

DDPCR-СКРИНИНГ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНОВ *BRAF* И *KRAS* У ПАЦИЕНТОВ ЮГА РОССИИ

Водолажский Д.И.¹, Гудков Г.В.¹, Филиппов Е.Ф.², Мурашко Р.А.³, Крутенко Д.В.¹

¹ГБУЗ «Детская городская клиническая больница города Краснодара», Краснодар, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com;

²Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ, Краснодар, e-mail: mz@krasnodar.ru;

³ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1», Краснодар, e-mail: kkod@kkod.ru

Меланома кожи входит в десять наиболее опасных злокачественных заболеваний человека с высокими показателями заболеваемости, высоким риском метастазирования и смертности, особенно в странах с белым населением, живущим в регионах с высоким уровнем инсоляции. Подавляющее большинство клинических анализов для выявления активирующих соматических мутаций выполняется на уровне чувствительности традиционных методов RT-PCR (1-5%). Для скрининга мутаций, находящихся за пределами обнаружения рутинных методов исследования, определен мутационный статус гена *KRAS* методом ddPCR. Препараты ДНК были получены из биоптатов кожи (FFPE) 36 пациентов Юга России с меланомой и доброкачественными новообразованиями кожи. С использованием набора V600E («Биолинк», Россия) проводился первичный скрининг пациентов на группы с отсутствием (WT) и наличием (MT) активирующих мутаций в гене *BRAF* для 5% уровня чувствительности. Молекулярно-генетическое тестирование активирующих мутаций V600E, V600K и V600R в 15 экзоне гена *BRAF* и во 2-м экзоне гена *KRAS* (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V и G13D) проведено с использованием мультиплексных наборов ddPCR (Bio-Rad, USA) для уровня чувствительности детекции мутаций 0,05%. У пациентов с доброкачественными новообразованиями кожи активирующие мутации в генах *KRAS* и *BRAF* при использовании высокочувствительного метода ddPCR не выявлены. У пациентов с меланомой кожи и наличием активирующих мутаций в гене *BRAF* с частотой до 40% детектируются активирующие мутации в гене *KRAS*. У пациентов с отсутствием мутаций в гене *BRAF* в образцах меланомы кожи активирующие мутации в гене *KRAS* детектируются с частотой до 80%. Все обнаруженные мутации находились за пределами чувствительности рутинных методов RT-PCR. Делается вывод о том, что необходима детекция активирующих мутаций в целевых генах с использованием более чувствительных методов детекции.

Ключевые слова: ddPCR, меланома, *KRAS*, *BRAF*, соматическая мутация.

DDPCR SCREENING FOR THE MUTATIONAL STATUS OF THE *BRAF* AND *KRAS* GENES IN PATIENTS OF SOUTHERN RUSSIA

Vodolazhskiy D.I.¹, Gudkov G.V.¹, Filippov E.F.², Murashko R.A.³, Krutenko D.V.¹

¹Children's city clinical hospital of Krasnodar, Krasnodar, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com;

²Kuban State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Krasnodar, e-mail: mz@krasnodar.ru;

