

УДК 616.5-006.81:575.224.22
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-3-226–231](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-226-231)

Сочетание мутаций генов *BRAF* и *NRAS* в пределах одной опухоли у пациентов с меланомой кожи

Аксененко М.Б., Аверчук А.С., Рукша Т.Г.

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого)
Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

РЕЗЮМЕ

До недавнего времени считалось, что мутации в генах *BRAF* и *NRAS* являются взаимоисключающими и не встречаются в пределах одной опухоли. В последующем было выявлено, что данные мутации могут наблюдаться вместе, но это по-прежнему является достаточно редким явлением.

Цель исследования – определить возможность сочетания взаимоисключающих мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* и проанализировать взаимосвязь мутационного статуса опухоли с экспрессией мутантного белка *NRAS*.

Материалы и методы. Определение мутации *BRAF* V600E в опухоли проводилось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а во 2-м и 3-м экзоне гена *NRAS* – методом секвенирования по Сенгеру. Оценка экспрессии белка *NRAS* дикого типа осуществлялась методом иммуногистохимии.

Результаты. Выявлены мутации в 15-м экзоне гена *BRAF* с.1799T>A (V600E) и во 2-м экзоне гена *NRAS* p.G13S (с.37 G>A). Уровень экспрессии не мутантного белка *NRAS* в обоих случаях различался. У одного пациента, несмотря на наличие мутации в гене *NRAS*, в менее чем 5% опухолевых клеток нормальный белок не экспрессировался.

Заключение. Данный феномен можно связать с возможными эпигенетическими нарушениями экспрессии генов на посттранскрипционном уровне.

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

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа поддержана госзаданием «Разработка методов детекции и идентификация мутаций гена *cKIT* на основе технологий ПЦР в реальном времени и секвенирования для выбора средств персонализированной терапии меланомы».

Для цитирования: Аксененко М.Б., Аверчук А.С., Рукша Т.Г. Сочетание мутаций генов *BRAF* и *NRAS* в пределах одной опухоли у пациентов с меланомой кожи. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (3): 226–231. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-3-226–231](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-226-231).

УДК 616.5-006.81:575.224.22
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-3-226–231](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-226-231)

The combination of mutations in *BRAF* and *NRAS* genes within a one tumor in patients with cutaneous melanoma

Aksenenko M.B., Averchuk A.S., Ruksha T.G.

✉ Аксененко Мария Борисовна, e-mail: aksenenko_mariya@mail.ru.

Krasnoyarsk State Medical University n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky (KrasSMU n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky) 1, P. Zheleznyaka Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

ABSTRACT

The paper provides a clinical description and analysis of two melanoma cases with mutations in the *BRAF* and *NRAS* gene within one tumor. Until recently, it was believed that mutations in the *BRAF* and *NRAS* genes are exclusive and do not occur within the same tumor. Later it was revealed that these mutations can exist within one tumor, but this is still quite a rare phenomenon. Molecular genetic analysis of the tumor obtained from both patients showed a mutation in the 15 exon of the *BRAF* gene c.1799T>A (V600E) and exon 2 of the *NRAS* p.G13S gene (p.37 G>A). The expression level of non-mutant NRAS protein was different in both cases. In conclusion, so in one patient, despite the presence of a mutation in the *NRAS* gene, the level of expression of the non-mutant protein was absent, which can be related to possible posttranscriptional disorders in the regulation of gene expression.

Key words: melanoma of the skin, *BRAF*, *NRAS*, mutations.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was supported by the state assignment “Development of detection methods and identification of cKIT gene mutations based on real-time PCR and sequencing technologies for choosing personalized melanoma therapy”.

For citation: Aksenenko M.B., Averchuk A.S., Ruksha T.G. The combination of mutations in *BRAF* and *NRAS* genes within a one tumor in patients with cutaneous melanoma. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (3): 226–231. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-226-231>.

