

Nevüs Olgularında BRAF V600E Mutasyonu Varlığı Presence of BRAF V600E Mutation in Nevus Cases

Ayşen ÇETİN,^a
Dr. Şermin ÇOBAN,^b
Dr. Neşe ÇALLI DEMİRKAN,^b
Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN,^a
Dr. A. Çevik TUFAN,^c
Dr. Hüseyin BAĞCI^d

^aTıbbi Biyoloji AD,

^bPatoloji AD,

^cHistoloji ve Embriyoloji AD,
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Denizli

^dTıbbi Biyoloji ve Genetik AD,
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Antalya

Geliş Tarihi/Received: 07.10.2008

Kabul Tarihi/Accepted: 26.01.2009

*Bu araştırma, Pamukkale Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri SBE2005 tarafın-
dan desteklenmiştir.*

*Bu araştırma, VII. Ulusal Prenatal Tanı ve
Tıbbi Genetik Kongresi'nde poster bildiri
olarak sunulmuştur.*

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN
Pamukkale Üniversitesi Hastanesi,
Genetik Tanı Birimi, Denizli,
TÜRKİYE/TURKEY
nltufan@pau.edu.tr

ÖZET Amaç: V-raf mürin sarcoma viral onkogen homolog B1 (BRAF), V-RAF-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1 (RAF) gen ailesindedir ve yedinci kromozomun uzun kolunda (7q34) lokalizedir. BRAF geni, mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) sinyal yolunda görevli ve serin/treonin kinaz aktivitesi olan bir protein kodlamaktadır. BRAF geninde meydana gelen çeşitli mutasyonların MAPK sinyal yolu ve nükleer transkripsiyon faktörlerini aktive edebileceği ve sonrasında hücre çoğalmasına neden olabileceği düşünülmektedir. BRAF gen dizisi 15. ekzonunda bulunan T1796A transversiyonu melanomlarda tanımlanmıştır. Bu transversiyon 600. pozisyonda valin'in yerine glutamik asit'in kodlanmasına neden olur. Literatürde V600E mutasyonunun melanoma örneklerinde görülme sıklığının yaklaşık %90 olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Türk hasta popülasyonu nevüs olgularında BRAF V600E mutasyonu sıklığını araştırmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'nda nevüs tanısı almış 30 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Parafine gömülü doku kesitlerinden DNA izolasyonunu takiben, BRAF V600E mutasyonu varlığı, nükleotid 1796'yı içeren DNA parçası polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılıp DNA dizi analizi ile araştırılmıştır. Ayrıca, olgulardaki olası BRAF V600E gen mutasyonunun, MAPK sinyal yolundaki aktivasyonuna etkisi Anti Active pAb ERK 1/2 antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile araştırılmıştır. **Bulgular:** 30 olgunun beşinde (%16.6) T1796A transversiyonuna bağlı V600E mutasyonunun varlığı tespit edilmiştir. Bu olgularda, Active pAb ERK 1/2 antikoru ile elde edilen immunohistokimya sonuçları, V600E mutasyona bağlı MAPK sinyal yolu aktivasyonunun olmadığı desteklemektedir. **Sonuç:** Bu araştırmada elde edilen sonuçlar, çalışığımız gruptaki nevüslerde BRAF V600E mutasyonu sıklığının literatürdeki kadar yüksek olmadığını göstermektedir. Ancak, Türk hasta popülasyonu yönünden kesin bir yargıya varılabilmesi için bu çalışmadaki örnek sayısının artırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Proto-onkogen BRAF; mutasyon; polimeraz zincir reaksiyonu; DNA dizi analizi

ABSTRACT Objective: V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF), belongs to the family of V-RAF-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 (RAF) gene located in the long arm of chromosome 7 (7q34). The BRAF gene encodes a protein that has function in mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway with serin/threonin kinase activity. It has been suggested that presence of diverse mutations in BRAF gene may activate MAPK signaling pathway and nuclear transcription factors and then may cause cellular proliferation. T1796A transversion has been defined in melanomas in 15th exon BRAF gene sequence. This transversion results in missense coding of glutamic acid rather than valin at aminoacid at position 600. The incidence of the V600E mutation in the melanoma samples has been suggested as approximately 90% in the literature. The aim of this study is to analyze incidence of BRAF V600E mutation in the Turkish nevus cases. **Material and Methods:** Thirty nevus cases, diagnosed in the department of Pathology Pamukkale University School of Medicine, were included in this study. After DNA isolation from the paraffin embedded tissue sections, presence of BRAF V600E mutation was investigated by the amplification of DNA segment including 1796 nucleotide region with polymerase chain reaction and direct DNA sequencing. In addition, putative effects of BRAF V600E gene mutation on MAPK signaling pathway activation was investigated by immunohistochemistry using Anti Active pAb ERK 1/2 antibody in these cases. **Results:** The presence of T1796A transversion that results in V600E mutation is determined in five of thirty cases (16.6%). Immunohistochemistry results, using Active pAb ERK 1/2 antibody, suggested that the presence of V600E mutation did not activate MAPK signaling pathway in these cases. **Conclusion:** Results of this study suggest that the incidence of BRAF V600E mutation in our nevus cases is not as high as the ones described in the literature. However, to have a more reliable result for Turkish patients, the number of patients included in this study should be increased.