³Clinical Oncologic Dispensary №1, Krasnodar, e-mail: kkod@kkod.ru

Melanoma of the skin is among the ten most dangerous malignant diseases of a person with high rates of morbidity, high risk of metastasis and mortality, especially in countries with white populations living in regions with a high level of insolation. The overwhelming majority of clinical tests to detect activating somatic mutations are performed at the sensitivity level of traditional RT-PCR methods (1-5%). For the screening of mutations that are beyond the detection of routine research methods, the mutational status of the *KRAS* gene is determined by the ddPCR method. DNA preparations were obtained from skin biopsies (FFPE) of 36 patients in southern Russia with melanoma and benign skin tumors. With the use of the V600E kit ("Biolink", Russia), primary screening of patients for groups with no (WT) and the presence (MT) of activating mutations in the *BRAF* gene was conducted for a 5% sensitivity level. Molecular genetic testing of the activating mutations of V600E, V600K and V600R in exon 15 of the *BRAF* gene and in exon 2 of the *KRAS* gene (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V and G13D) was carried out using multiplex ddPCR kits ("Bio-rad", USA) for a sensitivity level of mutation detection of 0.05%. In patients with benign skin tumors, activating mutations in the *KRAS* and *BRAF* genes were not detected using the highly sensitive ddPCR method. In patients with skin melanoma and the presence of activating mutations in the *BRAF* gene with a frequency of up to 40%, activating mutations in the *KRAS* gene are detected. In patients with no mutations in the *BRAF* gene in skin melanoma samples, activating mutations in the *KRAS* gene are detected with a frequency of up to 80%. All detected mutations were beyond the sensitivity of routine RT-PCR methods. It is concluded that the detection of activating mutations in targeted genes is necessary using more sensitive detection methods.

Keywords: ddPCR, melanoma, KRAS, BRAF, somatic mutation.

Злокачественная меланома является одним из самых смертоносных и наиболее распространенных видов рака в кавказоидных популяциях, находящихся в условиях интенсивной инсоляции, что особенно характерно для Юга России [1]. До 2011 года диссеминированная меланома с относительно низкой эффективностью лечилась цитотоксическими препаратами, которые не могли улучшить показатели общей выживаемости. В последние годы лечение онкологических заболеваний улучшилось благодаря появлению персонализированных таргетных методов лечения. Это вызвало необходимость проведения рутинных молекулярно-генетических исследований опухолей на предмет наличия/отсутствия клинически значимых соматических мутаций [2-4]. В настоящее время проводится терапия меланомы кожи с использованием BRAF-ингибиторов [5], ингибиторов MEK (митоген-активируемых протеинкиназ), иммунотерапевтических подходов [6] и дендритно-клеточных вакцин [7].

Канонически, RAS-зависимые механизмы димеризации RAF являются одной из причин лекарственной устойчивости клеток меланомы [8; 9]. Возникновение активирующих соматических мутаций в гене *KRAS* можно рассматривать в качестве фактора, способствующего усилению RAF-димеризации даже без наличия активирующих соматических мутаций в генах семейства *RAF*. Частота проявляемости RAS-мутаций в клетках опухолей меланомы, детектируемая рутинными методами RT-PCR с чувствительностью от 1 до 5%, относительно низка. Это может объясняться тем, что титр содержания мутантных вариантов генов RAS, как правило, ниже уровней чувствительности рутинных методов детекции RT-PCR. Однако количество клеток с активирующими мутациями в генах RAS может увеличиться после создания селективных условий для их отбора при использовании таргетных препаратов, элиминирующие клетки-носители активирующих RAF-мутаций. Поэтому успешная детекция клинически значимых соматических мутаций зависит, с одной стороны, от количественной представленности в опухолях клеток, несущих детектируемую мутацию, а с другой - от чувствительности используемой системы детекции. В силу этого существует необходимость использования высокочувствительных методических подходов для скрининга низких титров соматических мутаций при лечении онкологических заболеваний.

Цель данного исследования состояла в скрининге клинически значимых активирующих соматических мутаций в гене *KRAS*, титр которых находится за пределами детекции рутинных методов RT-PCR, путем использования высокочувствительного метода капельной цифровой ПЦР (ddPCR). Наличие/отсутствие мутаций в гене *KRAS* может служить предиктивным

фактором прогнозирования лекарственной чувствительности/устойчивости клеток меланомы.

