

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНА *BRAF* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

Кит О.И.<sup>1</sup>, Водолажский Д.И.<sup>1</sup>, Златник Е.Ю.<sup>1</sup>, Ефимова И.Ю.<sup>1</sup>, Енин Я.С.<sup>1</sup>, Кочуев С.С.<sup>1</sup>, Двадненко К.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Меланома кожи человека характеризуется агрессивным течением и резистентностью к стандартной цитостатической терапии. В странах с преимущественно белым населением меланома входит в первую десятку наиболее социально значимых категорий опухолей, как в отношении заболеваемости, так и смертности. Решающим фактором риска развития меланомы кожи является эпизодическое облучение интенсивными дозами ультрафиолета. Для населения, проживающего на Юге России, эта проблема является актуальной в связи с особенностями климатогеографического положения и интенсивностью инсоляции. Целью настоящего исследования стало определение мутационного статуса гена *BRAF* у пациентов Юга России в зависимости от клинико-морфологических особенностей меланомы кожи. Проведено молекулярно-генетическое исследование 15 экзона гена *BRAF* методом секвенирования по Сэнгеру у 52 пациентов Юга России с морфологически подтвержденным диагнозом меланома кожи. В результате исследования выявлено три варианта мутаций в гене *BRAF*: p.V600E, p.V600K и V600 K601>E. Мутация V600 K601>E была впервые диагностирована на Юге России. 50% меланом содержали замену в 600 аминокислотном остатке киназы BRAF. Усредненный показатель частоты мутаций V600E в 15 экзоне гена *BRAF* (для мужчин и женщин) составил 47%. Обнаружено достоверное увеличение на 23% случаев частоты проявления соматической мутации V600E в 15 экзоне гена *BRAF* у пациентов с толщиной опухоли по Бреслоу  $\geq 2$  мм по сравнению с пациентами, имеющими толщину опухоли по Бреслоу  $< 2$  мм. Метастазирование в регионарные лимфатические узлы наблюдалось только в группе пациентов с мутацией в гене *BRAF* и встречалось в 11,5% случаев.

Ключевые слова: меланома кожи, мутации, BRAF.

## COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE BRAF MUTATION STATUS IN DEPENDENCE ON CLINICAL AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF MELANOMA

Kit O.I.<sup>1</sup>, Vodolazhsky D.I.<sup>1</sup>, Zlatnik E.Y.<sup>1</sup>, Efimova Y.I.<sup>1</sup>, Enin Y.S.<sup>1</sup>, Kochuev S.S.<sup>1</sup>, Dvadnenko K.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: rnioi@list.ru

Human melanoma is characterized by an aggressive disease course and is resistant to the standard cytotoxic therapy. In countries with a predominantly white population, melanoma is among ten most socially significant tumors in terms of both morbidity and mortality. Occasional high doses of UV radiation are the most important risk factor in melanoma development. This problem is urgent for people in the South of Russia because of the climate and geographical position and insolation intensity. The purpose of the study was to determine the BRAF mutation status in patients in the South of Russia in dependence on clinical and morphological characteristics of melanoma. A molecular genetic study of *BRAF* exon 15 with the Sanger sequencing method was performed for 52 patients of the South of Russia with morphologically verified melanoma. As a result, three *BRAF* mutations were detected: p.V600E, p.V600K and V600 K601>E; the last one was diagnosed in the South of Russia for the first time. 50% of melanomas had an amino acid substitution at residue 600 in *BRAF*. The mean frequency of V600E mutations in *BRAF* exon 15 (for men and women) was 47%. Patients with melanoma  $\geq 2$  mm in Breslow thickness showed somatic V600E mutation in *BRAF* exon 15 23% more frequent than patients with melanoma  $< 2$  mm. Metastases to regional lymph nodes were observed in patients with the *BRAF* mutations only and amounted to 11.5% of the cases.

Keywords: melanoma, mutations, BRAF.