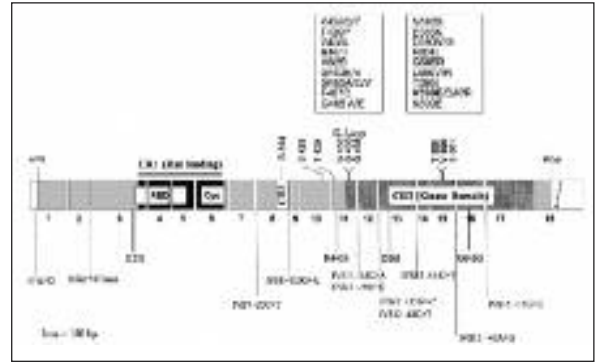
Key Words: Proto-Oncogene proteins B-raf; mutation; polymerase chain reaction; sequence analysis, DNA

Deride görülen lezyonlar içerisinde nevüsler önemli bir oranda bulunmaktadır ve bu lezyonların gelişiminde çeşitli gen mutasyonlarının rol aldığı düşünülmektedir. B-raf onkogen (BRAF, Gene ID 673, OMIM 164757) mutasyon varlığı, melanomaların %92'inde, farklı histopatolojik tiplerdeki nevüslerin %82'sinde ve primer melanomların %65'inden fazlasında tespit edilmiştir.¹⁻⁶

Melanoma ve nevüs oluşumunda kuvvetli ultraviyole (UV) radyasyonun, deri ile aşırı muamelesi önemli bir faktör olarak göze çarpmaktadır.^{7,8} Güneş gören bölgelerde melanosit yoğunluğunun, görmeyen bölgelere göre iki kat daha fazla olması, nevüs oluşumunda tetikleyici bir faktör olarak ortaya çıkarken, hormonal faktörler ve nevüs sıklığı da melanosit sayısını etkileyerek, melanositin nevüs oluşumuna olan katkısını artırmaktadır.⁹ UV radyasyon maruziyeti ile melanositlerde meydana gelen moleküler değişimle, invaziv melanomada görülen hasarın ilerlemesinin nedeni tam olarak anlaşılmasa da, UV tarafından oluşturulan mutasyonlar olan C-T ve CC-TT dimerlerinin bu hasarda anahtar öneme sahip olduğu bilinmektedir.^{10,11}

BRAF V600E gen mutasyonunun oluşumuyla, güneşe maruz kalma arasındaki ilişki tam olarak kesinlik kazanmamıştır, ancak UV ışığının mutajen etkisi, mutasyon oluşumunda gözden kaçırılmayacak bir durum olarak değerlendirilmiştir.^{12,13}

RAF gen ailesi üyesi olan BRAF geni, v-raf mürin sarcoma viral onkogen homolog B1 olarak tanımlanır ve kodladığı protein kinaz (sitoplazmik serin/treonin kinazı), MAPK sinyal yolunda, hücre farklılaşması ve proliferasyonunda görev alır.^{3,5,14} BRAF alelleri, yedinci kromozomun kısa kolunda (7q) bulunmaktadır.¹² Yeni çalışmalarda, malign melanoma, kolorektal karsinoma gibi kanserlerde BRAF genine ait somatik olarak mutasyon varlığı rapor edilmiştir.³ Kanser oluşumunda etkili olduğu düşünülen BRAF genindeki somatik mutasyonlar, BRAF kinaz domaininin iki bölgesinde görülmektedir (Şekil 1). Bunlar, G loop (ATP'nin bağlanmasına aracılık eden motif) ve aktivasyon segmenti



ŞEKİL 1: İnsan kanserlerinde somatik mutasyonları tanımlanmış olan BRAF gen yapısı.¹⁵