ВВЕДЕНИЕ

Сигнальный каскад MAPK, состоящий из RAS-RAF-МЕК-ERK протеинкиназ, участвует в регуляции множества важных функций в клетке, таких как пролиферация, дифференцировка, миграция, апоптоз [1]. Усиленная активация сигнального пути MAPK может быть вызвана мутациями в генах *RTK*, *HRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *NF1* [2]. Наличие активирующих мутаций в одном из вышеперечисленных генов не приводит к нарушению проведения сигнала внутрь клетки, так как другие участники данного сигнального каскада берут на себя данную функциональную роль. Около 25% всех злокачественных опухолей имеют нарушения регуляции сигнального каскада MAPK, связанные с увеличением продукции активирующих лигандов, а также наличием активирующих мутаций в генах семейств RTKs, RAS и RAF [3]. При меланоме кожи нарушения в MAPK сигнальном каскаде связаны, как правило, с активирующей мутацией в гене *BRAF* в 50% случаев или с мутацией в гене *NRAS* в 15% случаев [4]. Данный факт демонстрирует важность контроля регуляции MAPK в гомеостазе меланоцитов. До недавнего времени считалось, что мутации в генах *BRAF* и *NRAS* являются взаимоисключающими, что может быть связано с развитием в данном случае самоиндуцированного апоптоза,

вызываемого стойкой гиперактивацией сигнального каскада MAPK [5].

В литературе последних лет появились данные о том, что мутации в генах *BRAF* и *NRAS* не являются взаимоисключающими и могут встречаться вместе [5]. Выявлено, что обе эти мутации могут существовать в небольшой области (около 10 тыс. клеток), выделенных путем лазерной микродиссекции [6]. Несмотря на вышеперечисленные аргументы, сочетание данных мутаций является достаточно редким событием. Проведенное исследование было направлено на определение мутационного статуса в генах *BRAF* и *NRAS* у больных меланомой кожи. Пациенты находились на лечении в КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского».

Цель данного исследования – определение возможности сочетания взаимоисключающих мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* и анализ взаимосвязи мутационного статуса опухоли с экспрессией немутантного белка NRAS. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить сочетание мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* в пределах одной опухоли у пациентов с меланомой кожи.

2. Описать иммуногистохимическую картину экспрессии белка NRAS дикого типа у больных с различным NRAS-мутантным статусом.

3. Проанализировать взаимосвязь сочетания мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* с экспрессией немутантного белка *NRAS*.

Анализ мутации *BRAF* V600E осуществлялся методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием набора Real-Time-PCR-BRAF V600E (Биолинк, Россия). Мутационный статус опухоли определялся при расчете разницы (ΔC_t) между C_t образца в реакции со специфичными V600E праймерами и C_t того же образца в контрольной реакции. Образец ДНК расценивался как положительный (т.е. содержащий мутацию), если ΔC_t образца $\leq \Delta C_t$ положительного стандарта, содержащего 1% ДНК с мутацией.

Определение мутационного статуса 2-го и 3-го экзона гена *NRAS* проводилось методом секвенирования по Сенгеру. На первом этапе исследования проводилась постановка реакции амплификации ПЦР. Для приготовления ПЦР-смеси использовали набор Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия). Последовательность праймеров для гена *NRAS* была следующей: Forward 5'-ATAGCATTGCATTCCTGTG; Reverse 5'-GCGGATATTAACCTCTACAGG. Условия ПЦР (*NRAS*): предварительная денатурация 95 °С – 3 мин, далее денатурация 95 °С – 30 с, отжиг 54 °С – 40 с, элонгация 72 °С – 40 с; всего 38 циклов, в завершении финальная элонгация 72 °С – 3 мин.

Для постановки иммуногистохимической реакции была использована безбиотинная система детекции REVEAL Biotin-Free Polyvalent (Spring, BioScience, США). В качестве первичных антител применялись моноклональные антитела, клон AT2G9 (antibodies-online, США). Визуализацию продукта реакции проводили хромогеном АЕС (амино-этил-корбазол) (Sigma, США). Подсчет положительно окрашенных клеток выполняли при увеличении $\times 600$ с помощью микроскопа Olympus VX-41, программа Infinity Capture, камера Lumenera Corporation и Software V.4.6.0.

Клинический случай № 1. Пациентка К., 35 лет, диагноз «меланома кожи левого бедра, метастазы в паховые лимфатические узлы слева». Толщина опухоли по Бреслоу составила 4,46 мм. Больной было выполнено иссечение опухолевого узла, а также пахово-подвздошная лимфаденэктомия слева. У данной пациентки выявлено наличие мутации в гене *BRAF* p.V600E (с.1799 T>A), связанной с заменой глутамата на валин в положении 600 (рис. 1), также мутации *NRAS* p.G13S (с.37 G>A), приводящей к замене глицина на серин в 13-м положении.