Заболеваемость меланомой кожи колеблется от ~1 до 55 случаев на 100 тыс. человек в год, в зависимости от географического положения, поведенческих особенностей и расовой

принадлежности изучаемой популяции. Индивидуальный риск развития данной патологии в странах с преимущественно белым населением составляет 2%. В онкодерматологии на меланому приходится 4% от общего числа новообразований, и она является причиной около 80% летальных исходов от онкологических заболеваний. Меланома кожи – одна из наиболее агрессивных форм солидных опухолей, которая характеризуется устойчивостью к стандартной химиотерапии. В связи с этим, 5-летняя выживаемость больных с метастатическим процессом меланомы кожи не превышает 10-15% [7]. В странах с преимущественно белым населением меланома входит в первую десятку наиболее социально значимых категорий опухолей, как в отношении заболеваемости, так и смертности [7]. Меланома кожи является этиологически гетерогенным заболеванием, и ее развитие зависит как от генетических, так и от факторов внешней среды. Различают наследственную и спорадическую формы. Частота спорадической меланомы составляет около 90%, а наследственной – 5-10% [2]. В молекулярном патогенезе спорадической меланомы основную роль играют онкогены и гены-супрессоры различных сигнальных каскадов. В подавляющем большинстве случаев меланомы кожи наблюдается гиперактивация сигнального пути RAS-RAF-МЕК-МАРК, регулирующего клеточное деление, дифференцировку и метастазирование [3]. Одним из его ключевых звеньев служит серин-треониновая киназа, кодируемая геном *BRAF*. Мутации в гене *BRAF* проявляются в 40-80% случаев меланомы кожи. На сегодняшний день известно около 40 соматических мутаций в гене *BRAF* [5]. Наиболее часто встречаемой является активирующая точечная мутация T1799A (V600E), приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в 600 аминокислотном остатке соответствующего полипептида, частота которой составляет около 80-90% среди всех мутаций в гене *BRAF* [4]. Кроме того, с частотой до 20% от всех случаев выявляется мутация V600K, приводящая к замене валина на аспарагин [6].

**Целью настоящего исследования** является определение мутационного статуса гена *BRAF*, в зависимости от клинико-морфологических особенностей меланомы кожи у пациентов Юга России.

### **Материалы и методы**

В исследовании участвовали 52 пациента Юга России и Северного Кавказа: 22 мужчины и 30 женщин в возрасте до 55 лет с морфологически подтвержденным диагнозом меланома кожи. Для молекулярно-генетического исследования использовали 3 мкм срезы парафиновых блоков (FFPE), содержащих не менее 20% опухолевых клеток. Экстракция ДНК включала стандартную процедуру депарафинирования в орто-ксилоле, лизис в 2% SDS - буфере в присутствии протеиназы К и дополнительную очистку от ингибиторов на колонках QIAamp® DNA FFPE TissueKit (QIAGEN, Germany). Для проведения ПЦР

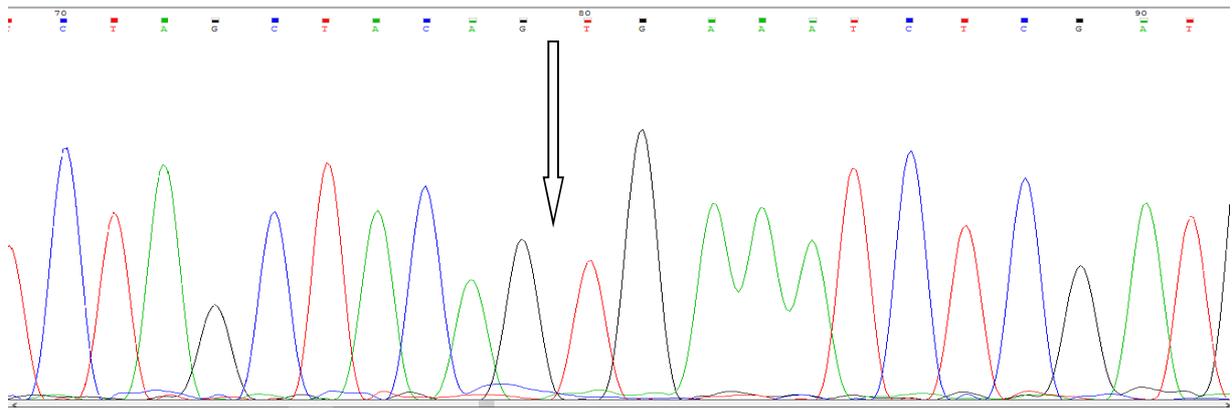
концентрацию ДНК нормализовывали до величины 2 нг/мкл. Полимеразная цепная реакция для 15 экзона гена проводилась с использованием пары праймеров 5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGA-3' и 5'-AACTCAGCAGCATCTCAGGG-3'. Амплификация проводилась на программируемом термоциклере MaxyGeneGradient (Axygen) по программе, включавшей: первичную денатурацию при 95°C – 5 минут и 40 циклов в режиме: денатурация - 95°C – 15 сек., отжиг – 66°C-15 сек., синтез при 72°C - 20 сек. и заключительная элонгация 72°C – 30 мин. Секвенирование проводилось по стандартному протоколу для набора ABI Prism BigDyeTerminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits на амплификаторе MaxyGeneGradient (Axygen) по следующей программе: первичная денатурация при 96°C – 1 минута и 30 циклов в режиме: денатурация - 96°C – 10 сек., отжиг - 50°C - 5 сек., синтез при 72°C-4 мин.

