

Genetikai eltérések karakterizálása *BRAF*- és *NRAS*-mutációt hordozó humán primer melanómákban

Lázár Viktória

Debreceni Egyetem, Egészségtudományok Doktori Iskola, Debrecen

A malignus melanóma a legrosszabb indulatú bőrdaganat, mely fokozott metasztázisképzéssel és gyógyszer-rezisztenciával jellemezhető. Kialakulásában és progressziójában számos genomeltérést azonosítottak. Ezek közül kiemelkedő jelentőségű a MAP-kináz jelátviteli útvonal konstitutív aktivációját eredményező *NRAS* és *BRAF* onkogének mutációja, melyek a tumorigenezis korai fázisában jelennek meg. Ezekhez a mutációkhoz a daganatprogresszió során újabb genomikai eltérések társulnak, melyek együttesen eredményezik az agresszív fenotípust. Vizsgálataink során elsődleges célunk volt a *BRAF*- és *NRAS*-mutációt hordozó primer melanómákat jellemző molekuláris eltérések feltérképezése. A melanómagenom genetikai alterációinak analizésére array komparatív genomhibridizációt (array-CGH) alkalmaztunk. Eredményeink szerint a *BRAF*-mutációt hordozó daganatok leggyakoribb eltérései az 1-es kromoszóma hosszú karja (1q25-1q25), valamint a teljes 7-es kromoszóma DNS-többlete, és a 10-es kromoszóma hosszú karjának (10q23-10q26) DNS-hiánya voltak. Az *NRAS*-mutációt hordozó daganatokat a 11q22.3-11q25 régió gyakori deléciója jellemezte. Eddigi adataink alapján feltételezhetjük, hogy annak ellenére, hogy az *NRAS* és a *BRAF* onkogének aktivációs mutációi ugyanazt a szignáltranszdukciós útvonalat aktiválják, a primer melanómák tumorigenezise során eltérő genetikai eltéréseket hordozó molekulákkal kooperálnak. Eredményeink elemzése során a különböző szignáltranszdukciós útvonalak részletesebb vizsgálatával felderítettük, hogy a *BRAF*-mutációt hordozó daganatokban leggyakrabban a MAPK-JAK jelátviteli útvonalak közötti interakcióban részt vevő fehérjék génjei sérülnek, majd különböző adatbányászati algoritmusok segítségével további *BRAF*-mutációval összefüggésbe hozható génelteréseket azonosítottunk a MAPK-útvonalból. Vizsgálataink másik szakaszában részletesen tanulmányoztuk a 11q13 amplifikációs klaszter génelteréseit, melyet array-CGH vizsgálataink során a melanóma egyik leggyakoribb genetikai eltéréseként azonosítottunk. Eredményeink arra utalnak, hogy a 11q13 régióban lokalizálódó onkogének koamplifikációja, a *BRAF*- vagy *NRAS*-mutáció *CCND1*-amplifikációval társulva gyakrabban jellemző rossz prognózisú daganatokra, mint e genetikai eltérések jelenléte külön-külön. Magyar Onkológia 57:96-99, 2013

Kulcsszavak: primer melanóma, komparatív genomiális hibridizáció, *BRAF*-mutáció, *NRAS*-mutáció, 11q13 kromoszómarégió, *CCND1*-amplifikáció, jelátviteli útvonalak

Human malignant melanoma is one of the most aggressive forms of skin cancer with an exceptionally bad prognosis. Melanoma often displays constitutively activated MAPK pathway through *BRAF* or *NRAS* mutations. It is also known that these mutations are almost never simultaneously present and that they appear at early stages and preserved throughout tumor progression, although it is proved that these alterations alone are insufficient to cause tumor progression. Therefore the first aim of our study was to evaluate those distinct genetic alterations which can properly differentiate the three important molecular subtypes of primary melanomas with a) *BRAF*, b) *NRAS* mutation and c) WT (wild type for both loci). High-resolution array comparative genomic hybridization (array CGH) was used to assess genome-wide analysis of DNA copy number alterations. Primary melanomas with *BRAF* mutation more frequently exhibited losses on 10q23-10q26 and gains on chromosome 7 and 1q23-1q25 compared to melanomas with *NRAS* mutation. Loss on the 11q23-11q25 sequence was found mainly in conjunction with *NRAS* mutation. Based on these results, we proved the existence of marked differences in the genetic pattern of the *BRAF* and *NRAS* mutated melanoma subgroups, which might suggest that these mutations contribute

Levelezési cím: Lázár Viktória, Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Népegészségügyi Kar,
Megelőző Orvostani Intézet, 4028 Debrecen, Kassai út 26. E-mail: vlazar@brc.hu