Multicomponent Plot

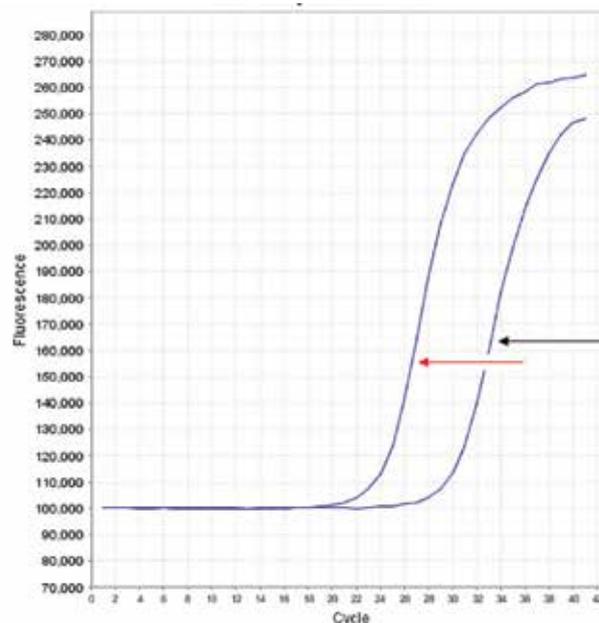


Рис. 1. Определение наличия мутации *BRAF* V600E методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Детекция мутации *BRAF* V600E, ДНК с мутацией (красная стрелка), ДНК без мутации (черная стрелка)

Fig. 1. Allele-specific real-time PCR for *BRAF* gene V600E mutation identification, mutated DNA (red arrow), wild-type DNA (black arrow)

Вышеуказанная нуклеотидная замена затрагивала менее 5% мутантных клеток и была определена в реакции секвенирования с обогащением мутантным аллелем (рис. 2, а, б). В 3-м экзоне гена *NRAS* у данной пациентки не было обнаружено нуклеотидных замен. Для оценки уровня экспрессии белка *NRAS* проводилось иммуногистохимическое определение экспрессии белка *NRAS* дикого типа. Определено отсутствие экспрессии вышеуказанного белка как в клетках опухоли, так и в клетках стромального микроокружения (рис. 3).

Клинический случай № 2. Пациент Н., 48 лет, диагноз «меланома межлопаточной области, метастазы в лимфатические узлы шеи, туловища и конечностей». Молекулярно-генетический статус данного больного был аналогичен первому пациенту: выявлено присутствие мутаций *BRAF* V600E и *NRAS* G13S.

Имуногистохимическое исследование экспрессии немутантного белка *NRAS* выявило наличие положительного окрашивания в опухолевых клетках (красного цвета) и наличие негативного окрашивания в опухоль-ассоциированных лимфоцитах синего цвета (рис. 4).

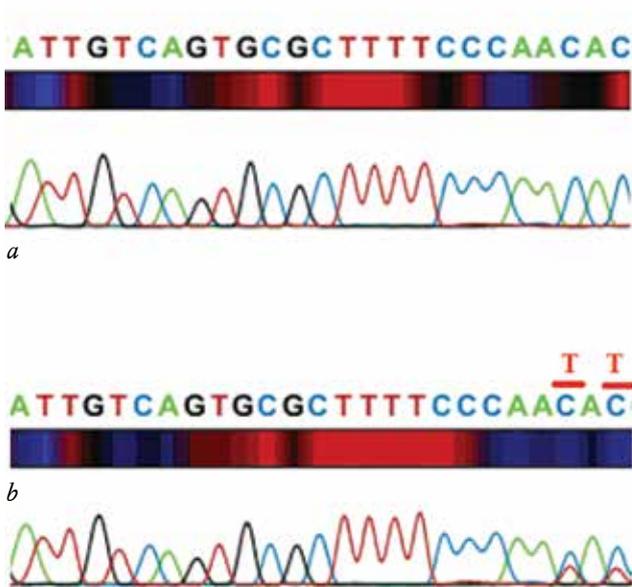


Рис. 2. Определение мутации в гене *NRAS* методом секвенирования по Сенгеру: *a* – без обогащения мутантным аллелем (визуализируется хроматограмма дикого типа); *b* – с обогащением мутантным аллелем (определяется нуклеотидная замена p.G13S (с.37 G>A)). Хроматограмма выполнена с обратного праймера