Определение последовательности нуклеотидов образцов проводили на секвенаторе ABI Prism 3500(LifeTechnologies, USA).

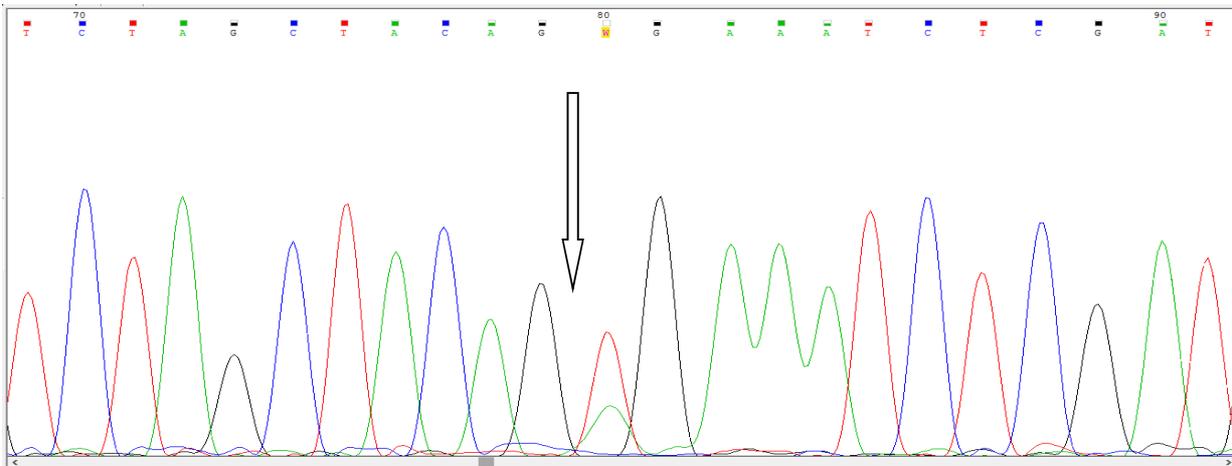
Статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия  $\chi^2$  для порогового уровня  $p < 0.05$ .