(substrat bağlanan bölgeyi koruyan motif) olarak tanımlanmıştır.³

BRAF V600E tek nokta mutasyon varlığı, konjenital, kompond, intradermal ve displastik nevüs gibi bazı benign melanositik lezyonlarda rapor edilmiştir. Melanositik neoplazilerin başlangıcındaki erken ve kritik aşamada BRAF aktivasyonu ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, BRAF'ın melanoma gelişiminde rol alan önemli genlerden biri olduğu düşünülmektedir.^{13,15} BRAF'ın ekzon 15'indeki kinaz aktivasyon domaininde, 1796 T-A transversiyonu (V600E-valinin glutamik asite değişimi) yanlış anlamlı mutasyon olarak (missens mutasyon) tek bir aminoasit değişimiyle sonuçlanır.^{1,3,6,16} Tanımlanan BRAF mutasyonlarının %90'ı için, mutasyon T1796A'nın etkisi altında olan V600E olarak rapor edilmiştir.^{3-5,17-19} V600E (GTG-GAG), yanlış anlamlı mutasyonu, Kumar ve ark. tarafından yeniden adlandırılarak V600E mutasyonu adını almıştır.^{6,20,21}

Nevüs olgularında BRAF aktive gen mutasyonu, melanosit gelişimi ile ilgili çeşitli faktörlerin de aktivasyonuna neden olabilmektedir. MAPK sinyal yolu BRAF genin içinde bulunduğu bir yoldur. Mitojen-aktive protein kinaz (Ras-mitojen-aktive protein/ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz kinaz-mitojen-aktive protein kinaz) yolu membrandan-nukleusa kadar giden bir sinyal sistemidir ve bu sistem hücre proliferasyonu, farklılaşma ve memeli hücrelerindeki apoptozisi kontrol etmektedir.^{12,22,23} MAPK sinyal yolunun BRAF geni ile aktivasyonu, melanosit proliferasyonunda önemli

rol oynar. Bu durumda hücre çekirdeğinden ekstraselüler mitojenik sinyallerin geçişi ve bu sinyallerin yapısal aktivasyonu kontrolsüz hücre bölünmesini uyarması şeklinde açıklanabilir. Ayrıca ultraviyole B (UVB) radyasyonuna yanıt olarak, alfa-melanosit-stimüle edici hormon, insan melanositlerindeki melanocortin reseptör I (MC1R)'e bağlanarak, siklik adenosin monofosfatın (cAMP) ileri düzenlenmesine neden olurlar. Yüksek cAMP konsantrasyonu melanin senteziyle sonuçlanır ve melanosit proliferasyonunu meydana getirir. Melanositlerdeki cAMP-bağımlı sinyal yolu da aynı zamanda BRAF'ı aktive eder.²⁰ BRAF V600E mutasyonu, melanositik lezyonların farklı tiplerinde sıklıkla rapor edilmiştir, ancak bu mutasyonun melanogenezdeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Mutasyonun ya MAPK yolu aktivasyonu ile ya da onkogen aktivasyonu ile oluşan proliferasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.²⁴

MAPK sinyal yolundaki, RAS/RAF/MAPK sinyal yolunun yeniden düzenlenmesi, melanositik neoplazide erken evreyi akla getirmektedir.²⁵ ERK'ların regülasyonu bu neoplazilerin gelişiminde önemli bir yardımcı faktördür.^{14,23,26} ERK1 ve ERK2, RAS-RAF-MEK-ERK-MAP kinaz yolunun alt bileşen efektörü olarak görev yaparak, çekirdek ve/veya sitoplazmada ikili fosforile şekliyle (ERK 1/2'nin varlığında 1/2 hedeflerinin göreceli boyanması) melanomdaki ERK 1/2 hedefleri hakkında önemli bir ipucu vermektedir.²⁷ Çekirdekte ERK'ler c-Fos, Elk-1 gibi transkripsiyon faktörlerini fosforlayarak aktive ederler.²⁸ İn vitro çalışmalar, melanoma hücre dizinlerinde ve tümör dokularında ERK aktivitesinin yüksek bir oranda meydana geldiğini göstermiştir.^{27,29-32} Literatürde BRAF gen dizisi 15. ekzonunda bulunan T1796A transversiyonunun (V600E mutasyonu) melanoma örneklerinde görülme sıklığının yaklaşık %90 olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Türk hasta popülasyonu nevüs olgularında BRAF V600E gen mutasyonu sıklığını araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

