

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.07.51-56>

Мутационный статус генов *BRAF*, *NRAS* в опухолевом материале пациентов с диагнозом меланома кожи

Стефанова Ю.Ю.¹, Порханова Н.В.¹, Мурашко Р.А.¹, Тимошкина Н.В.², Максимов А.Ю.², Тимофеева С.В.²

1 – ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения России
350063, г. Краснодар, Россия, ул. имени Митрофана Седина, д. 4

2 – ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Министерства здравоохранения России
344037, г. Ростов-на-Дону, Россия, 14-я линия, д. 63

Меланома – это одно из самых опасных злокачественное заболеваний кожи с высоким риском метастазирования и возникновения рецидивов. Исследования генетических и молекулярных характеристик меланомы имеют важное значение для разработки новых стратегий лечения. Целью данного исследования была оценка мутационного статуса генов *BRAF*, *NRAS* в опухолевом материале пациентов с диагнозом меланома кожи. Всего в исследование были включены 54 пациента с подтвержденным диагнозом меланома: мужчин было 36% (n=15), а женщин 64% (n=39). Средний возраст на момент постановки диагноза составил 56 лет. ДНК выделяли из тканей опухоли, фиксированных в формалине и заключённых в парафин (FFPE) с использованием коммерческого набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Германия). Анализ мутации V600E гена *BRAF* осуществляли методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией, были проанализированы кодоны 597–601. Методом классической ПЦР (C1000 Touch BioRad, USA) с последующим прямым секвенированием по Сэнгеру (ABI Prism 3500, Applied Biosystems, USA) в гене *NRAS* были исследованы экзоны 2 и 3. Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 7.0. Мутации в гене *BRAF* были выявлены в 42,6% образцов (мутация V600E 37,1%, V600K 5,4%), а в гене *NRAS* – в 14,8% (Q61K 7%). В остальных случаях (42,6%) не было обнаружено изменений ни в одном из проанализированных генов. Мутационный статус был тесно связан с анатомическим расположением опухоли. В группе с мутациями в генах *BRAF* и *NRAS* (65,3% и 37,0% соответственно; p=0,002) чаще отмечали пациентов с кожным первичным поражением головы и шеи. Митотическую активность чаще обнаруживали в первичных опухолях у пациентов с мутациями в гене *NRAS*, чем у пациентов с мутациями в гене *BRAF* (p=0,002).

Ключевые слова: меланома кожи, *BRAF*, *NRAS*.

Для цитирования: Стефанова Ю.Ю., Порханова Н.В., Мурашко Р.А., Тимошкина Н.В., Максимов А.Ю., Тимофеева С.В. Мутационный статус генов *BRAF*, *NRAS* в опухолевом материале пациентов с диагнозом меланома кожи. *Медицинская генетика* 2024; 23(7): 51-56.

Автор для корреспонденции: Тимофеева Софья Владимировна; e-mail: timofeeva.sophia@gmail.com

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.07.2024

Mutational status of *BRAF*, *NRAS* genes in tumor material of patients diagnosed with cutaneous melanoma

Stefanova Yu.Yu.¹, Porkhanova N.V.¹, Murashko R.A.¹, Timoshkina N.V.², Maksimov A.Yu.², Timofeeva S.V.²

1 – Kuban State Medical University
4 Mitrofana Sedina st., Krasnodar, 350063, Russian Federation

2 – National Medical Research Centre for Oncology
14th line st., 63, 344037, Rostov-on-Don, Russian Federation

Melanoma is a complex disease influenced by changes in multiple genes and metabolic pathways that continue to evolve throughout the disease. Research into the genetic and molecular characteristics of melanoma is important for the development of new treatment strategies. The purpose of our study was to evaluate the survival rate and mutational status of the *BRAF* and *NRAS* genes in tumor material from patients diagnosed with cutaneous melanoma. A total of 54 patients with a confirmed diagnosis of cutaneous melanoma were included in the study: 36% were men (n=15), and women were 64% (n=39). The average age at diagnosis was 56 years. DNA was isolated from sections of paraffin blocks (FFPE) using a commercial kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Germany). Analysis of the V600E mutation of the *BRAF* gene was carried out by allele-specific real-time PCR. Exons 2 and 3 in the *NRAS* gene were analyzed by classical PCR (C1000 Touch BioRad, USA) followed by direct Sanger sequencing (ABI Prism 3500, Applied Biosystems, USA). Statistical analysis of the data was carried out using the Statistica 7.0 program. *BRAF* mutations were detected in 42.6% (V600E mutation 37.1%, V600K 5.4%), and *NRAS* mutations in 14.8% (Q61K 7%). In the remaining cases (42.6%), no changes were detected in any of the genes analyzed. The mutation status was closely related to the anatomical location of the tumor, so in the group with mutations in the *BRAF* and *NRAS* genes