Közlésre érkezett: 2013. május 1. • Elfogadva: 2013. május 20.

to the development of malignant melanoma in conjunction with distinct cooperating oncogenic events. In general, it is an interesting phenomenon suggesting that these mutations provide probably the 'guiding force' for these tumors and it also suggests that there are alternative genetic pathways to melanoma. These additional oncogenic events which are associated with BRAF or NRAS mutations can provide rational additional targets for a combination therapy with kinase inhibitors. In this study we also investigated the specific dynamic activities among different signalling pathways highlighting the frequent alterations of genes involved in the signalling interactions between the MAPK-JAK pathways in BRAF mutated melanomas. Using a data mining algorithm we also found a gene alteration signature in the MAPK pathway that was commonly related to the presence of BRAF mutation in our melanoma cohorts. The second aim of this study was to develop an accurate Q-PCR method for determining the co-amplification pattern of six candidate genes that reside in the 11q13 amplicon core. We found that co-amplification of these candidate genes or the CCND1 amplification along with either BRAF or NRAS mutations might be more important for prognosis than the presence of these alterations alone.

Lázár V. Characterization of genetic alterations in primary human melanomas carrying *BRAF* or *NRAS* mutation. Hungarian Oncology 57:96-99, 2013

Keywords: primary melanoma, array comparative genomic hybridization, *BRAF* mutation, *NRAS* mutation, 11q13 chromosome region, *CCND1* amplification, signalling pathways

BEVEZETÉS

A bőrdaganatok legagresszívabb formája a melanóma malignum, incidenciája világszerte folyamatosan emelkedik. Áttétképzési hajlama rendkívül gyors, gyógyszer-rezisztenciája fokozott, így korai felismerése és pontos diagnózisa a betegség kimenetele szempontjából rendkívüli jelentőséggel bír. Kialakulásában a környezeti faktorok közül kiemelten fontos szerepet játszik az ultraibolya sugárzás, mely súlyos DNS-károsító, ún. genotoxikus mellékhatással is rendelkezik. E hatását mind közvetlenül, pirimidindimerek kialakításával, mind közvetett mechanizmusokkal (pl. oxidatív stressz által mediált mutációk indukálásával) kifejezheti.

A melanóma progressziója során a tumorgenom instabilitásának köszönhetően különböző genetikai eltérések sorozatos akkumulációja következik be, mely során sérülnek a genom integritását szabályozó molekuláris mechanizmusok, a sejtek normális működését szabályozó jelátviteli folyamatok. Ismert ugyan, hogy a tumorsejtek evolúciója diverz, megjósolhatatlan és sztochasztikus folyamat, ugyanakkor számos alkalommal bizonyítást nyert, hogy a tumorsejtek osztódása során azoknak a rosszindulatú klónoknak a pozitív szelekciója valósul meg, melyek a már felhalmozott genetikai és epigenetikai eltérések által elkerülhetik az immunrendszer védelmi vonalait és képessé válnak áttét kialakítására távoli szövetekben. A humán genom szekvenálása, a microarray technológia és bioinformatika napjainkban történő ugrásszerű fejlődése lehetővé tette egy új tudományág, a genomléptékű molekuláris genetika létrejöttét. A genomika forradalmian új eredményeket hozott, új módszertani megközelítések alkalmazásával, integrált genomikai analízisekkel lehetővé vált a betegségek kialakul-

lásában és progressziójában szerepet játszó specifikus eltérések, molekuláris célpontok azonosítása.

Számos kutatás foglalkozott a primer melanómák tumorigenezisének korai fázisában megjelenő *BRAF* és *NRAS* onkogének aktivációs mutációjának vizsgálatával, annak tanulmányozásával, hogy ezeknek az onkogénalterációknak milyen szerepe van a melanóma progressziója során. Mindkét onkogén a MAP-kináz foszforilációs kaszkádszisztéma tagja, aktivációs mutációik nagy jelentőséggel bírnak a melanóma progressziójában, azonban még továbbra is nyitott az a kérdés, hogy milyen genomeltérésekkel vesznek részt a daganatkialakulás és -progresszió folyamatában. A mutációk jelenléte vagy hiánya alapján három melanóma-alcsoport különíthető el: *BRAF*-mutációt hordozó, *NRAS*-mutációt hordozó, illetve mindkét mutációra vad allélt hordozó melanómák alcsoportjai. Irodalmi adatok alapján a két aktivációs mutáció nagyon ritkán fordul elő egyazon tumorban. Még pontosan nem ismert ennek a jelenségnek a háttere, de az egyik legvalószínűbb oka, hogy az együttes mutációnak nincs a tumorsejtek proliferációjára, túlélésére további hatása. A *BRAF*- és az *NRAS*-mutációk közül a *BRAF*-mutáns fehérjét célzó terápia ígéretes klinikai eredményeket szolgáltatott, jelen pillanatban is számos célzott kutatás folyik a raf-kináz fehérje gátlását eredményező vegyületek klinikai tesztelésére. A biztató eredmények ellenére is igen gyakran lép fel a kinázgátlókkal szemben rezisztencia, ami azt is jelentheti, hogy több célpont egyidejű gátlása szükséges a daganat progressziójának megállítására.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A *BRAF*- vagy *NRAS*-mutációt hordozó, illetve vad *BRAF*/*NRAS*-genotípusú humán primer melanómák jellegzetes molekuláris eltéréseinek megismerése. Célunk volt olyan