ÖRNEKLER

Pamukkale Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2005 yılları arasında tanı alma amacı ile in-

celenen toplam 30 adet parafine gömülü nevüs doku örneği çalışma kapsamına alınmıştır. Bu olgular, güneş gören ve güneş görmeyen olarak iki gruba ayrılmıştır. Otuz olguluk grup, beş erkek ve 25 kadından oluşmaktadır. Olguların yaş dağılımı, 14-57 (ort.± 31.5) arasında değişmektedir. Olgular histolojik olarak; beş konjenital nevüs, 13 intradermal nevüs, beş compound nevüs, altı dermal nevüs ve bir jonksiyonel nevüs olarak tanı almıştır. Olgulardaki nevüs lokalizasyonları; interscapuler bölge sırt derisi, sırt, yüz, mons pubis derisi, yanak cildi, saçlı deri, burun, alın, ense, boyun, umblikus laterali, sol aksilla, sağ krista iliaka derisi, vulva-vagina, sol skapula iç kısmı, karın bölgesi olarak tanımlanmıştır. Bu örnekler dışında BRAF V600E mutasyonu taşıdığı bilinen malign melanoma hücre dizininin fareye inokülasyonu ile elde edilen parafine gömülü tümör doku örnekleri, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

DNA İZOLASYONU

Parafine gömülü nevüs doku örneklerinden, DNA izolasyonu öncesinde parafini uzaklaştırmak için kesitler 50 °C'de ksilende bekletildikten sonra değişik derecedeki alkol serilerinden geçirilmiştir. Sonrasında DNA izolasyonu Qiagen DNA Tissue Mini Kit (Qiagen, katalog no: 51106, Hilden-Germany) protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

BRAF genin 15. ekzonundaki T1796A (600. kodonu) içeren DNA parçasını çoğaltmak amacıyla Kademeli (Step-Down) PZR uygulandı. Kademeli PZR'da BRAF genin 15. ekzonundaki 600. kodonunu çoğaltmak amacıyla tasarlanan primerler; ileri dizi (Forward) primeri: 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3', geri dizi (Reverse) primeri; 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3' şeklindedir.

PZR reaksiyonu ile ilgili DNA parçasının çoğaltılmasında; 25 µl HotStar Tag PZR Karışımı (2.5 ünite HotStar Tag DNA polimeraz, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, Qiagen katalog no # 203445) 2 µl BRAF ileri ve geri primer karışımı, 10 µl H₂O ve 20 µl DNA kullanılmıştır. Kademe-

li PZR amplifikasyonunda kullanılan PZR dön-
gü basamakları; 95°C'de 15 dakika Hot Start Taq
enzim aktivasyonu için; 95°C'de iki dakika ön de-
natürasyon (bir döngü); 95°C'de bir dakika dena-
türasyon, 59°C'de bir dakika primer eşleme,
72°C'de bir dakika uzama (iki döngü); 95°C'de bir
dakika denatürasyon, 57°C'de bir dakika primer
eşleme, 72°C'de bir dakika uzama (iki döngü);
95°C'de bir dakika denatürasyon, 55°C'de bir da-
kika primer eşleme, 72°C'de bir dakika uzama (40
döngü); 72°C'de beş dakika son uzama şeklindedir.

DİZİ ANALİZİ

DNA dizi analizi, "Otomatik Kapiler Jel Elektrofo-
rez" cihazı ile (ABI PRISM 310 Genetik Analizör
Applied Biosystems, Foster City, USA) İontek'te
(İontek A.Ş. İstanbul, Türkiye) yapılmıştır.

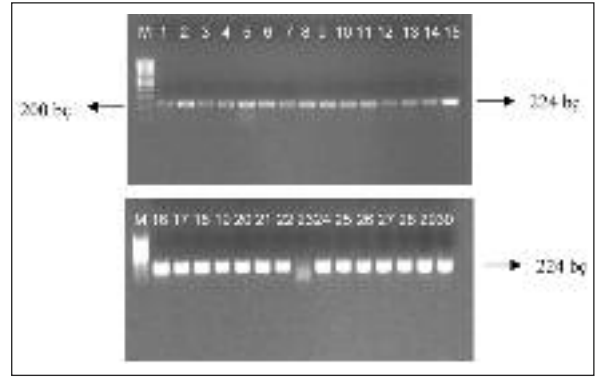
İMMUNOHİSTOKİMYA

Çalışma kapsamındaki toplam 30 nevüs olgusun-
da, ERK 1/2 aktivasyonunun varlığını araştırmak
amacıyla, Anti-ACTİVE® MAPK pAb Rabbit,
(pTEpY) (katalog no:V8031, Promega, 1/500 di-
lüsyonda) antikoruna ile VENTANA otoimmün ci-
hazı kullanılarak immün boyama gerçekleştiril-
miştir. Anti-ACTİVE® MAPK pAb, bir poliklonal
tavşan antikorudur. Bu antikor, MAP kinaz enzim-
lerinin aktif formuna uygunluk gösteren ikili ola-
rak fosforillenmiş peptide karşı affinite göster-
mektedir.