(65.3% and 37.0%, respectively; $p = 0.002$) patients with cutaneous primary lesions of the head and neck were noted. Mitotic activity was more frequently detected in primary tumors from patients with *NRAS* mutations than in patients with *BRAF* mutations ($p = 0.002$).

Keywords: melanoma; *BRAF*; *NRAS*.

For citation: Stefanova Yu.Yu., Porkhanova N.V., Murashko R.A., Timoshkina N.V., Maksimov A.Yu., Timofeeva S.V. Mutational status of *BRAF*, *NRAS* genes in tumor material of patients diagnosed with cutaneous melanoma. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(7): 51-56. (In Russian)

Corresponding author: Sofia V. Timofeeva; **e-mail:** timofeeva.sophia@gmail.com

Funding. The study was not supported by sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 15.07.2024

Введение

Меланома — это злокачественное новообразование меланоцитов, которые представляют собой продуцирующие пигмент клетки нейроэктодермального происхождения [1]. Трансформация меланоцитов в меланому требует сложного взаимодействия экзогенных и эндогенных событий (**рисунок**).

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), за последнее десятилетие заболеваемость меланомой кожи постепенно увеличилась в 7 раз, за 2022 год во всем мире было зафиксировано 130 000 случаев заболевания. Исследования генетических и молекулярных характеристик меланомы имеют важное значение для разработки новых стратегий лечения.

Путь передачи сигнала Ras-Raf-Mek-Erk (MAPK) включает каскад продуктов генов *BRAF*, *NRAS* и играет важную роль в развитии и прогрессировании меланомы [2]. Мутации онкогенов *BRAF* и *NRAS* являются наиболее распространенными генетическими изменениями при меланоме кожи [3]. Активирующие мутации онкогенов *BRAF* и *NRAS* приводят к конститутивной передаче сигналов пути митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и тем самым усиливают рост опухоли и способствуют прогрессированию заболевания [4].

Хотя в настоящее время для лечения метастатической меланомы доступны специфические ингибиторы тирозинкиназы, нацеленные на *BRAF* и *MEK*, общее биологическое и прогностическое значение мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* остается неясным из-за противоречивых данных.

При меланоме наиболее распространенной мутацией в гене *BRAF* является замена валина (V) на глутаминовую кислоту (E) в кодоне 600 экзона 15 (V600E). Разработка экспериментальных моделей, таких как мышиные модели с ограниченной экспрессией *BRAF* V600E в меланоцитах, предоставила доказательства того, что *BRAF* V600E играет главную роль в иницировании рака. Важно отметить, что ингибирование *BRAF* V600E блокирует пролиферацию клеток меланомы, ин-

дуцирует апоптоз *in vitro* и блокирует рост ксенотрансплантата меланомы *in vivo* [5]. Меланомы с мутацией *BRAF* V600E чаще развиваются у молодых людей с историей раннего, но периодического пребывания на солнце, которое, возможно, характеризуется эпизодами солнечных ожогов в детстве. Напротив, кумулятивные солнечные повреждения при первичной меланоме кожи и в пожилом возрасте связаны с мутациями *BRAF* V600K [6].

Мутации в кодонах 12 и 13 экзона 2 и в кодоне 61 экзона 3 связаны с активацией онкогена *NRAS* [7]. Как и в случае с *BRAF*, исследования, посвященные прогностической значимости изменений в гене *NRAS*, дают противоречивые результаты. Одно из первых исследований, посвященных этому вопросу, определило такие изменения в гене *NRAS* как независимый фактор, указывающий на благоприятную выживаемость [8]. Другие исследования показали, что статус мутации *NRAS* предсказывает более низкую выживаемость после диагностики заболевания на IV стадии [7, 9].