genetikai eltérések azonosítása, melyek akár új specifikus terápiás targetet is szolgáltathatnak, a mutációk hatásának gyengítését célzó kezelések mellett.

2. Adatbányászati algoritmusok („data mining algorithm”) alkalmazásával annak felderítése, hogy a két onkogén mutációja milyen génkópiaszám-eltérésekkel társul. Melyek azok a molekuláris alterációk, amelyek tovább módosíthatják a MAPK jelátviteli útvonal működését.
3. Az eltérő genotípusú melanómákban a tumorprogresszióban szerepet játszó jelátviteli útvonalak közötti interakcióban részt vevő gének azonosítása.
4. A 11q13 amplifikációs klaszterben lokalizálódó onkogének koamplifikációs mintázatának felderítése, a melanómaprogresszióban betöltött szerepük részletes vizsgálata primer humán melanómákban.

MÓDSZEREK

A humán melanómaszövetek a DE OEC Bőrgyógyászati Klinikáról származtak, ahol előzetes szövettani analízisüket is elvégezték. A *BRAF* kodon 600 és *NRAS* kodon 61 mutációinak genotipizálását LightCycler real time PCR rendszerben végeztük, valós idejű polimeráz-láncreakciót (RT-PCR) követő olvadáspont-analízissel, fluoreszcensen jelölt oligonukleotid próbákkal. A mutációt hordozó minták pontos genotípusát szekvenálással állapítottuk meg. A teljes genom eltéréseinek analizésére array-alapú komparatív genomiális hibridizációt (array-CGH) alkalmaztunk, melynek segítségével a tumorsejtgenomban előforduló ismeretlen génamplifikációs és gendelációs események detektálhatóak. Az array-CGH analízis a teljes humán genomot lefedő 2464 BAC (mesterséges bakteriális kromoszóma) klónt tartalmazó array chip lemezen történt (HumArray3.1 chip). Az array-CGH-adatok feldolgozását követően a transzformált adatokat a nyílt forráskódú CGH-Explorer 3.2, cluster 3.0 és az R statisztikai programmal elemeztük tovább. A jelátviteli útvonalakhoz köthető eltérések elemzése során a különböző útvonalak adatait a SignalLink adatbázisból (<http://signalink.org/>) töltöttük le, majd ezeknek a géneknek a kópiaszám-eltéréseit a legközelebbi BAC klón (<2 MB) segítségével becsültük meg. A 11q13 lókuszon onkogénjei koamplifikációs mintázatának feltérképezésére SYBR-Green festésen alapuló kvantitatív RT-PCR módszert dolgoztunk ki.

EREDMÉNYEK

A *BRAF* 600-as kodon a primer melanómák 37%-ában, az *NRAS* 61-es kodon a szövetek 19%-ában hordozott mutációt. A vizsgált primer melanómák 56%-a hordozott *BRAF*- vagy *NRAS*-mutációt, ugyanakkor a két mutáció együttes előfordulására egyetlen mintában sem volt példa. Négy esetben volt lehetőségünk a primer tumor és az ugyanabból a be-

tegből származó metasztázis mutációs genotípusának egyidejű meghatározására. Megfigyeltük, hogy a *BRAF* vagy *NRAS* aktivációs mutációját hordozó primer daganatok metasztázisaiban is előfordulnak a mutációk. Szignifikánsan gyakrabban figyeltünk meg *NRAS*-mutációt azokban a daganatokban, melyek szövettanilag igazoltan krónikusan napnak kitett testfelületekről származtak. Ezt az eredményt magyarázhatja, hogy az *NRAS* 61-es kodonjában egy TT szekvencia található, ahol az UV-sugárzás indukálta cikloaddíció nagyobb valószínűséggel történik meg.