BULGULAR

Pamukkale Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'n-
da 2000-2005 yılları arasında tanı alan ve araştı-
maya dahil edilen toplam 30 adet parafine
gömülmüş nevüs örneğinin, histolojik özellikleri
konjenital nevüs, intradermal nevüs, compound
nevüs, dermal nevüs ve jonksiyonel nevüs şeklin-
dedir. Bu örneklerin 14 tanesi güneş gören bölge-
de (%43), 16 tanesi güneş görmeyen bölgede (%57)
lokalizedir.

Örneklerden DNA izolasyonu sonrasında,
BRAF genin 15. ekzonunda bulunan T1796A
(V600E) içeren DNA parçasını çoğaltmak amacı-
yla ilgili bölge için tasarlanan primerler kullanılarak



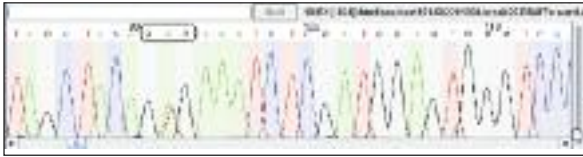
ŞEKİL 2: BRAF V600E mutasyonu için, 224 baz çiftlik PZR ürününün %1.5'lük agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker.

kademeli PZR uygulanmıştır, 224 baz çiftlik DNA
amplikon görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 2).

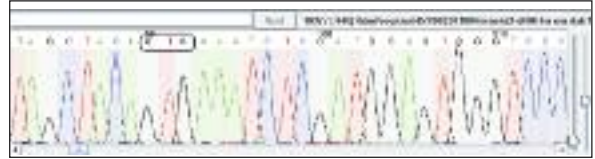
BRAF geni PZR ürünlerine yapılan dizi anali-
zi sonucunda, BRAF genin 15. ekzonunda bir baz
değişimi nedeniyle T1796A yanlış anlamlı mutas-
yonu gerçekleşerek, valin (GTG) aminoasiti yerine
glutamik asitin (GAG) kodlanmasıyla ortaya çıkan
600. kodondaki (V600E) mutasyon, 30 olgunun be-
şinde tespit edilmiştir (Şekil 3, 4). Bu mutasyonun
tespit edildiği beş olgunun dördü kadın, biri erkek
ve olguların yaş dağılımı 24-50 (ort.±35.8) arasında
değişmektedir. Çalışmada, BRAF V600E mutasyo-
nu taşıdığı bilinen malign melanoma hücre dizini-
nin fareye inokulasyonu ile elde edilen tümör
örnekleri, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır
(Şekil 5).

Mutasyon tespit edilen olguların lokalizasyon-
ları, güneş gören-güneş görmeyen şeklinde
sınıflandırıldığında mutasyonlu iki olgunun gü-
neş görmeyen lokalizasyonlu, mutasyonlu üç ol-
gunun güneş gören lokalizasyonlu olduğu belir-
lenmiştir.

Bütün olgular için BRAF V600E mutasyonu-
nun varlığının, olası MAPK sinyal yolunun akti-
vasyonuna etkisini araştırmak amacıyla aktifleşmiş
olan ERK 1/2 pAb protein ekspresyonu immuno-
histokimyasal yöntemle incelenmiştir. BRAF ek-
zon 15 T1796A mutasyonuna sahip beş olgunun hiç
birinde ERK 1/2 pAb pozitifliği saptanmamıştır.
Ancak mutasyon izlenen bir olgunun başka bir ne-
vüsünde (yüz derisinden alınan intradermal nevüs)



ŞEKİL 3: BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu olgu için dizi analizi elektrofeogram görüntüsü. Daire içindeki alan GAG değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.



ŞEKİL 4: BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu olmayan olgu için dizi analizi elektrofeogram görüntüsü. Daire içindeki alan normal GTG kodonunu göstermektedir.

immunohistokimyasal olarak klonal sitoplazmik Anti-Fosfo-ERK 1/2 pAb pozitifliği saptanmıştır (Şekil 6).

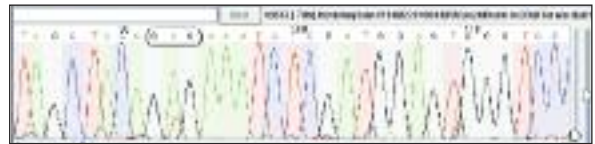
Otuz olgunun histopatolojik özelliklerine göre stoplazmik ERK 1/2 pAb boyanması Tablo 1'de verilmiştir. Otuz örnekten 20 tanesi ERK 1/2 pAb aktivasyonu açısından pozitif bulunmuştur. Bu örneklerden yedi tanesinde (++) güçlü stoplazmik ERK 1/2 pAb boyanması gözlemlenirken, 13 tanesinde zayıf (+) boyanma tespit edilmiştir (Tablo 1). ERK 1/2 pAb aktivasyonu açısından pozitif boyanan örneklerden 13 tanesinin güneş gören bölgede lokalize, yedi tanesinin güneş görmeyen bölgede lokalize olduğu saptanmıştır (Tablo 1).