Цель исследования: оценить выживаемость и мутационный статус генов *BRAF*, *NRAS* в опухолевом материале пациентов с диагнозом меланома кожи.

Методы

В исследование были включены 54 пациента с морфологически подтвержденным диагнозом *меланома кожи*. ДНК выделяли из тканей опухоли, фиксированных в формалине и заключённых в парафин (FFPE). Перед выделением ДНК определяли содержание опухолевых клеток в срезе, чтобы оно не было меньше 20%. Геномную ДНК выделяли на колонках с использованием коммерческого набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Германия). Анализ мутации V600E гена *BRAF* осуществляли методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени с использованием праймеров: R 5'-AACTCAGCAGCATCTCAGGG-3'

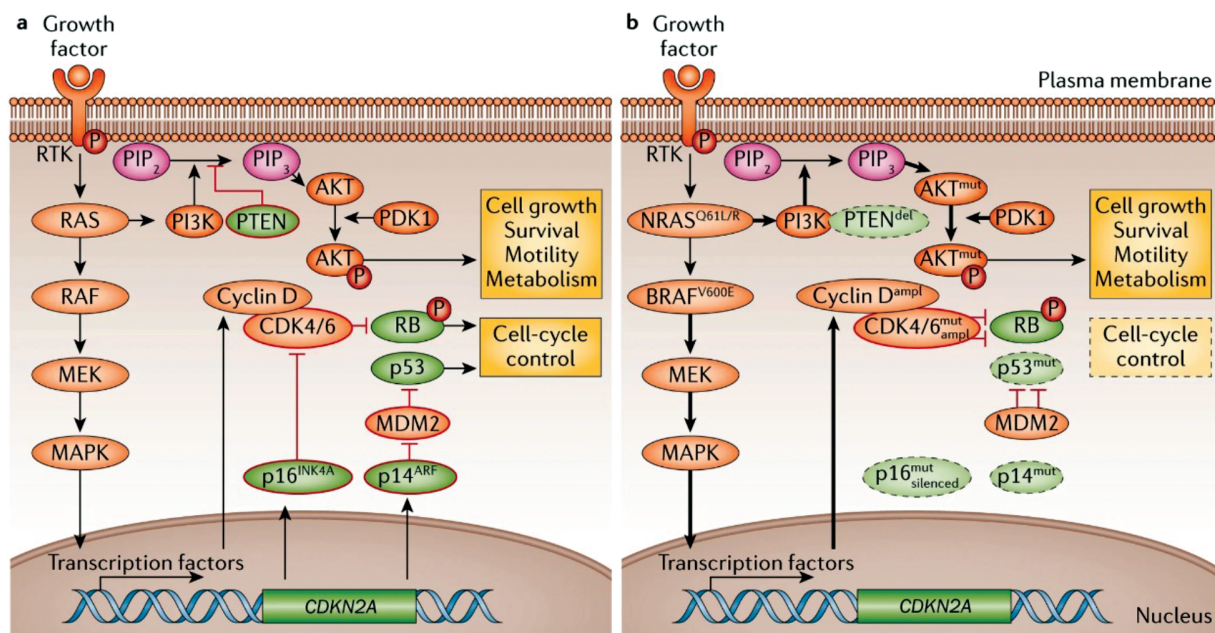
и F 5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGA-3'. Амплификацию выделенной ДНК проводили на термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США). В гене *BRAF* были проанализированы кодоны 597–601. Методом классической ПЦР (C1000 Touch BioRad, USA) с последующим прямым секвенированием по Сэнгеру (ABI Prism 3500, Applied Biosystems, USA) в гене *NRAS* были исследованы экзоны 2 и 3.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 7,0. Для оценки качественных признаков использовали односторонний критерий

Фишера. Достоверность различий определяли с помощью критерия Манна-Уитни. При $p < 0,05$ различия определяли как статистически значимые.