Fig. 2. Detection of the mutation in *NRAS* gene by Sanger sequencing; *a* – without enrichment of a mutant allele (shows a wild-type DNA chromatogram); *b* – with enrichment of mutant allele. (the nucleotide substitution of p.G13S (с.37 G>A)). The chromatogram was performed with the reverse primer

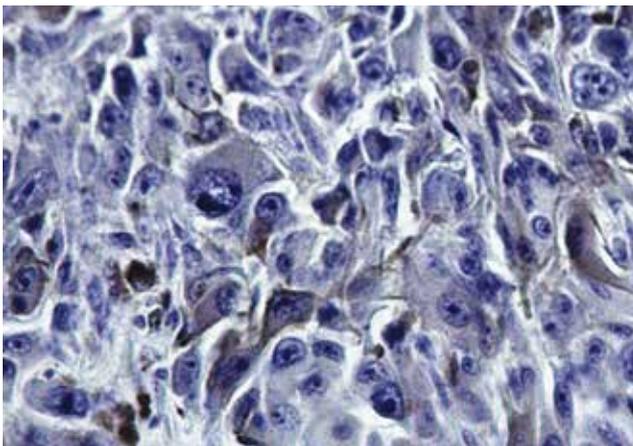


Рис. 3. Негативное иммуногистохимическое окрашивание с антителами к немутантному *NRAS* у пациента, имеющего менее 5% мутантных клеток, $\times 400$

Fig. 3. Immunohistochemical staining with antibodies to non-mutant *NRAS*. $\times 400$. Negative immunohistochemical staining with antibodies to *NRAS* wild-type. The patient has less than 5% mutant cells, $\times 400$

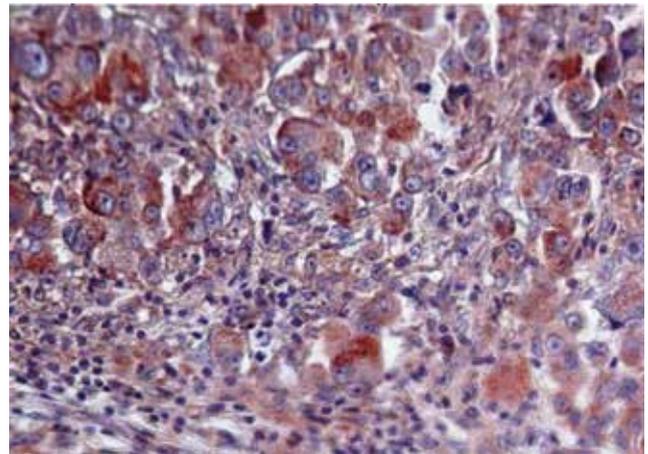


Рис. 4. Позитивное иммуногистохимическое окрашивание с антителами к немутантному *NRAS*, $\times 400$

Fig. 4. Immunohistochemical staining with antibodies to non-mutant *NRAS*, $\times 400$. Positive immunohistochemical staining with antibodies to *NRAS* wild-type, $\times 400$

Мутационные изменения при меланоме кожи затрагивают гены *BRAF* и *NRAS*, однако в 95% врожденных невусов наблюдаются подобного рода изменения [7]. Высокая распространенность *BRAF*-мутации отмечается и при диспластических невусах [8]. Большой процент мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* в невусах доказывает то, что активация MAPK-киназного сигнального каскада из-за возникновения мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* не является достаточной для злокачественной трансформации [9]. *BRAF*-мутации способствуют злокачественной гиперплазии меланоцитов, но без дополнительных мутаций не способны инициировать процесс канцерогенеза. В частности, усиленная экспрессия онкогенных *BRAF* и *NRAS* в нормальных меланоцитах невуса запускает в них процессы апоптоза и параллельно с этим ограничивает процессы пролиферации [10]. Вместе с тем наличие таких драйверных мутаций, как *BRAF* и *NRAS*, является триггерным фактором в опухолевой трансформации нормальных клеток, ведет к образованию первичного опухолевого клона. Драйверные мутации создают генетическую нестабильность и приводят к появлению вторичных мутаций, под влиянием которых могут появляться уже новые субклоны опухолевых клеток, которые будут, в том числе, устойчивыми к химиотерапии. Драйверная мутация создает идеальную мишень для таргетных («целевых») препаратов, поскольку установлено, что жизнеспособность опухолевой клетки зависит от наличия драйверных мутаций, которые «блокируют» другие механизмы