SONUÇ

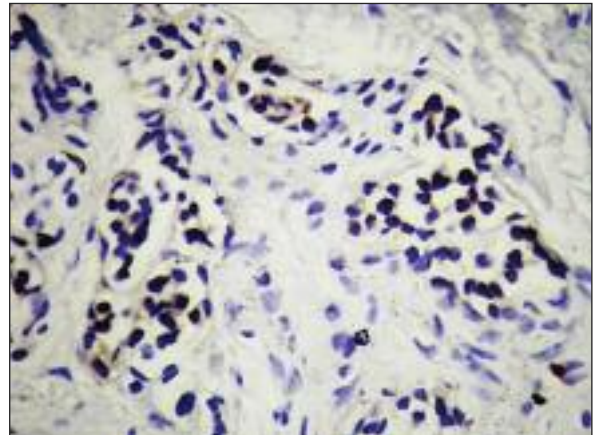
Nevüs tanısı almış 30 olguda yapılan DNA dizi analizine dayalı BRAF V600E mutasyonu varlığı, çalışma kapsamına alınmış olan olgulardan sadece beşinde tespit edilmiştir. Literatürde UV maruziyeti ile BRAF V600E mutasyonu arasında pozitif bir ilişki olabileceği belirtilmiştir.³³ Bu çalışmada, mutasyon tespit edilen lezyonların ikisi, güneş görmeyen bölgelerde (sırt ve mons pubis derisi), üçü ise güneş gören bölgelerde (yüz, alın, burun kancası) bulunmaktadır. Bu sonuçlara göre, UV ışık ile BRAF V600E mutasyonu arasında pozitif bir ilişki olabileceğini söylemek için örnek sayısının artırılması gerekmektedir.

BRAF V600E mutasyonunun varlığında, MAPK sinyal yolu aktivasyonunu araştırmak amacıyla immunohistokimyasal olarak Anti-Active MAPK kullanılmıştır. ERK 1/2 pAb pozitifliği 30 olguda incelenmiş ve 30 olgunun 20'sinde ERK 1/2 pAb stoplazmik boyanma pozitif bulunmuştur. An-

cak bunlardan sadece yedi tanesinde (%23) güçlü ERK 1/2 pAb sitoplazmik boyanması tespit edilmiştir. Ayrıca bu olguların hiç birinde BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu belirlenmemiştir. Literatürde BRAF V600E mutasyonu sıklıkla artmış ERK 1/2 pAb ekspresyonu ile ilişkilendirilse de,³⁴ bizim çalışmamızda BRAF V600E mutasyonu pozitif olan hiçbir olguda ERK 1/2 pAb pozitifliği güçlü bir boyanma (++) ile saptanmamıştır. Ancak, mutasyon görülen bir olgunun başka bir nevüsünde (intradermal nevüs), güçlü bir boyanma ile klonal ERK 1/2 pAb pozitifliği gözlemlenirken, BRAF V600E



ŞEKİL 5: BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu için pozitif kontrol olan melanoma hücre dizinine ait dizi analizi elektrofeogram görüntüsü. Daire içindeki alan GAG değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.



ŞEKİL 6: Yüz derisinden alınan intradermal nevüse ait sitoplazmik ERK 1/2 pAb pozitifliğini gösteren görüntüler klonal ERK 1/2 pAb stoplazmik boyanması (DABX200).

TABLO 1: BRAF V600E mutasyon varlığı, olgulardaki nevüs histolojisi ve lokalizasyonları.

