

УДК 616-006.81.04

МУТАЦИИ ОНКОГЕНОВ В МЕЛАНОМЕ КОЖИ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

И.В. Цыганова, О.А. Анурова, Н.Н. Мазуренко

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

Ключевые слова: меланома кожи, локализация и гистологический тип клеток меланомы, мутации BRAF, NRAS, KIT

Меланома — наиболее злокачественное заболевание кожи, которое отличается клинической и молекулярной гетерогенностью. Основная роль в патогенезе меланомы кожи принадлежит MAPK-сигнальному пути, гиперактивация которого в первую очередь происходит вследствие мутации BRAF и NRAS. Цель работы состояла в анализе мутаций онкогенов в 96 образцах меланомы кожи различной локализации. Мутации BRAF выявлены в 60,4%, NRAS в 15,6% и KIT 1% опухолей, большинство из которых были метастазы меланомы. Частота мутаций BRAF значительно выше в образцах меланомы туловища и конечностей (69%), чем в случаях меланомы лица и головы (44%), подверженных хроническому УФ-облучению. Мутации NRAS чаще выявлялись в опухолях на лице (33%), а также нижних конечностях (28%), чем в меланоме туловища. Мутация BRAF обнаружена у 70% пациентов моложе 40 лет, тогда как средний возраст пациентов с мутацией NRAS составил 62 года. Большинство меланом кожи имеют эпителиоидный фенотип, и в них частота мутаций BRAF и NRAS выше, чем в веретенноклеточных и невоидных меланоме. При сравнении частоты мутаций онкогенов в меланоме кожи с различной пигментацией, а также в поверхностно-распространяющихся и меланоме с узловым ростом существенных отличий не обнаружено. Таким образом, мутации BRAF и NRAS ассоциированы с локализацией, гистологическим типом опухоли и возрастом пациентов.

В последнее время достигнуты значительные успехи в понимании молекулярных механизмов возникновения и развития меланомы и наметился реальный прогресс в лечении пациентов с метастатической меланомой. Улучшение результатов лечения стало возможным благодаря применению таргетной терапии, блокирующей основные сигнальные пути [1, 2].

В патогенез меланомы вовлечены онкогены и гены-супрессоры, входящие в состав различных сигнальных каскадов. Основная роль в патогенезе меланомы кожи принадлежит MAPK-сигнальному пути (RAS/RAF/MEK/ERK) — ключевому регулятору клеточной пролиферации, дифференцировки, выживания и метастазирования. Гиперактивация MAPK-сигнального пути в меланоме кожи в первую очередь происходит вследствие мутации генов BRAF и NRAS [1–3]. Клинико-патологические характеристики меланом с мутациями BRAF и NRAS различаются [4, 5]. Активирующие мутации протеинкиназы BRAF характерны для меланомы кожи, не подверженной хроническому ультрафиолетовому

облучению, тогда как мутации ГТФ-азы NRAS чаще встречаются в образцах меланомы на участках кожи с повреждениями, вызванными хронической инсоляцией. Частота мутантного NRAS выше в акральной меланоме и меланоме слизистых оболочек, а также во врожденных меланоцитарных невусах с повышенным риском трансформации в меланому [6]. Мутации гена KIT не встречаются одновременно с мутациями NRAS или BRAF. Мутации рецептора KIT, обладающего тирозинкиназной активностью, являются специфичными для акральной меланомы и меланомы слизистых оболочек, а в меланоме кожи встречаются в 2% случаев на участках тела, подверженных хроническому солнечному облучению и повреждению [3, 7].

