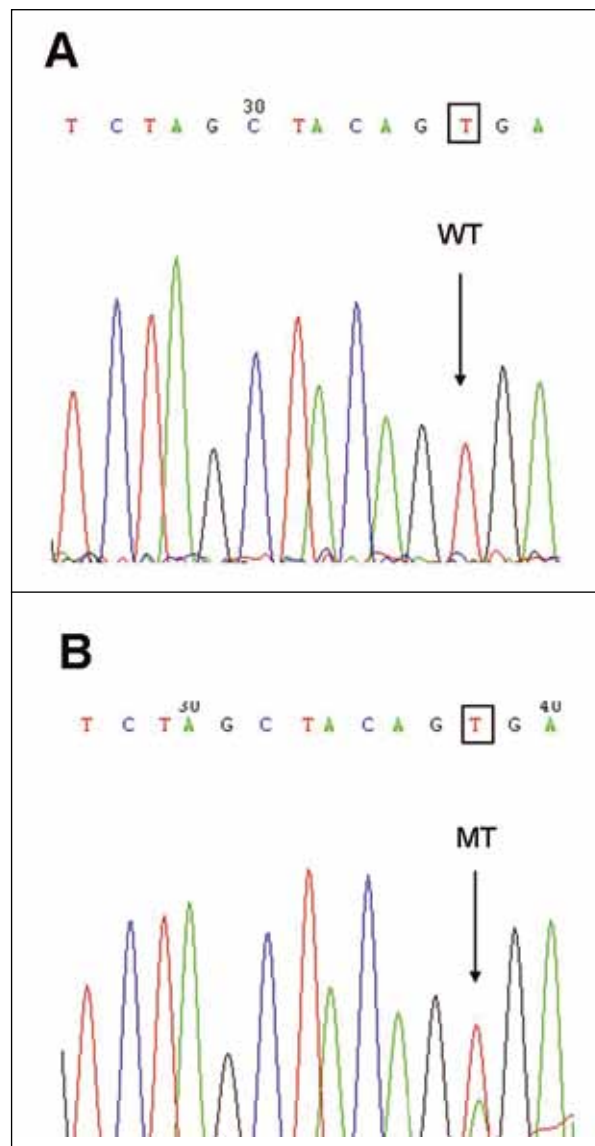
Slika 3. Prikaz rezultatov za alel specifičnega PCR in rezultatov analize z metodo end-point genotyping na aparatu Lyght-Cycler480.

A: Prikaz amplifikacijskih krivulj vzorcev z alelom A (signal FAM). B: Prikaz amplifikacijskih krivulj vzorcev z alelom T (signal VIC). C: Razpršeni diagram, kjer vidimo ločitev alelov glede na signal. V primeru normalnega (wild-type) Braf bomo v vzorcu zaznali samo signal VIC oz. alel T (vzorec brez mutacije V600E) – homozigoti TT. V primeru mutacije V600E pa bomo poleg signala VIC zaznali tudi signal FAM oz. alel A – prisotna sta oba alela – heterozigoti TA.

Rezultati

Za uvedbo metode določanja mutacije V600E v genu *BRAF* smo izbrali tumorje bolnikov z rakom ščitnice in tumorje bolnikov z metastatskim rakom debelega črevesa in danke. Mutacijo V600E smo dokazali v 11 od 31 (35,4 %) vzorcev tumorskega tkiva bolnikov z rakom ščitnice (slika 5). Rezultat je v skladu z objavljenimi podatki, saj se omenjena mutacija pojavi v 29 % do 83 % teh tumorjev. V normalnem tkivu

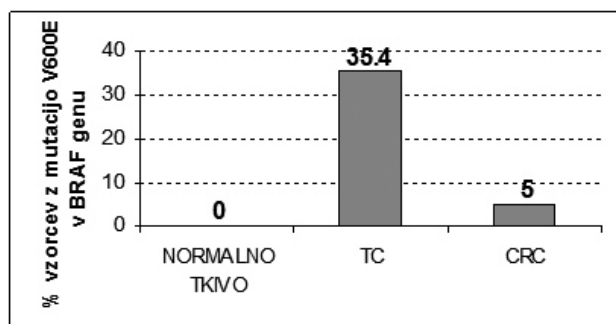
istih bolnikov mutacije V600E ni bilo. Pri tumorjih bolnikov z metastatskim rakom debelega črevesa in danke smo mutacijo V600E v genu *BRAF* dokazali v 12 od 239 (5 %) testiranih vzorcev (slika 5). Tudi ta rezultat je v skladu s podatki iz literature, kjer različni avtorji navajajo, da se mutacija V600E v genu *BRAF* pri bolnikih z metastatskim rakom debelega črevesa in danke pojavi v 5 % do 20 % primerov.



Slika 4. Sekveniranje gena BRAF.

Del izpisa sekvence eksona 15 gena *BRAF*. A: Vzorec brez mutacije (homozigot T1799T); WT – normalen alel. B: Vzorec z mutacijo (heterozigot T1799A); MT – mutiran alel.