Olgular	BRAF		Lokalizasyon	Boyama	ERK 1/2		Yaş
	Mutasyonu	Histoloji			Nükleer ve Stoplazmik	Cinsiyet	
1	-	Konjenital nevüs	İnterskapuler bölge, sırt derisi	+	K	26	
2	-	Konjenital nevüs	Sırt	-	E	21	
3	-	İntradermal nevüs	Yüz, yüz derisi	-	K	44	
4	-	İntradermal nevüs	C/S abdominal sırasında insizyon yerinin inferiorundan nevüs eksizyonu, deri	+	K	30	
5	+	İntradermal nevüs	Mons pubis derisi	+	K	24	
6	-	İntradermal nevüs	Yanaktan alınan nevüs, yanak cild	++	K	34	
7	-	İntradermal nevüs	Saçlı deri, yüz derisi	-	E	57	
8	-	İntradermal nevüs	Yüz, yüz derisi	++	K	44	
9	+	Dermal nevüs	Burun kanadı, alın	+	K	48	
10	-	Dermal nevüs	Burun kanadı, alın	++	K	48	
11	-	Komponent nevüs	Ense	+	K	14	
12	-	Dermal nevüs	Yüz derisi	+	K	34	
13	-	İntradermal nevüs	Yüz derisi	-	K	27	
14	-	İntradermal nevüs	Alın ve boyun kayıtlı materyal	++	E	55	
15	-	Dermal nevüs	Alın	+	K	22	
16	-	İntradermal nevüs	Yüz kodlu materyal	+	K	49	
17	-	İntradermal nevüs	Yüz, yüzeysel cilt-ciltaltı biyopsi materyali	++	K	24	
18	+	İntradermal nevüs	Yüz, yüzeysel cilt-ciltaltı biyopsi materyali	+	K	24	
19	-	İntradermal nevüs	Yüz, yüzeysel cilt-ciltaltı biyopsi materyali	++, klonal	K	24	
20	-	Komponent nevüs	Umblikus laterali	+	K	28	
21	-	Komponent nevüs	Sol aksilla	+	K	?	
22	-	Melanositik dermal nevüs	Sağ crista iliaca derisi üzerinde hiperpigmente papül	-	K	15	
23	-	Dermal nevüs	Vulva-vajina	-	K	51	
24	-	İntradermal nevüs	Sol skapula iç kısmında sınırları net seçilemeyen üzerinde 2-3 adet kıl olan nevüs	+	E	?	
25	+	Jonksiyonel nevüs	Yaklaşık 10 yıldır mevcut olan sırttaki lezyon	-	K	50	
26	-	İntradermal nevüs	Karın kodlu materyal	-	K	49	
27	-	Konjenital nevüs	Sağ burun kenarı, sağ kulak altı	++	K	37	
28	+	Konjenital nevüs	Alın	+	E	33	
29	-	Konjenital intradermal nevüs	Sırt derisi	-	K	19	
30	-	Komponent nevüs	Karın	-	K	14	

C/S: Cesarian section

mutasyonu varlığı tespit edilmemiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre, BRAF V600E mutasyonu ile ERK 1/2 pAb ekspresyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Buna benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir.^{17,24} Ancak Raf protein kinaz, ERK 1/2 pAb yolunun dışında başka yolları da kullanarak çekirdekte transkripsiyonu aktif hale getirebilir.

Keza MAPK sinyal yolu pek çok kinazı içine alan bir yoldur, dolayısıyla mutasyonla sonuçlanan her bir proliferasyon farklı sinyal yollarını kullanarak çekirdeğe ulaşabilme şansına sahiptir.²⁴

Bazı yayınlarda, Ras/Raf/MEK/ERK yolunda fonksiyon gören MEK'in aktivasyonunun diğer mutasyonların aktivasyonlarıyla ilişkili olmadığı belirtilmiştir.³⁵ Ayrıca ortaya çıkan bir Raf protein

kinaz aktivasyonu ile diğer kinazların aktivasyonu arasında bir ilişki olmadığı ileri sürülmüştür. Bu bilgiler, Raf protein kinaz aktivasyonunun çekirdekte transkripte olacak düzeye gelinceye kadar MAPK sinyal yolu yanında, başka yolları da kullanabileceğini düşündürmektedir. Nevüs ve melanomlardaki BRAF V600E gen mutasyonu sıklığındaki farklılıklar, primer tümör progresyonu ve metastaz gelişimi esnasında kazanılmış BRAF mutasyonlarının ihtilafına yol göstermektedir. Çünkü BRAF V600E mutasyon sıklığı nevüs, primer melanoma ve metastatik melanomaya kadar uzanan çeşitli melanositer lezyonlarda rapor edilmiştir. Dolayısıyla burada önemli olan tümör progresyonu ve bunun hastalık üzerine etkisinin ilişkisinde BRAF mutasyonlarını araştırmaktır.^{3,5} Son çalışma-

lar da, melanomada B-Raf nokta mutasyonlarının aktivitesinin sıklığına dikkat çekmektedir.²⁶ BRAF V600E mutasyonu ve nevüs oluşumu arasındaki olası etkileşimi aydınlatmak açısından, çok merkezli ve geniş olgu sayıları ile çalışılmasının, ayrıca olgulardan alınan nevüs lezyon bölgelerinin UV ışık etkisinde olan bölgelerden seçilmesinin, bu alandaki diğer çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Teşekkür