### **Результаты и обсуждение**

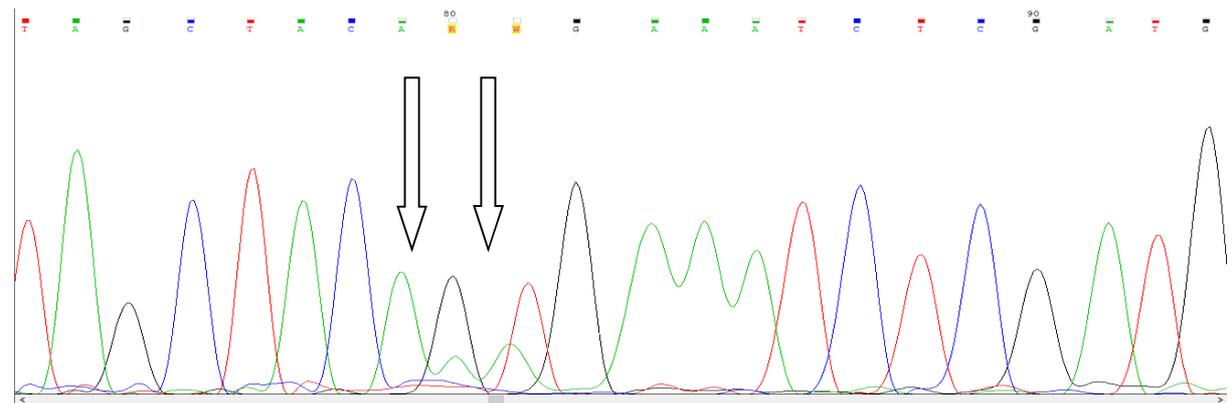
Для изучения мутационного статуса гена *BRAF* в зависимости от клинико-морфологических характеристик меланомы кожи больные были разделены на 2 группы: с мутацией в гене *BRAF* - *mtBRAF* (n=26) и без мутации - *wtBRAF* (n=26). В результате проведенного исследования была определена общая частота проявления соматической мутации V600E в гене *BRAF*, которая составила 47% (24/51 пациентов), что согласуется с данными, полученными ранее в исследованиях [1]. При исследовании мутационного статуса гена *BRAF* в объединенной группе мужчин и женщин с меланомой кожи были обнаружены следующие мутации: p.V600E(92%), характеризующаяся нуклеотидной заменой Т на А в положении 1799, в результате чего происходит замена аминокислоты валина на глутаминовую кислоту в положении 600. Мутация p.V600K (4% от общего количества мутаций), характеризующаяся заменой двух нуклеотидов GT на AA в положении 1798-1799 и приводящая к замене аминокислоты валина на аминокислоту аспарагин в положении 600. Мутация p.V600 K601>E(4% от общего количества мутаций), характеризующаяся делецией трех нуклеотидов TGA в положении 1799-1801 и сдвигом рамки считывания.



*Рис.1. Секвенс образца дикого типа гена BRAF*



*Рис.2. Секвенс образца с мутацией V600E в гене BRAF (указана стрелкой)*



*Рис.3. Секвенс образца с мутацией V600K в гене BRAF (указаны стрелками)*

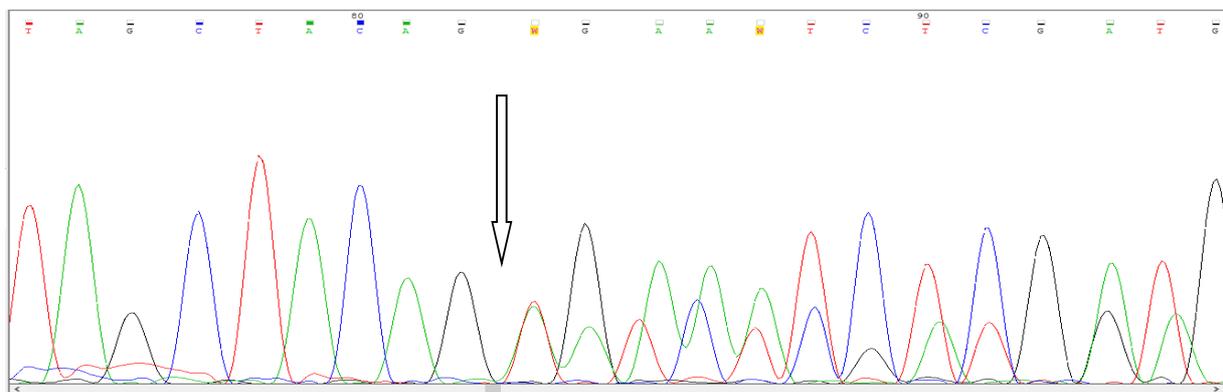


Рис.4. Секвенс образца с мутацией V600 K601>E в гене BRAF (указана стрелкой)

Как показали результаты нашего исследования (Табл. 1), в группе пациентов с размером опухолей T1 частота встречаемости дикого типа гена *BRAF* статистически достоверно была более чем в три раза выше, чем *mtBRAF* ( $p=0,0001$ ).