Тестирование мутаций онкогенов BRAF, NRAS и KIT в первичных опухолях или метастазах меланомы крайне важно для выбора тактики лечения больных и для определения мишеней таргетной терапии с целью назначения препаратов [1, 2]. Для лечения меланомы с 2011 г. разрешен к применению вемурафениб, блокирующий димеризацию протеинкиназы BRAF с мутацией V600E, а с 2014 г. дабрафениб, который ингибирует BRAF, блокируя АТФ-связывающий сайт киназного домена BRAF с мутацией V600E/K [1, 2]. Вемурафениб и дабрафениб, ингибируя мутантную протеинкиназу BRAF, блокируют

Адрес для корреспонденции

Наталья Николаевна Мазуренко
E-mail: nnmazurenko@mail.ru

МАРК-сигнальный путь, предотвращая фосфорилирование протеинкиназ MEK и ERK [1–3].

Ввиду того, что ингибирование RAS белков пока невозможно и поскольку при мутациях NRAS клетки меланомы для передачи сигнала используют преимущественно не BRAF, а CRAF [8], для лечения метастатической меланомы с мутацией NRAS наиболее обещающим является применение препаратов, ингибирующих MEK (траметиниб, биниметиниб, кобиметиниб) [1, 2, 6, 9]. В последнее время наилучшие результаты при лечении метастатической меланомы кожи получают при комбинированном применении препаратов, ингибирующих BRAF и MEK (дабрафениб + траметиниб или вемурафениб + кобиметиниб) [10].

В случае мутации рецепторной тирозинкиназы KIT эффект имеет применение тирозинкиназных ингибиторов иматиниба, десатиниба, нилотиниба [1, 2, 7].

В настоящей работе проведен анализ мутаций генов *BRAF*, *NRAS* и *KIT* в образцах первичной и метастатической меланомы кожи с целью определения чувствительности к препаратам таргетной терапии. Представляло интерес сопоставление генетических данных с некоторыми клинико-морфологическими характеристиками пациентов.

Материалы и методы

В исследование включены препараты первичной либо метастатической меланомы кожи от 96 пациентов, получавших лечение в ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России в 2013–2016 гг. Морфологическая характеристика и гистологическая верификация опухолевой ткани проведены в отделении патологической анатомии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Препараты ДНК получали из опухолевых клеток, собранных в результате макродиссекции депарафинизированных срезов опухо-

левых биопсий. Анализ мутаций онкогенов *BRAF*, *NRAS* и *KIT* проводили в ПЦР с последующим секвенированием ПЦР-продуктов на ABI PRISM 3100-Avant с помощью реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator Vol.3.1 [11].

Результаты и обсуждение

В исследование включены образцы меланомы кожи от 93 пациентов и 3 случая акральной меланомы. Точная локализация первичной опухоли была известна для 68% пациентов: в 32% случаев первичная локализация меланомы осталась неизвестна (см. таблицу). У 30 пациентов была меланома туловища (спины, груди и передней брюшной стенки), у 23 — меланома конечностей и 9 человек имели меланому кожи лица или шеи. Большинство исследованных образцов представляли собой метастазы меланомы чаще всего в лимфоузлы, легкие, кожу, печень, мягкие ткани, головной мозг. Препараты первичной меланомы поступили только от 15 пациентов, 10 из которых были моложе 40 лет.

Среди пациентов было 47 (49%) мужчин и 49 женщин. Возраст пациентов варьировал от 14 до 84 лет, исключение составил мальчик в возрасте 4 мес с меланозитозом и меланомой на фоне врожденного невуса. Данные о наличии предшествовавшего меланоме невуса имелись в 15 случаях.

Анализ мутаций в 93 образцах меланомы кожи выявил мутации BRAF в 60,4%, NRAS в 15,6% и KIT в 1% случаев (см. таблицу). В образцах метастазов меланомы без известного первичного очага частота мутаций онкогенов отличалась незначительно (BRAF 54,8% и NRAS 9,7%), что подтверждает поставленный диагноз метастаза меланомы кожи.

Наиболее высокая частота мутаций BRAF выявлена в образцах меланомы туловища (80%) и верхних и нижних конечностей (13 из 23; 56,5%). Если суммировать эти данные, то мутации BRAF выявлены в

Таблица. Частота мутаций в меланоме кожи различной локализации

Образцы ткани	Количество	Частота мутаций			
		BRAF	NRAS	KIT	WT
Всего	96	58 (60,4%)	15 (15,6%)	1 (1%)	22 (22,9%)
Меланома кожи	93	58 (62,3%)	13 (14%)	1 (0,5%)	21 (22,6%)
Меланома кожи спины	25	20 (80%)	1 (4%)	0	4 (16%)
Меланома кожи груди, брюшной стенки	5	4 (80%)	0	0	1 (20%)
Меланома кожи лица, шеи, головы	9	4 (44,4%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)
Меланома кожи верхних конечностей	9	8 (88,8%)	1 (11,2%)	0	0
Меланома кожи нижних конечностей	14	5 (35,7%)	4 (28,6%)	0	5 (35,7%)
Метастазы меланомы без известного первичного очага	31	17 (54,8%)	3 (9,7%)	0	11 (35,4%)
Акральная меланома	3	0	2		1

69,8% (37 из 53) случаев меланомы кожи на участках тела, закрытых для хронического ультрафиолетового облучения, что согласуется с данными литературы. Однако любопытно, что частота мутации BRAF в образцах меланомы верхних конечностей составила 88,8%, хотя мутации BRAF обнаружены в 5 из 8 случаев меланомы кисти и предплечья, которые часто открыты для инсоляции. В то же время частота мутаций BRAF в образцах меланомы нижних конечностей всего 35,7%, возможно, из-за того, что большинство меланом расположено на голени. В 9 образцах меланомы на открытых участках кожи лица и головы мутации BRAF обнаружены только в 44% случаев.

В 93,5% меланомы кожи обнаружена мутация в экзоне 15 *BRAF* в кодоне 600: c1799 T>A (GTG>GAG), приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту (V600E) на уровне белка BRAF. Помимо V600E обнаружены 3 опухоли с заменой валина на лизин в кодоне 600 (V600K), две меланомы с мутацией в кодоне 601 — замена лизина на глутаминовую кислоту (K601E) и одна меланома с мутацией в кодоне 597 — замена лейцина на глутамин (L597Q). Известно, что при редких мутациях D594V, L597R/S/Q, K601E активность протеинкиназы BRAF составляет лишь 30% от активности фермента с мутацией V600E [1, 3].

Мутации NRAS выявлены в 17% случаев меланомы кожи. Частота мутаций в опухолях на закрытых для хронического ультрафиолетового облучения участках кожи туловища и конечностей составляет 11,3%, при этом мутации выявлены в 3 случаях меланомы голени. В образцах меланомы на лице мутации NRAS выявлены в 33,3% (см. таблицу). Подавляющее число мутаций (86,6%) локализованы в 3-м экзоне NRAS. Наиболее распространены замены Q61K/R (глутамин на лизин и аргинин, реже на лейцин Q61L). Помимо этого в 2 случаях первичной меланомы кожи выявлены мутации во 2-м экзоне *NRAS* в кодоне G12C (замена глицина на цистеин). Мутации во 2-м экзоне гена *NRAS* находят на ранних стадиях заболевания, и поэтому считается, что они вовлечены в инициацию меланомы. Мутации в 3-м экзоне *NRAS* обнаруживают на более поздних этапах, и скорее всего они участвуют в метастазировании меланомы [6].

Мутация *KIT* обнаружена только в одном случае у пациентки с меланомой кожи нижней губы и привела к замене V559A в регуляторном домене рецептора KIT.

При изучении мутантного статуса акральной меланомы в 2 из 3 случаев выявлены мутации NRAS, мутации BRAF отсутствовали (см. таблицу). Мутации в 11-, 13- и 17-м экзонах *KIT* также не обнаружены, хотя, по литературным данным, мутации KIT характерны для акральной меланомы [7].

Представлялось интересным проанализировать частоту мутаций онкогенов в меланомах в зависимости от возраста пациента. Наибольшая частота мутаций BRAF (70%) наблюдалась в возрастной группе до 40 лет (14 из 20). Напротив, все пациенты с мутациями NRAS были старше 50 лет, средний возраст пациентов с меланомой кожи — 62 года, а с акральной меланомой — 72 года. Исключение составил мальчик в возрасте 4 мес с меланоцитозом и меланомой кожи шеи, возникшей вследствие трансформации врожденного невуса.

В 15 случаях меланомы, возникшей на фоне невуса, отмечается высокая частота мутаций BRAF (11 из 15; 73%) и NRAS (3 из 15; 20%). Как известно, значительная часть меланом кожи возникает при трансформации предсуществующих доброкачественных меланоцитарных невусов, многие из которых содержат мутантные BRAF или NRAS. Невусы могут десятилетиями оставаться без изменений, для их малигнизации нужны дополнительные генетические нарушения, в частности, активация PI3K-AKT-mTOR пути либо инактивация гена-супрессора *CDKN2A/p16^{INK4a}* [12]. Очевидно, для прогрессии невуса в меланому потребовались дополнительные события: у ряда молодых людей 16–35 лет причиной трансформации невуса могло быть избыточное ультрафиолетовое облучение, у 50-летнего ликвидатора чернобыльской аварии — радиоактивное облучение. У трех пожилых людей меланомы возникли на фоне диспластического невуса. Нередко прогрессия невуса может быть следствием травмирования, в том числе и одеждой.

У подавляющего числа пациентов меланома кожи пигментирована, и только у 21% пациентов меланома беспигментная или малопигментная. Нами не выявлено существенных различий в частоте мутации BRAF (61%) и NRAS (11%) в беспигментных и пигментированных меланомах. Известно, что узловые формы меланомы с вертикальным типом роста характеризуются высокой агрессивностью. Результаты анализа мутаций BRAF и NRAS (65 и 15% соответственно) в образцах узловой меланомы показали, что частота мутаций BRAF и NRAS в узловых и меланомах с поверхностно распространенным ростом существенно не различается.

Был также проанализирован спектр мутаций онкогенов в образцах меланомы кожи с различными гистологическими характеристиками. Эпителиоидноклеточные меланомы и меланомы со смешанным фенотипом встречались значительно чаще (70%), чем веретенноклеточные и невоидноклеточные. При этом частота мутаций BRAF и NRAS (67 и 23%) выше в эпителиоидноклеточных меланомах, чем в веретенноклеточных и невоидноклеточных, большинство из которых содержали BRAF и NRAS дикого типа. Возможно, мутантный статус коррелирует с гистологическим типом меланомы, однако это

предположение требует дополнительного исследования большей выборки меланомы кожи.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют, что мутантный статус меланомы кожи различается в зависимости от локализации опухоли, возраста пациента и ассоциирован с определенным гистологическим типом опухолевых клеток. Полученные результаты важны для выбора тактики лечения различных вариантов меланомы и используются для назначения препаратов таргетной терапии. Меланомы с мутацией V600E/K BRAF чувствительны к ингибиторам вемурафенибу и дабрафенибу [1, 2, 9, 10], тогда как меланомы с мутацией L597Q или K601E нечувствительны к ингибиторам BRAF, но отвечают на терапию при использовании ингибитора MEK траметиниба [13]. При мутациях NRAS также возможно назначение ингибиторов MEK (траметиниб, биниметиниб, кобиметиниб). Наличие в меланоме кожи мутации в 11-м экзоне KIT указывает на чувствительность опухоли к тирозинкиназному ингибитору иматинибу.

**Работа выполнена при поддержке гранта
Российского научного фонда (№ 14-35-00107).**

ЛИТЕРАТУРА

1. Мазуренко Н.Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи. Молекулярный канцерогенез. Под ред. Красильникова М.А., Зборовской И.Б. М., 2016, с. 253-273.
2. Rajkumar S., Watson I.R. Molecular characterization of cutaneous melanoma: creating a framework for targeted and immune therapies. *British J. Cancer*. 2016, v. 115, No. 2, p. 145-155.
3. Bello D.M., Ariyan C.E., Carvajal R.D. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer Control*. 2013, v. 20, No. 4, p. 261-281.
4. Platz A., Egyhazi S., Ringborg U., Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Molecular Oncology*. 2008, v. 1, No. 4, p. 395-405.
5. Ellenrhorst J., Greene V.R., Ekmekcioglu S. et al. Clinical correlations of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2011, v. 17, No. 2, p. 229-235.
6. Fedorenko I.V., Gibney G.T., Keiran S.M. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*. 2013, v. 32, No. 25, p. 3009-3018.
7. Beadling C., Jacobson-Dunlop E., Hodi F.S. et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin. Cancer Res*. 2008, v. 14, No. 21, p. 6821-6828.
8. Dumaz N. Mechanism of RAF isoform switching induced by oncogenic RAS in melanoma. *Small GTPases*. 2011, v. 2, No. 5, p. 289-292.
9. Grimaldi A.M., Simeone E., Festino L. et al. Novel mechanisms and therapeutic approaches in melanoma: targeting the MAPK pathway. *Discovery Medicine*. 2015, v. 19, No. 107, p. 455-461.
10. Larkin J., Ascierto P.A., Dreno B. et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF — mutated melanoma. *N. Engl. J. Med*. 2014, v. 371, No. 20, p. 1867-1876.
11. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Лушникова А.А. и соавт. Спектр мутаций онкогенов различается в субтипах меланомы кожи. *Молекулярная биология*. 2015, т. 59, № 6, с.1022-1029.
12. Vredeveld L.C., Possik P.A., Smit M.A. et al. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev*. 2012, v. 26, No. 10, p. 1055-1069.
13. Bowyer S.E., Rao A.D., Lyle M. et al. Activity of trametinib in K601E and L597Q BRAF mutation-positive metastatic melanoma. *Melanoma Res*. 2014, v. 24, No. 5, p. 504-508.

Статья поступила 17.10.2016 г., принята к печати 07.11.2016 г.
Рекомендована к публикации Б.Ю. Боханом

ONCOGENE MUTATIONS IN CUTANEOUS MELANOMAS OF DIFFERENT ORIGIN

Tsyganova I.V., Anurova O.A., Mazurenko N.N.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Key words: cutaneous melanoma, melanoma body site and histologic type, BRAF, NRAS, KIT mutations

Melanoma is the most lethal malignancy of skin, which is characterized with clinical and molecular heterogeneity. The main role in melanoma carcinogenesis belongs to mitogen-activated protein kinase MAPK signaling pathway, which is hyperactivated mostly due to BRAF and NRAS mutations. Aim of the study was the analysis of oncogene mutations in melanomas of different origin. BRAF mutations were found in 60,4%, NRAS in 15,6% and KIT in 1% of tumor samples, most of which were regional metastases. The frequency of BRAF mutations were higher in tumors developed on trunk and extremities (69%), then in melanomas located on face and head with chronic UV exposure (44%). NRAS mutations were more common in melanomas on face (33%) and low extremities (28%), then in tumors on trunk. BRAF mutations were found in 70% of patients younger 40 years while the median age for the group of patients with NRAS mutations was 62 years. There were no differences in frequency of oncogene mutations observed in pigmented and amelanotic tumors, as well as superficial spreading and nodal melanomas. Cutaneous melanomas have prevalently epithelioid phenotype and BRAF и NRAS mutation frequencies in epithelioid melanomas were higher than in spindle cell and nevoid ones. Thus BRAF и NRAS mutations are associated with location of primary melanoma, histologic type of tumor and age of patients.