Материал и методы исследования

В данное исследование включены 10 биоптатов образцов доброкачественных неоплазий кожи и образцы меланомы кожи, полученные от 26 пациентов Юга России. Все образцы ДНК проходили первичный скрининг на предмет наличия/отсутствия *BRAF*-мутаций V600E с использованием набора реактивов «Real-time-PCR-BRAF-V600E» («Биолинк», Новосибирск), имеющего 5%-ный уровень чувствительности. По результатам тестирования образцы разделились на группу *BRAF* WT (не имеющие мутаций в гене *BRAF*) и группу образцов *BRAF* MT (имеющие мутации в гене *BRAF*). Все пациенты проходили плановое лечение в Клиническом онкологическом диспансере № 1 МЗ КК (г. Краснодар) и ДГКБ МЗ КК (г. Краснодар). ДНК для исследования была получена из FFPE-блоков с использованием набора реагентов ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega, USA). Предварительная оценка концентрации и амплификабельности препаратов ДНК проводилась методом RT-PCR с использованием набора реагентов «XY-Детект» («Синтол», Россия). Концентрация ДНК в образцах нормализовывалась до уровня, соответствующего уровню амплификабельности нативной ДНК, равному 2 нг/мкл.

Высококочувствительный скрининг наличия/отсутствия 7 активирующих соматических мутаций (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V и G13D) во втором экзоне гена *KRAS* и мутаций V600 (V600E, V600K и V600R) в гене *BRAF* проводили методом Digital Droplet PCR (ddPCR) с использованием наборов ddPCR *KRAS* Screening Multiplex Kit (Bio-Rad, USA) и *BRAF* V600 Screening Kit (Bio-Rad, USA) соответственно. Исследование проведено с соблюдением всех принципов ICH GCP. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты исследования и обсуждение

В образцах исследованных нами доброкачественных новообразований кожи с использованием метода ddPCR активирующие соматические мутации в генах *BRAF* и *KRAS* не обнаружены. Таким образом, полученные в данном разделе экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в изученных нами образцах неоплазий кожи наличие активирующих соматических мутаций в генах *BRAF* и *KRAS* не является механизмом селективного отбора клонов клеток с повышенной пролиферативной активностью на стадии доброкачественного новообразования.

Результаты наших дальнейших экспериментов наглядно демонстрируют (рис. 1), что содержание активирующих соматических мутаций в гене *KRAS* в группах пациентов *BRAF* (MT) и *BRAF* (WT) существенно различается. В образцах биоптатов меланомы кожи *BRAF*

(WT) медиана содержания копий ДНК с активирующими мутациями в гене *KRAS* в 6 раз превышает аналогичный показатель для группы пациентов *BRAF* (MT).