Результаты

Всего в исследование были включены 54 пациента с меланомой кожи мужчин было 36% ($n=15$), а женщин 64% ($n=39$). Средний возраст на момент постановки диагноза составил 56 лет. Минимальный возраст пациента был 29 лет, максимальный – 81 год.



Сигнальные пути при меланоме [1]. А) В нормальных условиях передача сигналов митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)-АКТ обеспечивает сбалансированный контроль основных клеточных функций, включая регуляцию клеточного цикла, выживание, подвижность и метаболизм. Б) При меланоме часто наблюдаются описанные генетические изменения, которые приводят к активации конститутивного пути (обозначены толстыми стрелками) и потере клеточного гомеостаза. CDK – циклинзависимая киназа; MDM2 – убиквитин-белковая лигаза E3 MDM2; MEK – киназа MAP/ERK; P (в красном кружке) – фосфат; p14 ARF – вариант сплайсинга, кодируемый геном ингибитора циклин-зависимой киназы 2A (*CDKN2A*); p16 INK4A – вариант сплайсинга, кодируемый геном *CDKN2A*; PDK1 – 3-фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа 1; PIP 2 – фосфатидилинозитол-(4,5)-бисфосфат (также известный как PtdIns(4,5)P2); PIP 3 – фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат (также известный как PtdIns(3,4,5)P3); PTEN – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатаза и протеинфосфатаза двойной специфичности; RB – белок, ассоциированный с ретинобластомой; RAF – серин/треонин-протеинкиназа RAF; RTK – рецепторная тирозинкиназа.

Signaling pathways in melanoma [1]. A) Normally, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT signaling ensures balanced control of essential cellular functions, including cell cycle regulation, survival, motility, and metabolism. B) Genetic alterations in melanoma result in activation of the constitutive pathway (indicated by thick arrows) and loss of cellular homeostasis. CDK – cyclin-dependent kinase; MDM2 – MDM2 ubiquitin-protein E3 ligase; MEK – MAP/ERK kinase; P (in red circle) – phosphate; p14 ARF – a splice variant encoded by the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) gene; p16 INK4A – a splice variant encoded by the *CDKN2A* gene; PDK1 – 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PIP 2 – phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (also known as PtdIns(4,5)P2); PIP 3 – phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate (also known as PtdIns(3,4,5)P3); PTEN – phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase; RB – retinoblastoma-associated protein; RAF – RAF serine/threonine protein kinase; RTK – receptor tyrosine kinase.

В табл. 1 представлена общая характеристика пациентов. В табл. 2 представлены результаты проведенного нами молекулярно-генетического анализа.

В 20 образцах выявлена мутация V600E в экзоне 15 гена *BRAF*, что составило 37,1%. Мутация Q61K в экзоне 3 гена *NRAS* наблюдалась у 4 пациентов (7,4 % случаев). Всего мутации гена *BRAF* были зафиксированы у 42,6%, а мутации гена *NRAS* – у 14,8% пациентов.

Мутационный статус был тесно связан с анатомическим расположением опухоли. У трех пациентов (5,6%) была меланома слизистой оболочки. Кожное первичное поражение головы и шеи было наиболее частой локализацией в группах пациентов с мутациями

в генах *BRAF* и *NRAS* (65,3% и 37,0% соответственно; $p = 0,002$) (табл. 3). Митотическая активность чаще обнаруживалась в первичных опухолях пациентов с мутацией в гене *NRAS* и в группе без мутаций, чем у пациентов с мутациями в гене *BRAF* ($p = 0,002$).

Прогрессирование заболевания

Общая частота рецидивов (пациенты хотя бы с одним типом рецидива) составила 85,8%. Локальный рецидив в месте первичной опухоли был редким и наблюдался только у одного пациента (4,4%) с мутацией в гене *BRAF* и у двух пациентов (25%) с мутацией в гене *NRAS* (табл. 4). Рецидив локорегионарного поражения узлов наблюдался у 19 пациентов (35,1%). Об-

Таблица 1. Характеристика пациентов с диагнозом меланома кожи

Table 1. Patients with cutaneous melanoma characteristics

Данные больных	Число пациентов
Возраст на момент постановки диагноза, лет: Средний Минимальный – Максимальный	56 29–81
Пол, n (%): Мужской Женский	15 (36%) 39 (64%)
Стадия по TNM II III IV	3 (5,4%) 33 (61,2%) 18 (33,4%)

Примечание: TNM (tumor, nodus и metastasis) — международная классификация стадий злокачественных новообразований.