Primer melanómák génkópiaszám-eltéréseinek genom-szintű analízise során megfigyeltük, hogy a *BRAF*-mutációs csoportba tartozó daganatokban a 7-es kromoszóma DNS-többlete, továbbá a 10-es kromoszóma DNS-hiánya dominál, mely minden esetben érinti a *BRAF* (7q34) onko- és *PTEN* (10q23.3) tumorszuppresszor gén kromoszomális lókuszt is. A 10q kromoszóma hierarchikus klaszteranalízise ugyancsak rávilágított arra, hogy az itt megfigyelhető nagymértékű deléciós mintázat főleg az előrehaladott stádiumú, illetve *BRAF*-mutációt hordozó daganatokra jellemző. A leggyakrabban amplifikációt a 7q36.3 régióban figyelhetjük meg, ami ugyancsak a *BRAF*-mutációt hordozó melanómákra jellemző. Ezen a DNS-szakaszon lokalizálódik a *PTPRN2* onkogén, melynek szerepét kiterjedten vizsgálták emlődaganatokban is, más típusú daganatok esetében a géntermék gátlásával sikeresen tudták csökkenteni az áttétek számát. *NRAS*-mutációkat hordozó primer tumorokban a 11q23.3-11q25 lókuszon deléciója volt a leggyakrabban megfigyelt eltérés. Ezen a lókuszon található az egyik ismert tumorszuppresszor gén, az *OPCML*, mely a receptor-tirozinkinázok negatív regulációján át fejt ki hatását. A másik, *NRAS*-mutációval összefüggésbe hozható gyakori deléciót a 17p13.3 kromoszomális régióban figyeltük meg, ezen a szakaszon eddig két új tumorszuppresszor gént azonosítottak (*HIC1* és *OVCA1*), valamint megfigyelték, hogy ez a lókuszon hemizigóta állapotban sejtciklus-deregulációt vált ki és tumorigenezist indukál. Mind a *BRAF*-, mind az *NRAS*-mutációt hordozó melanómák gyakran hordoztak amplifikációt a 6p22.3 (*E2F3*) és deléciót a 9p21 (*CDKN2A*) kromoszomális régiókban. A két onkogén mutációját nem hordozó vad típusú mintákban gyakori DNS-többletet találtunk a 17q24-17q25 kromoszomális szakaszon és DNS-hiányt a 4q23-q25 régióban.

A MAPK jelátviteli útvonal molekuláinak egy adatbányászati algoritmussal (Random Forest) történő analízise során *BRAF*-mutációval összefüggésbe hozható deléciós mintázatot ismertünk fel, mely magába foglalta a *PTEN*, *JNK1* és *HVH-3* ismert tumorszuppresszor gének együttes delécióját. A *PTEN* egy jól ismert tumorszuppresszor gén melanómákban, ellenben a *HVH3* és *JNK1* gének melanómában betöltött szerepéről igen kevés információ áll még rendelkezésre. Az irodalomban fellelhető legújabb eredmények alapján a *HVH3*

génről ismert, hogy az *ERK2* gén inaktivációjáért és specifikus lokalizációjáért felelős, melyet célzottan támadva már sikerült a daganatok növekedését gátolni. A *JNK1* null mutáns transzformált egerekben pedig spontán belső szervi daganatok kialakulását detektálták.

A jelátviteli útvonalak közötti interakciók eltéréseinek vizsgálata során megfigyeltük, hogy a *BRAF*-mutációt hordozó daganatokban a MAPK-JAK jelátviteli útvonalak közötti jelátviteli interakciók gyakrabban sérültek, mint a vad típusú *BRAF* gént tartalmazó melanómákban. Hasonló mintázatot találtunk a MAPK-IGF és JAK-IGF útvonalak között is. Továbbá rávilágítottunk a Hedgehog (HH) útvonal alterációinak jelentőségére is a *BRAF*-mutáns melanómákban.