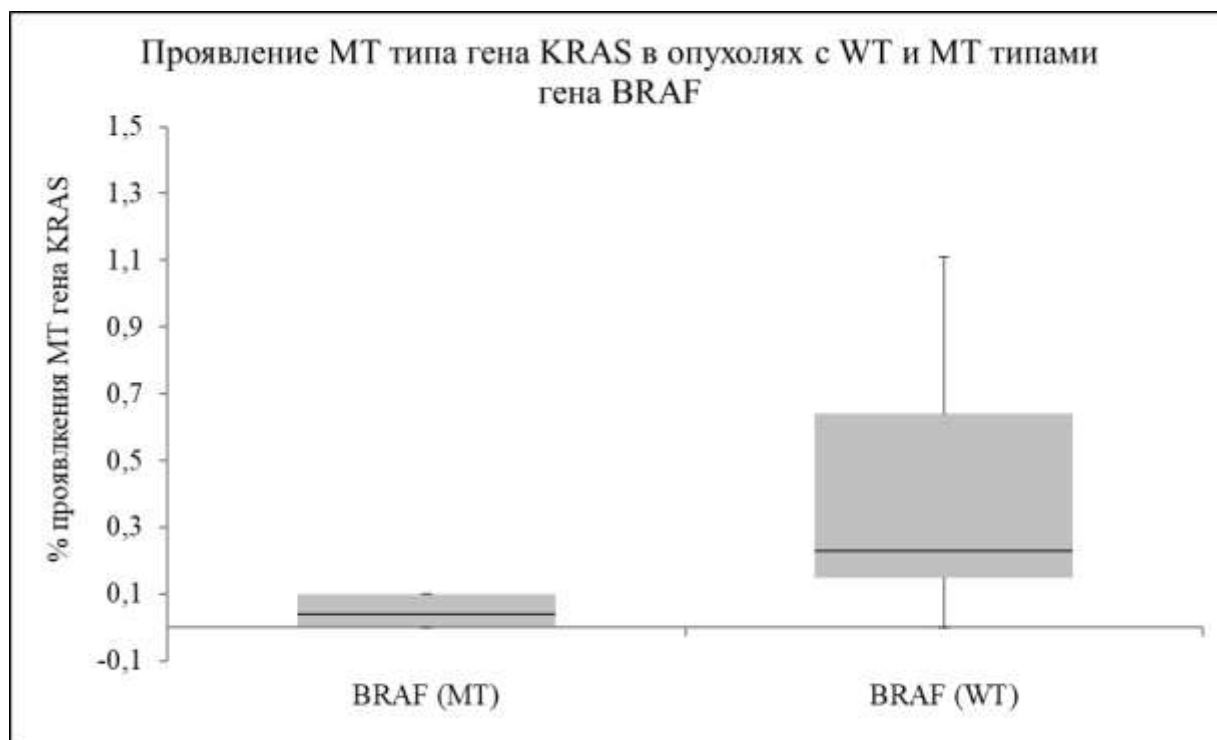
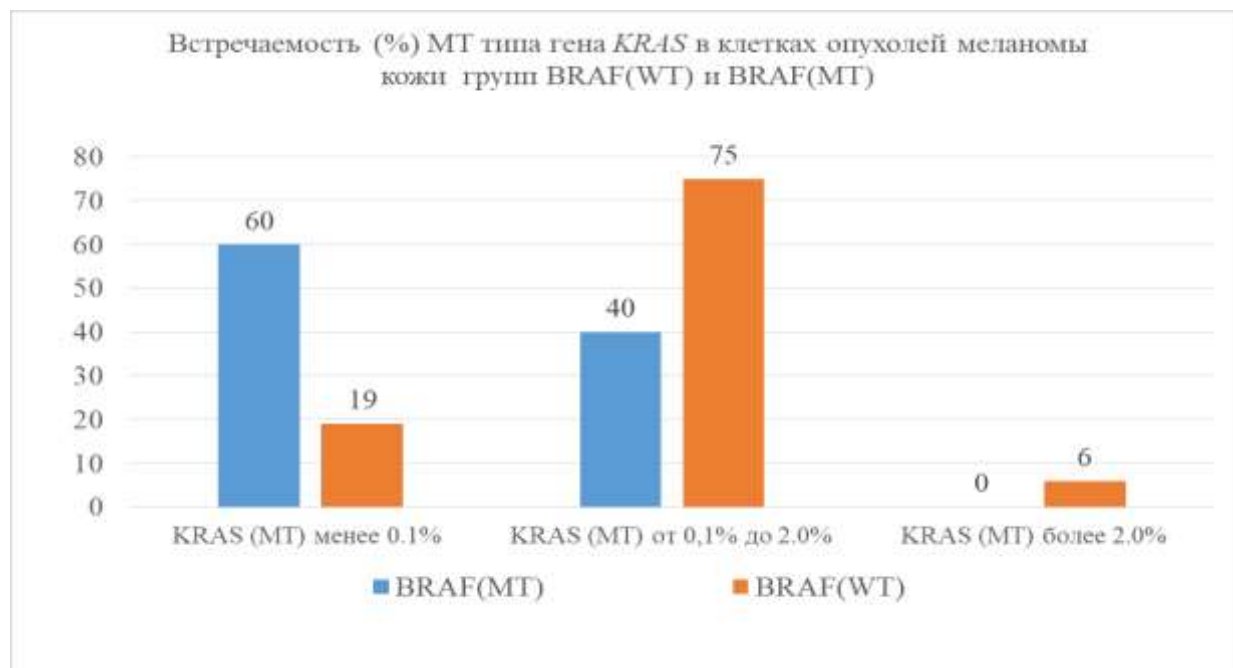