Таблица 2. Частоты и типы мутаций в генах *BRAF* и *NRAS*

Table 2. Frequencies and types of mutations in the *BRAF* and *NRAS* genes

Мутация	Количество пациентов (N, %)	% мутаций <i>BRAF</i> и <i>NRAS</i>
<i>BRAF</i>	23 (42,6)	<i>BRAF</i> (n = 23)
V600E	20 (37,1)	86,95
V600K	3 (5,4)	13,05
<i>NRAS</i>	8 (14,8)	<i>NRAS</i> (n = 8)
Q61K	4 (7,4)	50
Q61R	1 (1,85)	12,5
Q61L	1 (1,85)	12,5
G12D	1 (1,85)	12,5
G13R	1 (1,85)	12,5
<i>BRAF</i> + <i>NRAS</i>	2 (3,7)	<i>BRAF</i> + <i>NRAS</i> (n = 2)
V600E, Q61K	1 (1,85)	50
V600E, Q61L	1(1,85)	50

разование отдаленных метастазов выявлено у 25 пациентов (46,3%).

Примечательно, что рецидив поражения лимфоузлов чаще наблюдали в группе пациентов с мутацией в гене *BRAF*, чем у пациентов без мутаций или с мутацией в гене *NRAS*. Это позволяет предположить, что эта подгруппа имела самый высокий риск прогрессирования заболевания ($p=0,01$).

Обсуждение

Клиническая, эпидемиологическая и гистопатологическая характеристика пациентов, страдающих

меланомой, с различными молекулярными показателями имеет решающее значение для назначения персонализированного терапевтического лечения пациентов. Появляется все больше доказательств того, что меланома развивается в результате накопления генетических аномалий внутри меланоцитов [10]. Мутации пути MAPK, который включает каскад белков NRAS, BRAF и участвует в контроле роста, пролиферации и миграции клеток, могут играть важную роль в развитии и прогрессировании меланомы.

В этом исследовании мы оценили частоту встречаемости мутаций в зависимости от фенотипа у 54 пациентов с меланомой. Мутации в гене *BRAF* были выяв-

Таблица 3. Характеристики опухоли и наличие мутаций в генах *BRAF* и *NRAS*
Table 3. Tumor characteristics and the presence of mutations in the *BRAF* and *NRAS* genes

	<i>BRAF</i> n= 23 (100%)	<i>NRAS</i> n= 8 (100%)	Без мутаций n= 23 (100%)	Всего n= 54 (100%)	p-value
Локализация					
Голова / Шея	15 (65,3)	3 (37,5)	7 (30,4)	25 (46,3)	0,002
Руки	2 (8,7)	2 (25)	6 (26)	10 (18,6)	
Ноги	6 (26)	2 (25)	8 (34,7)	16 (29,5)	
Слизистая оболочка	(0,0)	1 (12,5)	2 (8,9)	3 (5,6)	
Стадия по TNM					
II	2 (6,7%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	3 (5,4%)	0,094
III	18 (60%)	7 (77,8%)	8 (53,3%)	33 (61,2%)	
IV	10 (33,3%)	2 (22,2)	6 (40%)	18 (33,4%)	
Митотическая активность					
да	7 (63,4%)	2 (66,7%)	11(84,6%)	19 (73,1%)	0,002
нет	4 (36,6%)	1 (33,3%)	2 (15,4%)	7 (26,9%)	

Примечание. Митотическая активность определялась как наличие ≥ 1 митоза.