Munkánk második részében a 11q13 régióban lokalizálódó onkogének koamplifikációs mintázatát vizsgáltuk részletesebben, mivel ennek a génszakasznak a gyakori amplifikációját a primer melanóma progressziójával összefüggésben már több független vizsgálat (beleértve saját munkánkat is) kimutatta. A génklaszter feltételezett target génje a *CCND1*, melynek nagymértékű expresszióját több szolid tumorban (emlő-, fej-nyaki, valamint hólyagdaganatok) is megfigyelték. A *CCND1* onkogén mellett azonban számos más onkogén található ebben az amplikonban, mint a *TAOS1*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF19* és *EMS1* gének, melyek szerepét még nem vizsgálták részletesen primer melanómákban. Eredményeink szerint a vizsgált primer melanómák 32%-a *CCND1*-génamplifikációval jellemezhető. Négy esetben ugyanabból a betegből származó primer daganat és metasztázis profilját is össze tudtuk hasonlítani. Mind a négy primer melanómában a *CCND1* amplifikált volt, ugyanakkor csak egy metasztázismintában volt a *CCND1* onkogén amplifikálva. A *CCND1*-amplifikációt hordozó mintákban tovább vizsgáltuk a 11q13 amplikon öt potenciális onkogénjének (*TAOS1*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF19* és *EMS1*) eltéréseit. Megállapítottuk, hogy a minták 18%-ában ez az öt onkogén együttesen amplifikálódik. A daganatok 46%-ában a *TAOS1* gén amplifikációját figyeltük meg. Ezeknek a géneknek a *CCND1*-gyel történő együttes amplifikációja a vastag daganatokban gyakrabban fordult elő. Eredményeink szerint a *TAOS1* gén amplifikációja, a *BRAF* vagy *NRAS* onkogén mutációja és a *CCND1* emelkedett géndózisa együttes előfordulása szignifikánsan gyakoribb a rosszabb prognózisú és kifehélyesedő felszínű daganatokban.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A *BRAF*- és *NRAS*-mutációk gyakoriak a primer melanómákban, és valószínűleg a tumor progressziója során végig fennmaradva hozzájárulnak a daganat agresszív viselkedéséhez.

2. Annak ellenére, hogy az *NRAS* és a *BRAF* onkogén aktivációs mutációi ugyanazon jelátviteli útvonalat aktiválják, eredményeink szerint a primer melanómák tumorgenezise során eltérő genetikai alterációkkal kooperálnak. Ez arra utal, hogy a *BRAF*- és *NRAS*-mutációk vezérlő szereppel funkcionálnak az alternatív genetikai útvonalakat érintő melanómagenézis során.
3. Feltételezzük, hogy a 10q kromoszómakaron bekövetkező delécia a *BRAF*-mutációval együttesen vesz részt a melanómagenézisben.
4. Adatbányászati módszerekkel *BRAF*-mutációhoz társuló 3 ismert tumorsuppresszor gént (*PTEN*, *JNK1*, *HVH3*) érintő deléciós mintázatot azonosítottunk.
5. A genetikai eltéréseket különböző jelátviteli útvonalakban szerepet játszó génekhez kapcsoltuk, felismertük, hogy a *BRAF*-mutációt hordozó daganatokban leggyakrabban a MAPK-JAK jelátviteli útvonalak közötti interakcióban részt vevő gének sérülnek.
6. A 11q13 amplifikációs klaszterben lokalizálódó kandidáns gének koamplifikációja, a *BRAF*- vagy *NRAS*-mutációval és a *CCND1* emelkedett géndózisával társulva gyakrabban jellemző rossz prognózisú daganatokra, mint a genetikai eltérések jelenléte külön-külön.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, prof. Balázs Margitnak, akinek az irányítása és tudományos útmutatása segítette a PhD-munkám elkészítését. Köszönettel tartozom prof. Ádány Róza intézetvezetőnek, hogy támogatásával lehetővé tette, hogy a Megelőző Orvostani Intézetben dolgozhassak. A melanómaminták és részletes adataik összegyűjtésében, a szövetek dermatopatológiai karakterizálásában nyújtott szerepéért kiemelt köszönettel tartozom dr. Bégány Ágnesnek és dr. Emri Gabriellának.

A PhD-tézisekben szereplő publikációk elkészítését és a tézisek összeállítását az OTKA K75191, a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031 számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

- Lázár V, Ecsedi S, Szöllösi AG, et al. Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with *BRAF* and *NRAS* mutations in human melanoma. *Mod Pathol* 22:1367–1378, 2009
- Lázár V, Ecsedi S, Vízkeleti L, et al. Marked genetic differences between *BRAF* and *NRAS* mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization. *Melanoma Res* 22:202–214, 2012
- Barok M, Balázs M, Lázár V, et al. Characterization of a novel, trastuzumab resistant human breast cancer cell line. *Front Biosci (Elite Ed)* 2:627–640, 2010
- Vízkeleti L, Ecsedi S, Rákossy Z, et al. The role of *CCND1* alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma. *Tumour Biol* 33:2189–2199, 2012
- Rákossy Z, Ecsedi S, Tóth R, et al. Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration. *PLoS One*; 8:e54958, 2013