Рис. 1. Экспериментальные данные (медианы значений), полученные методом *ddPCR*, отражающие процентное содержание мутантного типа гена *KRAS*(MT) в биоптатах пациентов с меланомой кожи

При использовании теста Kruskal-Wallis доказаны статистически достоверные различия между медианами значений уровней соматических мутаций в гене *KRAS* для групп опухолевых биоптатов, *BRAF*(MT) и *BRAF*(WT) для $p\text{-value}=2,1\%$. При использовании теста Манна-Уитни с коррекцией Bonferoni-Sidak доказано статистически достоверное различие между значениями средних арифметических для уровней соматических мутаций в гене *KRAS* для групп *BRAF*(MT) и *BRAF*(WT) для $p\text{-value}=1,1\%$.

Нужно обратить внимание на то, что обнаруженные нами медианные уровни содержания активирующих мутаций в гене *KRAS* (0,04 и 0,24% соответственно для групп *BRAF*(MT) и *BRAF*(WT)) находятся значительно ниже уровня чувствительности детекции рутинных методов RT-qPCR (1-5%) и поэтому не могут быть обнаружены даже такими чувствительными тест-наборами, как «Therascreen® *KRAS* RGQ PCR Kit» (Qiagen). Полученные экспериментальные данные позволяют нам предположить, что опухолевые клетки меланомы кожи при малигнизации приобретающие активирующие соматические мутации в гене *BRAF*, с намного меньшей вероятностью подвержены клональной селекции клеток по признаку возникновения активирующих мутаций в гене *KRAS*. И наоборот, клетки меланомы кожи, не имеющие активирующих мутаций в гене *BRAF*, развиваются по другому

пути активации сигнального пути EGFR→**KRAS**→BRAF: у этих клеток в процессе малигнизации с большей вероятностью отбираются клоны с наличием активирующих мутаций в гене *KRAS*. Это и обеспечивает им необходимый малигнизационный потенциал, даже при отсутствии активирующих мутаций в гене *BRAF*. Одновременный отбор клонов на наличие активирующих мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* менее вероятен, но не исключен полностью: 40% образцов меланомы кожи, вошедших в данное исследование, содержали активирующие соматические мутации в генах *KRAS* и *BRAF* одновременно.



*Рис. 2. Количественное распределение титра мутантных типов гена *KRAS* (в процентах от общего) в группах BRAF(WT) и BRAF(MT). Содержание активирующих мутаций на уровне менее 0,1%, в диапазоне от 0,1 до 2% и более 2%. По оси ординат – частота встречаемости данной группы событий среди всех образцов*

На рисунке 2 представлены экспериментальные данные, демонстрирующие распределение пациентов на группы с различной количественной представленностью (%) активирующих соматических мутаций в гене *KRAS*. Так, например, 60% образцов меланомы кожи группы BRAF(MT) имеют титр активирующих мутаций в гене *KRAS*, не превышающий уровня 0,1% от всех регистрируемых событий, а 40% образцов меланомы кожи группы BRAF(WT) имели титр мутаций в гене *KRAS* в диапазоне от 0,1 до 2%, и ни один образец (0%) не содержал титра мутаций в гене *KRAS*, превышающего 2% от всех регистрируемых событий. Это свидетельствует о том, что в образцах меланомы кожи группы BRAF(MT) возникновение активирующих соматических мутаций в гене *KRAS* менее вероятно в силу того, что клональная

селекция клеток при малигнизации преимущественно пошла по другому механизму: отбор клонов с наличием активирующих мутаций в гене *BRAF*.

При отсутствии активирующих соматических мутаций в гене *BRAF* в исследованных образцах меланомы кожи (рис. 2) количественное распределение мутаций в гене *KRAS* носило диаметрально противоположный характер: 75% всех зарегистрированных мутационных событий в гене *KRAS* находились в количественном диапазоне от 0,1 до 2% и 6% от всех зарегистрированных событий - в диапазоне более 2%. Эти данные подтверждают наше предположение о том, что в клетках меланомы кожи с наличием активирующих мутаций в гене *BRAF* активирующие мутации в гене *KRAS* возникают не только с меньшей вероятностью, но и в значительно меньших количествах.