биологической регуляции в клетках [11]. К числу драйверных мутаций относят мутации в 600-м положении гена *BRAF*, а также в 12-, 13- и 61-м положениях гена *NRAS*.

У пациента из клинического случая № 1 незначительное содержание мутантных опухолевых клеток в образце соответствовало негативной иммуногистохимической реакции в отношении белка *NRAS*. У пациента из клинического случая № 2 наличие высокого числа мутантных клеток при секвенировании не было связано с уровнем *NRAS*. Различия белковой экспрессии *NRAS* у двух пациентов можно объяснить воздействием эпигенетических факторов на уровень белка. В качестве эпигенетических регуляторов экспрессии генов могут выступать микроРНК. Изменения экспрессионного профиля различных микроРНК способны оказывать влияние на экспрессию их генов-мишеней, среди которых могут быть гены *BRAF* и *NRAS*, а также регуляцию сигнальных каскадов с участием гена *NRAS*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение мутационного статуса опухоли является важной составляющей частью персонализированного подхода в терапии пациентов онкологического профиля. Выявление у больного с меланомой кожи мутации *BRAF* V600E является критерием, который должен учитываться при отборе пациентов для проведения таргетной терапии *BRAF*-ингибиторами. Детекция мутации в гене *NRAS* G13S (с.37 G>A) была описана COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=571>), но, по данным литературы, она не имеет четко выраженной взаимосвязи с различными клинико-морфологическими данными пациентов, а также дальнейшим исходом заболевания.

В этой связи данный факт может не иметь важного прогностического значения в вопросе дальнейшей тактики ведения описанных пациентов, но при этом наглядно демонстрирует проявления внутриопухолевой гетерогенности на молекулярно-генетическом уровне. Наличие небольшого процента опухолевых клеток, имеющих мутации, может быть показателем того, что внутри опухоли существуют различные малые субпопуляции опухолевых клеток, которые эволюционируют по мере прогрессирования заболевания и проявляют генотипические и фенотипические различия, в частности появление *NRAS*-мутантных клеток на фоне уже имеющихся *BRAF*-мутантных опухолевых клеток. Из-за этих различий опухолевых субклонов одна и та же опухоль может обладать различными механизмами