Bu araştırma Ayşen ÇETİN tarafından, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji AD'da Yüksek Lisans tezi olarak yapılmıştır ve Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri SBE2005 tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62(23):6997-7000.
2. Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P, Chowers I, Merbs SL, Pe'er J, et al. Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(7):2876-8.
3. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892): 949-54.
4. Dong J, Phelps RG, Qiao R, Yao S, Benard O, Ronai Z, et al. BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res* 2003; 63(14): 3883-5.
5. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33(1):19-20.
6. Hoefflich KP, Jaiswal B, Davis DP, Seshagiri S. Inducible BRAF suppression models for melanoma tumorigenesis. *Methods Enzymol* 2008;439:25-38.
7. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 1997;73(2):198-203.
8. Cohen Y, Rosenbaum E, Begum S, Goldenberg D, Esche C, Lavie O, et al. Exon 15 BRAF mutations are uncommon in melanomas arising in nonsun-exposed sites. *Clin Cancer Res* 2004;10(10):3444-7.
9. Koh HK, Kligler BE, Lew RA. Sunlight and cutaneous malignant melanoma: evidence for and against causation. *Photochem Photobiol* 1990;51(6):765-79.
10. Daya-Grosjean L, Dumaz N, Sarasin A. The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J Photochem Photobiol B* 1995;28(2):115-24.
11. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996;12(1):97-9.
12. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(24):1878-90.
13. Wu J, Rosenbaum E, Begum S, Westra WH. Distribution of BRAF T1799A(V600E) mutations across various types of benign nevi: implications for melanocytic tumorigenesis. *Am J Dermatopathol* 2007;29(6):534-7.
14. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003;1653(1):25-40.
15. Laud K, Kannengiesser C, Avril MF, Chompret A, Stoppa-Lyonnet D, Desjardins L, et al. French Hereditary Melanoma Study Group. BRAF as a melanoma susceptibility candidate gene? *Cancer Res* 2003;63(12): 3061-5.
16. Palmedo G, Hantschke M, Rütten A, Mentzel T, Hügel H, Flaig MJ, et al. The T1796A mutation of the BRAF gene is absent in Spitz nevi. *J Cutan Pathol* 2004;31(3):266-70.
17. Uribe P, Wistuba II, González S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am J Dermatopathol* 2003;25(5):365-70.
18. Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P, Chowers I, Merbs SL, Pe'er J, et al. Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(7):2876-8.
19. Loewe R, Kittler H, Fischer G, Faé I, Wolff K, Petzelbauer P. BRAF kinase gene V599E mutation in growing melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2004;123(4):733-6.
20. Papp T, Schipper H, Kumar K, Schiffmann D, Zimmermann R. Mutational analysis of the BRAF gene in human congenital and dysplastic melanocytic naevi. *Melanoma Res* 2005;15(5):401-7.
21. Kumar R, Angelini S, Czene K, Sauroja I, Hahka-Kemppinen M, Pyrhönen S, et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003;9(9):3362-8.
22. Jiveskog S, Ragnarsson-Olding B, Platz A, Ringborg U. N-ras mutations are common in melanomas from sun-exposed skin of humans but rare in mucosal membranes or unexposed skin. *J Invest Dermatol* 1998;111(5): 757-61.
23. Peyssonnaud C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001;93(1-2):53-62.

24. Venesio T, Chiorino G, Balsamo A, Zaccagna A, Petti C, Scatolini M, et al. In melanocytic lesions the fraction of BRAF V600E alleles is associated with sun exposure but unrelated to ERK phosphorylation. *Mod Pathol* 2008;21(6): 716-26.
25. Gill M, Renwick N, Silvers DN, Celebi JT. Lack of BRAF mutations in Spitz nevi. *J Invest Dermatol* 2004;122(5):1325-6.
26. Alsina J, Gorsk DH, Germino FJ, Shih W, Lu SE, Zhang ZG, et al. Detection of mutations in the mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(17):6419-25.
27. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, et al. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res* 2003;63(4):756-9.
28. Treisman R. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4(1):96-101.
29. Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett* 2000;476(3): 198-202.
30. Kortylewski M, Heinrich PC, Kauffmann ME, Böhm M, MacKiewicz A, Behrmann I. Mitogen-activated protein kinases control p27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells. *Biochem J* 2001;357(Pt 1):297-303.
31. Smalley KS, Eisen TG. Differentiation of human melanoma cells through p38 MAP kinase is associated with decreased retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle arrest. *Melanoma Res* 2002;12(3): 187-92.
32. Ge X, Fu YM, Meadows GG. U0126, a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor, inhibits the invasion of human A375 melanoma cells. *Cancer Lett* 2002;179(2): 133-40.
33. Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clin Cancer Res* 2004;10(5): 1753-7.
34. Saldanha G, Purnell D, Fletcher A, Potter L, Gillies A, Pringle JH. High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types. *Int J Cancer* 2004;111(5):705-10.
35. Hüser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J* 2001;20(8):1940-51.