Избирательное ингибирование BRAF является стандартным терапевтическим подходом при лечении прогрессирующей меланомы кожи у пациентов с наличием активирующих соматических мутаций в гене *BRAF*. Тем не менее только приблизительно 50% пациентов с меланомой кожи имеют активирующие мутации в гене BRAF, детектируемые рутинными методами. Увеличение выживаемости без прогрессирования этого заболевания и общей выживаемости после применения ингибиторов BRAF является весьма скромным [10]. Поэтому было предложено несколько механизмов устойчивости к ингибиторам BRAF [11]. Одним из прогнозов устойчивости к ингибиторам BRAF является то, что механизмы усиления димеризации RAF (aRAF, bRAF и cRAF) приводят к возникновению лекарственной устойчивости. К ним относятся изменения, которые повышают активность белков RAS, поскольку канонический механизм димеризации и активации RAF зависит от RAS. Изоформы RAS играют значительную роль в генезе онкологических заболеваний человека, а новые технологии привели к разработке перспективных способов ингибирования передачи сигналов RAS [12-14].

В нашем исследовании мы наглядно продемонстрировали, что в клетках меланомы кожи пациентов Юга России наряду с активирующими мутациями V600 в гене *BRAF* с частотой от 40 до 80% детектируются активирующие мутации в гене *KRAS*, которые не могут быть зарегистрированы рутинными методами RT-PCR с чувствительностью 5%. Наличие низкого титра клонов клеток с активирующими мутациями в гене *KRAS* может служить резервным механизмом быстрого возникновения лекарственной устойчивости клеток меланомы кожи к таргетной терапии. Поэтому использование ингибиторов KRAS в сочетании с ингибированием BRAF может быть эффективным клиническим подходом, в том числе предиктивным, с целью блокирования приобретения лекарственной устойчивости клетками меланомы. Приобретенная устойчивость к ингибиторам BRAF в клетках меланомы кожи зависит от динамической регуляции экспрессии и наличия активирующих мутаций в гене

KRAS (а также в других генах семейства *RAS*). Гены *RAS* вызывают последующую активацию АКТ (серин/треонин-специфичных протеин киназ). Этот негативный эффект имеющейся или приобретенной лекарственной устойчивости может быть преодолен с помощью ингибиторов *KRAS* и поэтому является дополнительной стратегией при лечении меланомы кожи [15].

Выводы

Результаты нашего исследования наглядно демонстрируют, что от 40 (группа пациентов с *BRAF* МТ) до 80% (группа пациентов с *BRAF* WT) образцов меланомы кожи пациентов Юга России содержали активирующие соматические мутации в гене *KRAS*, которые не могли быть детектированы рутинными методами RT-PCR с чувствительностью на уровне 5%. Наличие активирующих мутаций в гене *KRAS* (генах *RAS*) канонически способствует димеризационной активации RAF-компонентов сигнального пути. Это является одним из механизмов малигнизации клеток кожи и возникновения у них резервных механизмов приобретения и проявления лекарственной устойчивости. Причиной этого является внутриопухолевая клеточная гетерогенность, проявляющаяся в присутствии минорных опухолевых клеточных клонов, изначально устойчивых к лекарственной терапии, применяемой к основной опухолевой массе. В условиях применения таргетных и/или химиопрепаратов эти клоны могут получать селективное преимущество, обеспечивая лекарственную устойчивость и прогрессию роста опухоли. Следовательно, для повышения подбора эффективных таргетных препаратов и преодоления быстрого приобретения лекарственной устойчивости клетками меланомы кожи необходим множественный скрининг активирующих мутаций в целевых генах на уровне чувствительности детекции не менее чем 0,5%.