химиотерапевтической резистентности у одного и того же пациента. Существуют данные о том, что появление мутации в гене *NRAS* может быть также связано с применением *BRAF*-ингибиторов у пациентов с меланомой кожи в 18% случаев [12]. Различия в экспрессии немутантного белка *NRAS* могут быть связаны с постгеномными нарушениями в опухоли первого пациента.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Sun Y., Liu W.Z., Liu T., Feng X., Yang N., Zhou H.F. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Recept Signal Transduct. Res.* 2015; 35 (6): 600–604. DOI: 10.3109/10799893.2015.1030412.
2. Palmieri G., Ombra M., Colombino M., Casula M., Sini M., Manca A., Paliogiannis P., Ascierio P.A., Cossu A. Multiple molecular pathways in melanomagenesis: Characterization of Therapeutic Targets. *Front Oncol.* 2015; 10 (5): 183. DoiDOI: 10.3389/fonc.2015.00183.
3. Hymowitz S.G., Malek S. Targeting the MAPK Pathway in RAS Mutant Cancers. *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 2018; 8 (11). pii: a031492. DOI: 10.1101/cshperspect.a031492.
4. Thomas N.E., Edmiston S.N., Orlow I., Kanetsky P.A., Luo L., Gibbs D.C., Parrish E.A., Hao H., Busam K.J., Armstrong B.K., Krickler A., Cust A.E., Anton-Culver H., Gruber S.B., Gallagher R.P., Zanetti R., Rosso S., Sacchetto L., Dwyer T., Ollila D.W., Begg C.B., Berwick M., Conway K., GEM Study Group. Inherited Genetic Variants Associated with Melanoma BRAF/NRAS Subtypes. *Invest Dermatol.* 2018; 138 (11): 2398–2404. DOI: 10.1016/j.jid.2018.04.025.
5. Stones C.J., Kim J.E., Joseph W.R., Leung E., Marshall E.S., Finlay G.J., Shelling A.N., Baguley B.C. Comparison of responses of human melanoma cell lines to MEK and BRAF inhibitors. *Front Genet.* 2013; 8 (4): 66. DOI: 10.3389/fgene.2013.00066.
6. Chiappetta C., Proietti I., Soccodato V., Puggioni C., Zaralli R., Pacini L., Porta N., Skroza N., Petrozza V., Potenza C., Della Rocca C., Di Cristofano C. BRAF and NRAS mutations are heterogeneous and not mutually exclusive in nodular melanoma. *Appl. Immun. Mol. Morphol.* 2015; 23 (3): 172–177. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000071.
7. Etchevers H.C., Rose C., Kahle B., Vorbringer H., Fina F., Heux P., Berger I., Schwarz B., Zaffran S., Macagno N., Krengel S. Giant congenital melanocytic nevus with vascular malformation and epidermal cysts associated with a somatic activating mutation in BRAF. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018; 31 (3): 437–441. DOI: 10.1111/pcmr.12685.
8. Roh M.R., Eliades P., Gupta S., Tsao H. Genetics of Melanocytic Nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015; 28 (6): 661–672. DOI: 10.1111/pcmr.12412.

9. Xia J., Jia P., Hutchinson K.E., Dahlman K.B., Johnson D., Sosman J., Pao W., Zhao Z. A meta-analysis of somatic mutations from next generation sequencing of 241 melanomas: a road map for the study of genes with potential clinical relevance. *Mol. Cancer Ther.* 2014; 13 (7): 1918–1928. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0804.
10. Francis J.H., Grossniklaus H.E., Habib L.A., Marr B., Abramson D.H., Busam K.J. BRAF, NRAS, and GNAQ mutations in conjunctival melanocytic Nevi. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018; 59 (1): 117–121. DOI: 10.1167/iov.17-22517.
11. Tímár J., Vizkeleti L., Doma V., Barbai T., Rásy E. Genetic progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2016; 35 (1): 93–107. DOI: 10.1007/s10555-016-9613-5.
12. Raaijmakers M.I., Widmer D.S., Narechania A., Eichhoff O., Freiburger S.N., Wenzina J., Cheng P.F., Mihic-Probst D., Desalle R., Dummer R., Levesque M.P. Co-existence of BRAF and NRAS driver mutations in the same melanoma cells results in heterogeneity of targeted therapy resistance. *Oncotarget.* 2016; 7 (47): 77163–77174. DOI: 10.18632/oncotarget.12848.

Сведения об авторах

Аксененко Мария Борисовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической физиологии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID iD 0000-0001-7660-700X.

Аверчук Антон Сергеевич, канд. биол. наук, доцент, кафедра патологической физиологии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID ID 0000-0002-1284-6711.

Рукша Татьяна Геннадьевна, д-р мед. наук, зав. кафедрой патологической физиологии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID ID 0000-0001-8142-4283.

(✉) **Аксененко Мария Борисовна**, e-mail: aksenenko_mariya@mail.ru.

Author information

Aksenenko Mariya B., PhD, Assistant of Professor, Department of Pathological Physiology, KrasSMU n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7660-700X.

Avershuk Anton S., PhD, Assistant of Professor, Department of Pathological Physiology, KrasSMU n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation. ORCID ID 0000-0002-1284-6711.

Ruksha Tatiana G., DM, Head of Department of Pathophysiology, KrasSMU n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-8142-4283.

(✉) **Aksenenko Mariya B.**, e-mail: aksenenko_mariya@mail.ru.

Поступила в редакцию 14.07.2018
Подписана в печать 11.06.2019

Received 14.07.2018
Accepted 11.06.2019