Таблица 4. Прогрессирование заболевания в зависимости от наличия мутаций в генах *BRAF* и *NRAS*
Table 4. Disease progression depending on the presence of mutations in the *BRAF* and *NRAS* genes

	<i>BRAF</i> n = 23 (100%)	<i>NRAS</i> n = 8 (100%)	Без мутаций n = 23 (100%)	Всего n = 54 (100%)	p-value
Локальный рецидив					
да	1 (4,4%)	2 (25%)	0	3 (5,6%)	0,056
нет	22 (95,6%)	6 (75%)	23 (100%)	51(94,4%)	
Рецидив узлового заболевания (локорегинальный)					
да	9 (39,1%)	3 (37,5%)	7 (30,4%)	19(35,1%)	0,01
нет	14(60,9%)	5 (62,5%)	16 (69,6%)	35 (64,9%)	
Отдаленные метастазы					
да	11 (47,8%)	1 (12,5%)	13 (56,5%)	25 (46,3%)	0,078
нет	12 (52,2%)	7 (87,5%)	10 (43,5%)	29 (53,7%)	

Примечание: пациенты могли иметь более одного типа прогрессирования. Статистический анализ проводился с использованием критерия χ^2 .

лены в 37,1%, а мутации в гене *NRAS* — в 14,8%, тогда как в остальных 48,1% образцов не было обнаружено изменений ни в одном из проанализированных генов. Несмотря на то, что генотип не был фактором риска, у пациентов с меланомой с мутацией *BRAF* рецидивы поражения региональных лимфоузлов и метастазирование, чем у пациентов с мутацией в гене *NRAS* или у пациентов без мутаций, что позволяет предположить, что они подвергались наибольшему риску прогрессирования заболевания и, в конечном итоге, смертности.

Что касается характеристик первичной опухоли, то у пациентов с мутацией в генах *BRAF* и *NRAS* наиболее частой локализацией были голова и шея. Эти результаты не согласуются с предыдущими исследованиями, в которых мутации *BRAF* чаще наблюдались в опухолях туловища и реже головы и шеи [11].

Наше исследование имеет несколько ограничений. Во-первых, выборка была отобрана на основе наличия парафиновых блоков, независимо от других демографических и клинических параметров. Кроме того, выборка, основанная только на наличии мутационного статуса *BRAF* и *NRAS*, может нести потенциальную предвзятость. Таким образом, наши результаты не могут быть распространены на всех пациентов с меланомой и, в частности, не могут быть действительны для людей с более низким риском заболевания.

На основании наших данных мы пришли к выводу, что изменения в генах *BRAF* и *NRAS* скорее влияют на ранние стадии заболевания. Таким образом, необходимо анализировать полное течение заболевания, а не сосредотачиваться только на IV стадии заболевания, где различия между генотипами могут быть менее очевидными.

Литература/References

1. Schadendorf D., Fisher D.E., Garbe C., et al. Melanoma. Nature reviews. Disease primers, 2015;1:15003. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>
2. Delyon J., Lebbe C., Dumaz N. Targeted therapies in melanoma beyond BRAF: targeting NRAS-mutated and KIT-mutated melanoma. Current opinion in oncology, 2020;32(2):79–84. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000606>
3. Murphy B.M., Terrell E.M., Chirasani V.R., et al. Enhanced BRAF engagement by NRAS mutants capable of promoting melanoma initiation. Nature communications, 2022;13(1):3153. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30881-9>
4. Hept M.V., Siepmann T., Engel J., et al. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. BMC cancer, 2017;17(1):536. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3529-5>
5. Wellbrock C., Karasarides M., Marais R. The RAF proteins take centre stage. Nature reviews Molecular cell biology, 2004;5(11):875–885.
6. Mandalà M., Voit C. Targeting BRAF in melanoma: biological and clinical challenges. Critical reviews in oncology/hematology, 2013;87(3):239–255. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.01.003>
7. Jakob J.A., Bassett R.L. Jr., Ng C.S., et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. Cancer, 2012;118(16):4014–4023. <https://doi.org/10.1002/cncr.26724>
8. Ugurel S., Thirumaran R.K., Bloethner S., et al. B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. PloS one, 2007;2(2):e236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000236>
9. Devitt B., Liu W., Salemi R., et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. Pigment cell & melanoma research, 2011;24(4):666–672. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00873.x>
10. Zhang S., Xie R., Zhong A., et al. Targeted therapeutic strategies for melanoma. Chinese medical journal, 2023. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002692>
11. Bauer J., Büttner P., Murali R., et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. Pigment Cell Melanoma Res. 2011;24(2):345–351. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00837.x