Список литературы

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. (редакторы). Злокачественные новообразования в России в 2017 году (Заболеваемость и смертность). Москва, 2018. 250 с.
2. Водолажский Д.И., Куцын К.А., Панина С.Б., Енин Я.С., Кит О.И., Солдаткина Н.В., Бурцев Д.В., Шапошников А.В. Влияние возрастного и гендерного статуса пациентов Юга России с колоректальным раком на мутационный статус гена *KRAS* // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2017. № 3-2 (195-2). С. 11-21.
3. Кит О.И., Водолажский Д.И., Ефимова И.Ю., Златник Е.Ю., Кочуев С.С. Связь клинико-морфологических особенностей и мутационного статуса гена *BRAF* в качестве прогностического фактора у больных меланомой кожи // Медицинская генетика. 2016. Т. 15.

№ 6 (168). С. 19-24.

4. Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Timoshkina N.N., Vladimirova Y.L., Turkin I.N., Kutsyn K.A., Enin Y.S., Panina S.B., Jurisic V. *EGFR* mutations and tumor metastases in patients with non-small cell lung cancer in the south of Russia. *Journal of B.U.ON.* 2017. Vol. 22. no 6. P. 1410-1415.

5. Кит О.И., Водолажский Д.И., Ефимова И.Ю., Златник Е.Ю., Кочуев С.С. Связь клинико-морфологических особенностей и мутационного статуса гена *BRAF* в качестве прогностического фактора у больных меланомой кожи // *Медицинская генетика.* 2016. Т. 15. № 6 (168). С. 19-24.

6. Chapuis A.G., Lee S.M., Thompson J.A., Roberts I.M., Margolin K.A., Bhatia S. et al. Combined IL-21-primed polyclonal CTL plus CTLA4 blockade controls refractory metastatic melanoma in a patient. *J Exp Med.* 2016 Vol. 213. P. 1133–1139.

7. Водолажский Д.И., Покудина И.О., Шкурат М.А., Мотевосян М.С., Меньшенина А.П., Двадненко К.В. Использование Дендритных клеток в онкологии // *Валеология.* 2015. № 1. С. 68-76.

8. Lito P., Rosen N., Solit D.B. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med.* 2013. Vol. 19. P. 1401–1409.

9. Maertens O., Johnson B., Hollstein P., Frederick D.T., Cooper Z.A., Messiaen L., Bronson R.T., McMahon M., Granter S., Flaherty K., Wargo J.A., Marais R., Cichowski K. Elucidating distinct roles for NF1 in melanoma genesis. *Cancer Discov.* 2013. Vol. 3. P. 338–349.

10. Luke J.J., Ott P.A. New developments in the treatment of metastatic melanoma - role of dabrafenib-trametinib combination therapy. *Drug Healthc Patient Saf.* 2014. Vol. 6. P. 77–88.

11. Monsma D.J., Cherba D.M., Eugster E.E., Dylewski D.L., Davidson P.T., Peterson C.A., Borgman A.S., Winn M.E., Dykema K.J., Webb C.P., MacKeigan J.P., Duesbery N.S., Nickoloff B.J., Monks N.R. Melanoma patient derived xenografts acquire distinct Vemurafenib resistance mechanisms. *Am J Cancer Res.* 2015. Vol. 5. P. 1507–1518.

12. McCormick F. *KRAS* as a therapeutic target. *Clin Cancer Res.* 2015. Vol. 21. P. 1797–1801.

13. Cox A.D., Der C.J., Philips M.R. Targeting RAS membrane association: back to the future for anti-RAS drug discovery? *Clin Cancer Res.* 2015. Vol. 21. P. 1819–1827.

14. Stephen A.G., Esposito D., Bagni R.K., McCormick F. Dragging Ras back in the ring. *Cancer Cell.* 2014. Vol. 25. P. 272–281.

15. Dietrich P., Kuphal S., Spruss T., Hellerbrand C., Bosserhoff A.K. Wild-type *KRAS* is a novel therapeutic target for melanoma contributing to primary and acquired resistance to BRAF inhibition. *Oncogene.* 2018. Vol. 37(7). P. 897-911.