В группах пациентов с размером опухолей T3 и T4 количество пациентов с *mtBRAF* было ~ на 20 % больше, чем с *wtBRAF* (Таблица 1), что может говорить в пользу высокой скорости деления клеток *BRAF* ассоциированной меланомы кожи [1].

Таблица 1

Зависимость размера опухоли от мутационного статуса гена *BRAF*

	T1	T2	T3	T4
<b>wt BRAF</b>	77,8%	53,3%	38,5%	40%
<b>mt BRAF</b>	22,2%	46,7%	61,5%	60%

В группе пациентов с *mtBRAF* на 23%чаще, чем в группе *wtBRAF* встречалась толщина опухоли по Бреслоу  $\geq 2$  мм ( $p=0,008$ ).

Метастазирование в регионарные лимфатические узлы наблюдалось лишь в группе с мутацией гена *BRAF* и встречалось в 11,5% случаев. (Табл. 2).

Таблица 2

Характеристика мутационного статуса гена BRAF в зависимости от клинико-морфологических особенностей

Показатели	wtBRAF	mtBRAF
<b>Пол</b>		
<b>Мужской</b>	58% (n=15 )	42 % (n=11 )
<b>Женский</b>	42 % (n=11 )	58 % (n=15 )

<b>Метастазы в ЛФУ</b>		
<b>Присутствуют</b>	0 %	11,5 % (n=3)
<b>Отсутствуют</b>	100% (n=26)	88,5% (n=23)
<b>Толщина по Бреслоу</b>		
<b>&lt; 2 мм</b>	50% (n=13)	27% (n=7)
<b>≥ 2 мм</b>	50% (n=13)	73% (n=19)

Также в группе мутации в гене *BRAF* на 16% чаще встречались у женщин ( $p=0,023$ ), (Табл. 2).

### **Заключение**

Таким образом, при проведении молекулярно-генетического скрининга мутаций в 15 экзоне гена *BRAF* (секвенирование ДНК по Сэнгеру) у 52 больных Юга России с меланомой кожи нами установлены три варианта мутаций в 15 экзоне гена *BRAF*: p.V600E, p.V600K и V600 K601>E (мутация V600 K601>E впервые диагностирована на Юге России). *BRAF* мутации были обнаружены у 50% пациентов: p.V600E в 92%, p.V600K в 4% и V600 K601>E в 4% случаев. Усредненный показатель частоты мутаций V600E в 15 экзоне гена *BRAF* (для мужчин и женщин) составил 47%. Наблюдалось достоверное увеличение случаев частоты соматической мутации V600E в 15 экзоне гена *BRAF* у пациентов с толщиной опухоли по Бреслоу  $\geq 2$  мм на 23%. Метастазирование в регионарные лимфатические узлы наблюдалось лишь в группе с мутацией гена *BRAF* и встречалось в 11,5% случаев.

### **Список литературы**

1. Любченко Л.Н., Черненко П.А., Хатырев С.А., Емельянова М.А., Наседкина Т.А., Писарева Е.Е., Коваленко С.П., Шаманин В.А. Клинико-генетическая гетерогенность меланомы кожи // Злокачественные опухоли. – 2012. – Т.2. – №2. – С. 81-90.
2. Berking C., Bosserhoff A.K. Malignant Melanoma // Hereditary tumors / Allgayer H., Rehder H., Fulda S. – WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. – P. 411-420
3. Berger MF, Garraway LA. Applications of genomics in melanoma oncogene discovery. Hematol.Oncol.Clin.North.Am. 2009 Jun;23(3):397-414, vii.
4. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002; 417:949– 954.

5. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 2010 Oct 14; 29(41):5545-55. Epub 2010 Aug 9.
6. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1; 29(10):1239-46. Epub 2011 Feb 22.
7. Miller A.J., Mihm M.C. Jr. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006; 355: 51—65.

**Рецензенты:**

Франциянц Е.М., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону;

Горошинская И.А., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону.