

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 616.5-006.81-081.1:575.224]-036

Клиническая характеристика меланомы кожи и слизистых оболочек в зависимости от наличия мутации L576P гена *c-KIT*

Комина А.В., Аксененко М.Б., Палкина Н.В., Моторина А.В., Рукуша Т.Г.

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, 660022, г. Красноярск

*На сегодняшний день доказано влияние мутаций в гене *c-KIT* на прогрессию меланомы. Однако четкой взаимосвязи между наличием мутаций и особенностями протекания меланомы не установлено. Цель настоящего исследования – выявление корреляции между наличием мутации L576P в клетках меланомы и особенностями ее локализации и прогрессии. Исследованы образцы первичной меланомы с локализацией на участках тела, подверженных хроническому воздействию ультрафиолетового излучения, а также в области слизистых и ладоней и подошв. Мутация L576P выявлена у 3 (16%) из 19 пациентов с меланомами, при этом все мутации обнаружены в меланомах с локализацией на предплечье. Показано, что мутация L576P не оказывает влияния на характер развития меланомы (толщина опухоли по Бреслоу, характер интраопухолевого лимфоцитарного инфильтрата, наличие пигмента, изъязвления).*

Ключевые слова: меланома; *c-KIT*; рецептор тирозинкиназы; CD117.

Для цитирования: Комина А.В., Аксененко М.Б., Палкина Н.В., Моторина А.В., Рукуша Т.Г. Клиническая характеристика меланомы кожи и слизистых оболочек в зависимости от наличия мутации L576P гена *c-KIT*. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2015; 18(6): 4-7.

CLINICAL CHARACTERISTICS OF CUTANEOUS AND MUCOSAL MELANOMA AND *c-KIT* GENE L576P MUTATION

Komina A.V., Aksenenko M.B., Palkina N.V., Motorina A.V., Ruksha T.G.

V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, 660022, Krasnoyarsk, Russia

*The impact of mutations in *c-KIT* gene for melanoma progress is now a proven fact. However, no clear-cut relationship between the presence of a mutation and melanoma course has been detected. We attempted detection of a correlation between L576P mutation in melanoma cells and its location and progress. The objects of the study were specimens of primary melanoma in sites, exposed to chronic UV irradiation as well as on mucosa membranes, on the palms and soles. Mutation L576P was detected in 3 (16%) of 19 patients with melanomas; all mutations were found on the melanomas located in the forearm. Mutation L576P was inessential for the characteristics of melanoma (tumor thickness according to Breslow, type of intratumorous lymphocytic infiltration, presence of pigment and ulcerations).*

Key words: melanoma; *c-KIT*; tyrosine kinase receptor; CD117.

Citation: Komina A.V., Aksenenko M.B., Palkina N.V., Motorina A.V., Ruksha T.G. Clinical characteristics of cutaneous and mucosal melanoma and *c-KIT* gene L576P mutation. *Russian journal of skin and venereal diseases (Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney)*. 2015; 18(6): 4-7. (in Russian)

Рецептор *c-KIT*, известный также как рецептор тирозинкиназы, или CD117, представляет собой трансмембранный белок с тирозинкиназной активностью. Он является белком семейства тирозинкиназ

Сведения об авторах:

Комина Анна Владимировна, кандидат биол. наук (komivlann@yandex.ru); Аксененко Мария Борисовна, кандидат мед. наук (aksenenko_mariya@mail.ru); Палкина Надежда Владимировна, ассистент (mosmannv@yandex.ru); Моторина Анна Викторовна, аспирант (kozlovaa.v@mail.ru); Рукуша Татьяна Геннадьевна, доктор мед. наук (tatyana_ruksha@mail.ru).

Corresponding author:

Ruksha Tatiana, MD, PhD, DSc (tatyana_ruksha@mail.ru).

типа III и играет важную роль в поддержании жизнеспособности клеток, принимает участие в регуляции пролиферации, роста, развития и дифференцировки клеток, а также в формировании гамет и образовании меланина [1, 2]. Рецептор *c-KIT* широко распространен в гематопозитических клетках, стволовых клетках, клетках зародыша, тучных клетках, а также меланоцитах.

Белок *c-KIT* был обнаружен в 1987 г. как протеин, гомологичный вирусному онкогену *v-KIT*, выделенному в 1986 г. из ретровируса кошачьей саркомы HZ4 [3]. Дальнейшие исследования данного белка показали его участие в важных путях передачи сигнала в клетке [4]: PI3 сигнальный путь связан с

ангиогенезом тканей и выживаемостью клеток [5], PLC- γ сигнальный каскад обеспечивает пролиферацию выживание клеток, SRC – регулирует одновременно выживаемость клеток, их пролиферацию и подвижность [6], JAK/STAT-механизм передачи сигнала вовлечен в процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза [7], а сигнальный путь RAS/ERK осуществляет контроль за миграцией, ангиогенезом и пролиферацией клеток [8]. Именно эти важнейшие клеточные процессы оказываются измененными при развитии злокачественных новообразований.

Ген *c-KIT* располагается в длинном (q) плече 4-й хромосомы, в положении 11–12 и является эволюционно высоко консервативным. Протяженность гена составляет 90 тыс.п.о., он включает 21 экзон, а молекулярная масса кодируемого им белка – 145 кД [4]. При этом белок подразделяют на три основных домена: внеклеточный домен, обеспечивающий присоединение лиганда и состоящий из пяти иммуноглобулиноподобных доменов D1–D2–D3–D4–D5 (экзоны 2–9), трансмембранный домен (экзон 10) и внутриклеточный домен, включающий в себя два малых домена – околосмембранный (juxtamembrane domain – JM-домен) и тирозинкиназный. Передача сигнала осуществляется при активации рецептора путем связи лиганда SCF с участком внеклеточного домена D1–D3. Это приводит к димеризации белка в регионе D4–D5, аутофосфорилированию рецептора и запуску связанных сигнальных путей.

Исследования показали, что на функционирование рецептора *c-KIT* оказывают влияние мутации в кодирующем его гене. При этом наиболее мутабельными признаны домены D4–D5 (экзоны 8 и 9), JM-домен (экзон 11) и тирозинкиназный (экзон 17). В этих регионах отмечают различные типы мутаций: делеции, инсерции, однонуклеотидные замены. Одни из них могут приводить к утрате функции рецептора тирозинкиназы, проявляясь в виде нарушений пигментации, другие приводят к постоянной активации рецептора, не требующей лиганда, что влечет за собой непрерывный рост и пролиферацию клеток [4]. Именно эти мутации становятся особенно важными при развитии опухолей. Показано, что около 95% опухолей пищеварительного тракта проявляют повышенную экспрессию *c-KIT*, при этом от 20 до 80% этих случаев вызвано наличием мутаций в гене [2]. Экспрессия *c-KIT* встречается у 68% больных острым миелолейкозом, у 80% – в периоды обострения хронического миелолейкоза. При этом экспрессия коррелирует со сниженной выживаемостью больных, сокращая шансы на выздоровление [9, 10].

Участие *c-KIT* в образовании меланина связано с биологией меланоцитов и развитием меланомы. Меланома состоит из нескольких молекулярных подтипов, каждый из которых может обладать уникальными свойствами, комплексом мутаций и по-разному реагировать на одинаковую терапию [11]. Согласно результатам исследований [12], около 36% первичных меланом положительно окрашиваются иммуногистохимически на *c-KIT* и, как правило, это обусловлено наличием мутаций в гене.

Охарактеризован ряд мутаций гена *c-KIT*, имеющих влияние на течение меланомы. При этом показано, что активирующие мутации в данном гене чаще всего встречаются в увеальных, акрально-лентигинозных меланоммах, меланоммах слизистых и меланоммах, возникающих на открытых участках кожи. Одним из наиболее подверженных мутациям считают 11-й экзон гена, кодирующий JM-домен. В нем обнаруживают мутации 1669T>C (W557R), 1674G>C (K558N), 1676T>C (V559A), 1676T>A (V559D), 1696A>G (N566D), 1706T>G (V569G), 1727T>C (L576P) [12]. В большей степени они способствуют активации рецептора без участия лиганда, что приводит к непрерывному неконтролируемому росту и пролиферации клеток, уклонению от апоптоза и миграции. При этом показано, что наличие мутаций может способствовать повышенной чувствительности меланомы к терапии препаратами – ингибиторами тирозинкиназ, таким как иматиниб, дазатиниб, сунитиниб, сорафениб [12–14].

Одной из наиболее часто встречаемых и перспективных для изучения мутаций в клетках меланомы считается однонуклеотидная замена T1727C, располагающаяся в 11-м экзоне гена и приводящая к аминокислотной замене L576P на участке белка, формирующем околосмембранный JM-домен внутри клетки. Частота встречаемости данной мутации в клетках меланомы составляет 25–29% от всех KIT-мутаций и до 44% – от мутаций в 11-м экзоне [15]. При этом максимальная ее встречаемость приходится на акрально-лентигинозную меланому слизистых. Позднее было выявлено, что меланома кожи при локализации на участках тела, подверженных хроническому воздействию УФ-излучения, также характеризуется сравнительно высоким процентом встречаемости мутации L576P. На сегодняшний день известно, что данная мутация приводит к значительному повышению уровня экспрессии KIT [15], и в то же время мутантные клетки проявляют высокую чувствительность к терапии специфическими киназными ингибиторами [16, 17], обеспечивая благоприятный прогноз и повышая шансы на ремиссию.

Целью настоящего исследования было определение мутации L576P в 11-м экзоне гена *c-KIT* у больных меланомой кожи и слизистых, проведение анализа связи прогностических клиничко-патоморфологических признаков меланомы с наличием вышеуказанной мутации.

Материалы и методы

Исследование утверждено локальным этическим комитетом и проведено на кафедре патологической физиологии с курсом клинической патофизиологии им. проф. В.В. Иванова ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

В работе использованы биоптаты меланомы ($n = 19$), фиксированные формалином и заключенные в парафиновые блоки. Биоптаты были предоставлены ГБУЗ Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро (Красноярск).

Для выделения геномной ДНК проводили депарафинизацию ткани с помощью ксилола с последующей дву-



Рис. 1. Акрально-лентигинозная меланома первого пальца стопы.

кратной отмывкой этанолом. Для дальнейшего выделения ДНК использовали комплект реагентов ДНК-сорб В («НекстБио», Россия) согласно прилагаемой инструкции. Очищенную ДНК элюировали 50 мкл ТЕ-буфера и хранили при температуре -20°C .

Перед аллельспецифичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли проведение контрольной реакции ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для оценки качества образца. Кроме того, учитывая мутабельность 11-го экзона, данный этап позволял исключить возможность отсутствия реакции из-за наличия мутаций в области посадки праймеров.

Для постановки реакции использовали праймеры и зонд, не затрагивающие мутацию L576P (T1727C), но покрывающие те же участки гена, что и аллельспецифичные праймеры. Для постановки реакции использовали реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии ROX («Синтол», Россия). Реакцию осуществляли на приборе StepOne™ ("Applied Biosystems", Сингапур). Подходящими для аллельспецифичной ПЦР считали образцы с Ct не более 33. Положительными, т.е. имеющими мутацию L576P, считали образцы, у которых отмечен положительный флуоресцентный сигнал в реакции с праймерами, комплементарными мутантной ДНК.

В качестве положительного контроля реакции использовали искусственно синтезированные фрагменты ДНК, клонированные в плазмиду pAL2-TA («Евроген», Россия).

Гистологические препараты меланомы кожи толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Далее при помощи оптического микрометра измеряли толщину опухолевого узла (в миллиметрах). Замеры проводили от шиповатого слоя эпидермиса до нижней границы опухоли строго перпендикулярно ее поверхности. Все измерения производили при увеличении $\times 400$ с помощью микроскопа Olympus BX-41 с видеонасадкой Olympus u-CMAD3 и программного обеспечения Infinity Capture ("Lumenera Corporation", Канада). По шкале Бреслоу все опухоли разделили на четыре класса:

- I – 1 см и менее («тонкие меланомы»);
- II – 1–2 см;
- III – 2–4 см;
- IV – 4 см и более («толстые меланомы»).

Оценку изъязвления опухоли проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Изъязвлением считали отсутствие эпидермиса над опухолью. При этом эрозирование поверхности ткани с сохранением

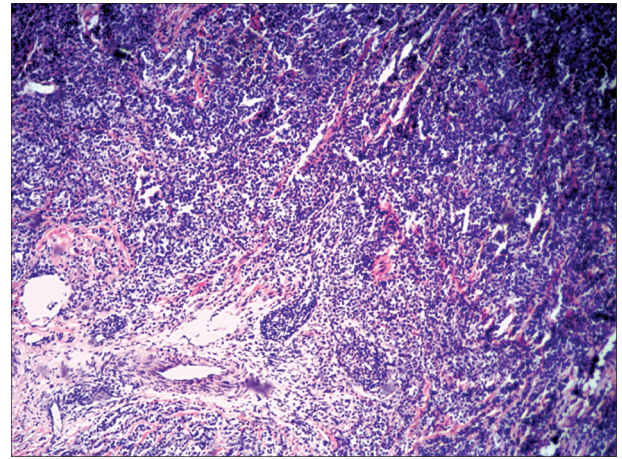


Рис. 2. Гистологическая картина акрально-лентигинозной меланомы кожи.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100.

части слоев эпидермиса не расценивали как изъязвление. В дальнейшем результат оценивали как наличие или отсутствие изъязвления.

Степень пигментации меланомы проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Степень пигментации первичной меланомы расценивали в баллах: 0 баллов (беспигментная меланома) – при данном типе наблюдается отсутствие пигмента в клетках опухоли;

1 балл (слабопигментированная меланома) – определяются единичные гранулы пигмента в опухоли;

2 балла (среднепигментированная) – гранулы пигмента в $\frac{1}{2}$ всех полей зрения;

3 балла (значительно пигментированная) – гранулы пигмента более $\frac{1}{2}$ всех полей зрения, но не во всех полях зрения;

4 балла (резкопигментированная) – гранулы пигмента в каждом поле зрения.

Определение оценки лимфоцитарной инфильтрации проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Для оценки характера статуса лимфоцитарного инфильтрата TILs (Tumor-Infiltrating Lymphocytes) определяли следующие параметры: характер, плотность и распределение TILs. Оценку TILs проводили полуколичественным способом. Характер TILs определяли соответственно следующим критериям: *Brisk*-лимфоциты диффузно инфильтрируют всю ткань опухоли или находятся в основании опухоли; *Non-brisk*-лимфоциты инфильтрируют опухолевую ткань фокально (образуют отдельные очаги); *Absent*-лимфоциты отсутствуют, либо присутствуют, но не проникают в опухоль. Интенсивность (плотность) лимфоцитарного инфильтрата расценивали как выраженную (плотный инфильтрат), умеренную либо скудную.

Статистически обрабатывали результаты с помощью χ^2 и критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Для оценки частоты встречаемости мутации L576P в 11-м экзоне гена *c-KIT* были исследованы 19 биоптатов первичной меланомы с локализацией на участках тела, подверженных хроническому воздействию УФ-излучения (лицо, верхние конечности, а также нижние конечности у лиц женского пола). Помимо этого, идентификацию мутаций осуществляли у пациентов с акрально-лентигинозной меланомой (рис. 1), а также меланомой слизистых оболочек. Мутация L576P выявлена у 3 (16%) из

19 пациентов. Все L576P-положительные опухоли имели локализацию в области предплечий.

Анализ распределения пациентов по возрасту в зависимости от мутационного статуса не выявил различий между сравниваемыми группами. Далее оценивали корреляцию между наличием вышеуказанной мутации у пациента и прогностическими факторами меланомы (толщина опухоли по Бреслоу, характер интраопухолевого лимфоцитарного инфильтрата, наличие пигмента, изъязвления) на основе морфологического исследования гистологических препаратов (рис. 2). Не выявлено связи между вышеуказанными прогностическими факторами и мутационным статусом по L576P.

Является установленным фактом роль *c-KIT*-опосредованного сигналлинга в развитии и прогрессии меланомы. С помощью иммуногистохимических исследований выявлено, что *c-KIT* высоко экспрессируется в нормальных меланоцитах и доброкачественных меланоцитарных новообразованиях кожи [18]. При этом уровень его экспрессии снижается при меланоме и коррелирует со степенью прогрессии опухоли. Помимо этого, недавние исследования определили [19], что при меланоме наблюдаются эпигенетические изменения в промоторе гена *c-KIT*. Интенсивность метилирования показывала обратную связь с активностью промотора и не была связана с наличием каких-либо других изменений в таких хорошо известных молекулярных драйверах опухоли, как BRAF, NRAS, TP53, PTEN, INK4A (p16), ARF (p14), CCND1, MYC, CDK4, MITF [19].

Ранее мы провели анализ клинико-морфологических особенностей BRAF-позитивной меланомы кожи [20], который показал, что BRAF-позитивные меланомы кожи определяются у пациентов более молодого возраста, а также в опухолях с локализацией в области туловища. В проведенном пилотном исследовании прослеживается аналогичная тенденция – отсутствие связи с какими-либо прогностическими факторами меланомы, изменение механизмов внутриклеточной сигнализации в результате мутации в онкогене, специфическая превалирующая локализация опухоли, в случае мутации в гене *c-KIT* – в области ладоней, подошв, слизистых и на участках кожи, подверженной хроническому воздействию УФ-излучения.

Стоит отметить, что основной целью идентификации мутаций при меланоме кожи является последующий выбор специфической противоопухолевой терапии на основе персонализированного подхода, на основе молекулярного подтипа опухоли. Дальнейшие исследования необходимы с целью разъяснения специфических механизмов развития опухоли при каждом отдельном молекулярном подтипе опухоли. При этом оценка прогностической значимости, выявление характера течения заболевания в зависимости от мутационного статуса опухоли является, на первый взгляд, недостаточной для молекулярно-генетического «портрета» опухоли, что не отрицает иных различий между молекулярными подтипами меланомы, в отношении которых прогностическая значимость требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Chen S.Q., Xiong A.Q. The progress and implication of stem cell factor. *Basic Med. Sci. Clin.* 2002; 22(5): 385–90.
- Liang J., Wu Y.L., Chen B.J., Zhang W., Tanaka Y., Sugiyama H. The c-Kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2013; 9(5): 435–43.
- Yarden Y., Kuang W.J., Yang-Feng T., Coussens L., Munemitsu S., Dull T.J., et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987; 6(11): 3341–51.
- Lennartsson J., Rönstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev.* 2012; 92(4): 1619–49.
- Sansal I., Sellers W.R. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22(14): 2954–63.
- Summy J.M., Gallick G.E. Treatment for Advanced Tumors: Src Reclaims Center Stage. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12(5): 1398–401.
- Silva C.M. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene.* 2004; 23(48): 8017–23.
- Yasuda T., Kurosaki T. Regulation of lymphocyte fate by Ras/ERK signals. *Cell Cycle.* 2008; 7(23): 3634–40.
- Shen H.Q., Tang Y.M., Yang S.L., Qian B.Q., Song H., Shi S.W., Xu W.Q. Analysis of CD117 expression on leukemia cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2003; 24(5): 228–30.
- Tsao A.S., Kantarjian H., Thomas D., Giles F., Cortes J., Garcia-Manero G., et al. c-Kit receptor expression in acute leukemias: association with patient and disease characteristics and with outcome. *Leuk. Res.* 2004; 28(4): 373–8.
- Carvajal R.D., Antonescu C.R., Wolchok J.D., Chapman P.B., Roman R.A., Teitcher J., et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA.* 2011; 305(22): 2327–34.
- Beadling C., Jacobson-Dunlop E., Hodi F.S., Le C., Warrick A., Patterson J., et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(21): 6821–8.
- Satzger I., Küttler U., Völker B., Schenck F., Kapp A., Gutzmer R. Anal mucosal melanoma with KIT-activating mutation and response to imatinib therapy: case report and review of the literature. *Dermatology.* 2010; 220(1): 77–81.
- Hodi F.S., Corless C.L., Giobbie-Hurder A., Fletcher J.A., Zhu M., Marino-Enriquez A., et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31(26): 3182–90.
- Torres-Cabala C.A., Wang W.L., Trent J., Yang D., Chen S., Galbincea J., et al. Correlation between KIT expression and KIT mutation in melanoma: a study of 173 cases with emphasis on the acral-lentiginous/mucosal type. *Mod. Pathol.* 2009; 22(11): 1446–56.
- Woodman S.E., Trent J.C., Stemke-Hale K., Lazar A.J., Priol S., Pavan G.M., et al. Activity of dasatinib against L576P KIT mutant melanoma: Molecular, cellular, and clinical correlates. *Mol. Cancer Ther.* 2009; 8(8): 2079–85.
- Antonescu C.R., Busam K.J., Francone T.D., Wong G.C., Guo T., Agaram N.P., et al. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int. J. Cancer.* 2007; 121(2): 257–64.
- Zhu Y.L., Fitzpatrick J.E. Expression of c-kit (CD117) in Spitz nevus and malignant melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 2006; 33(1): 33–7.
- Dahl C., Abildgaard C., Riober-Hasen R., Steiniche T., Lade-Keller J., Guldberg P. KIT is a frequent target for epigenetic silencing in cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2015; 135(2): 516–24.
- Aksenenko M.B., Kirichenko A.K., Ruksha T.G. Russian study of morphological prognostic factors characterization in BRAF-mutant cutaneous melanoma. *Pathol. Res. Pract.* 2015; 211(7): 521–7. doi: 10.1016/j.prp.2015.03.005.

Поступила 02.07.15
Received 02.07.15