Metoda za določanje mutacije V600E v genu *BRAF*, ki temelji na uporabi specifičnih sond, se je izkazala kot primerna metoda za rutinsko diagnostiko. V primerjavi z neposrednim sekveniranjem, ki velja za zlati standard, sta bili njeni občutljivost in specifičnost 100-odstotni. Sklenemo lahko, da je metoda za alel specifičnega PCR (uporaba specifičnih sond) specifična in tudi zanesljiva za ločevanje med normalnim in mutiranim genotipom, zato je primerna za hitro rutinsko diagnostiko.



Slika 5. Prikaz rezultatov določanja mutacije V600E v genu BRAF pri bolnikih z rakom ščitnice (TC) in pri bolnikih z metastatskim rakom debelega črevesa in danke (CRC). Prikazani so tudi rezultati testiranja normalnega tkiva bolnikov z rakom ščitnice.

Uporabna vrednost določanja mutacije V600E v genu BRAF

Določanje mutacije V600E v genu *BRAF* je lahko prognozični dejavnik ali pa molekularni napovedni marker odgovora na zdravljenje. Na splošno velja, da je ta mutacija povezana z napredovanjem tumorja (povečana proliferacija tumorskih celic) in z zmanjšanim odgovorom tumorja na kemoterapijo.

Papilarni rak ščitnice. Mutacija V600E v genu *BRAF* je značilna za agresivnejši tip tumorjev in za tumorje, ki se ne odzivajo na zdravljenje z radiojodom. V nasprotju s translokacijo RET/PTC se pojavlja pri anaplastičnem tipu raka ščitnice, kar kaže, da je vpletena v napredovanje papilarnega raka ščitnice v slabo diferencirane ali nediferencirane fenotipe. V zadnjem času se uporabnost določanja te mutacije kaže pri analizi pred operacijo odvzetih aspiratov (FNA) ščitničnih nodulov. Analiza se je kot uporabna izkazala predvsem pri citološko težko opredeljivih vzorcih (po podatkih iz literature je takih vzorcev približno 30 %).

Metastatski rak debelega črevesa in danke. Nedavno objavljene retrospektivne študije tumorjev bolnikov, ki so prejeli panitumumab ali cetuksimab, so pokazale, da tumorji z mutacijo V600E v genu *BRAF* niso odgovorili na zdravljenje z inhibitorji EGFR. Bolniki so imeli značilno krajši interval brez napredovanja bolezni in krajše preživetje kot bolniki brez te mutacije. Pomembno je omeniti, da se po znanih podatkih mutacije v genu *KRAS* ne pojavljajo sočasno z mutacijami v genu *BRAF*, zato je smiselno testiranje vzorcev z normalnim genotipom *KRAS*. Sočasna uporaba multikinaznega inhibitorja (npr. sorafeniba) naj bi spremenila občutljivost tumorskih celic za delovanje inhibitorjev EGFR v tumorjih z mutacijo V600E v genu *BRAF*. V teku so klinične študije, kjer se za zdravljenje

metastatskega raka debelega črevesa in danke uporabljajo kombinacije sorafeniba in cetuksimaba.

Melanom. Pri nastanku melanoma je pojav mutacije v genu *BRAF* verjetno eden zgodnjih dogodkov pri procesu tumorogeneze. Mutacija V600E je potrebna za vzdrževanje in napredovanje tumorja in je najpogostejša opisana genska sprememba pri melanomu (povprečno 44 % tumorjev ima v genu *BRAF* mutacijo V600E). Pri bolnikih z melanomom je mutirani *BRAF* pomembna tarča pri zdravljenju tumorjev. Raziskave gredo predvsem v razvoj specifičnih oz. selektivnih inhibitorjev mutiranega *BRAF* (primer je PLX4720, ki se trenutno testira v klinični raziskavi faze I).

Sklep

Na Oddelku za molekularno diagnostiko smo uspešno uvedli metodo za določanje mutacije V600E v genu *BRAF*. Metoda je zanesljiva, hitra in primerna za rutinsko diagnostiko.

Viri

1. Benlloch S, Paya A, Alenda C et al. Detection of BRAF V600E Mutation in Colorectal Cancer. *JMD* 2006; 8(5): 540–543.
2. Dhomen N, Marais R. BRAF Signaling and Targeted Therapies in Melanoma. *Hematol Oncol Clin N Am* 2009; 23: 529–545.
3. Collob JA, Wilhelm S, Carter C et al. Role of Raf Kinase in Cancer: Therapeutic Potential of Targeting the Raf/MEK/ERK Signal Transduction Pathway. *Semin Oncol* 2006; 392–406.
4. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F et al. Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(19): 1308–1324.
5. French JA, Sargent DJ, Burgart LJ et al. Prognostic Significance of Defective Mismatch Repair and BRAF V600E in Patients with Colon Cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(11): 3408–3415.
6. Nucera C, Goldfarb M, Hodin R et al. Role of B-Raf V600E in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against B-Raf V600E. *Biochimica Biophysica Acta* 2009; 1795: 152–161.
7. Costa AM, Herrero A, Fresno MF et al. BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrin* 2008; 68: 618–634.
8. Frasca F, Nucera C, Pellegriti G et al. BRAF V600E mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2008; 15: 191–205.
9. Novaković S. Molekularni mehanizmi nastanka raka – kancerogeneza. *Onkologija* 2009; Mladinska knjiga, Ljubljana.