

ДЕРМАТООНКОЛОГИЯ

© АКСЕНЕНКО М.Б., РУКША Т.Г., 2018
УДК УДК 616.5-006.81.04-092-076.5-078.3

Аксененко М.Б., Рукша Т.Г.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 И ЕЕ ЗАВИСИМОСТЬ ОТ PPP6C-МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, г. Красноярск, Россия

Матриксная металлопротеиназа-2 (ММП-2) – фермент, принимающий участие в деградации внеклеточного матрикса, инвазии и ангиогенезе в процессе канцерогенеза. При этом известно, что функциональная роль данного фермента зависит от локализации его экспрессии в клетке. Наличие дополнительных мутаций в генах, ассоциированных с драйверными генами BRAF и NRAS, в частности мутаций в гене PPP6C, могут приводить к изменению характера экспрессии металлопротеиназы с цитоплазматической на ядерную и как следствие изменять биологические свойства опухоли.

Материалы и методы. В ходе данной работы был проведен сравнительный анализ экспрессии ядерной матриксной металлопротеиназы-2 у больных меланомой кожи в зависимости от наличия у них мутаций в гене PPP6C. Материалом для исследования послужили образцы опухоли, полученные из парафиновых блоков от больных меланомой кожи, проходивших лечение в КГБУЗ «Красноярский краевой онкологический диспансер». Биоптаты больных меланомой кожи (n = 40) получены в КГБУЗ «Красноярское краевое патологоанатомическое бюро». Проведено определение мутации в 7-м экзоне гена PPP6C методом секвенирования по Сэнгеру с использованием специфичных праймеров. Иммуногистохимическое исследование выполняли по стандартной методике с первичными антителами к ММП-2.

Результаты. Мутации в гене PPP6C были выявлены у 12,5% больных, у всех пациентов имеющих мутацию наблюдались миссенс-мутации: G266R, I271N, P259H, также определялось сочетание двух мутаций в «горячих точках» генов P259L и R264L. Выявлено, что экспрессия ММП-2 у пациентов с PPP6C-мутантным типом опухоли статистически не различалась от опухоли «дикого» типа (p = 0,72). Преимущественная экспрессия ядерной ММП-2 наблюдалась у PPP6C-негативных пациентов, при этом у пациентов имеющих мутации в гене PPP6C, отмечалась преимущественно цитоплазматическая экспрессия ММП-2 (p = 0,045). Выявлено преобладание ядерной экспрессии ММП-2, как прогностически неблагоприятного фактора у PPP6C-негативных пациентов. Данный факт может свидетельствовать о различиях в биологическом поведении для опухолей с разным PPP6C-статусом.

Ключевые слова: меланома кожи; мутации; PPP6C; матриксная металлопротеиназа-2; BRAF.

Для цитирования: Аксененко М.Б., Рукша Т.Г. Внутриклеточная экспрессия матриксной металлопротеиназы-2 и ее зависимость от PPP6C-мутационного статуса при меланоме кожи. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2018; 21(1): 4-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2018-21-1-4-9>

Aksenenko M.B., Ruksha T.G.

EXPRESSION OF NUCLEAR MATRIX METALLOPROTEINASE-2 IN PATIENTS WITH CUTANEOUS MELANOMA DEPENDING ON THE AVAILABILITY OF MUTATIONS IN THE PPP6C GENES

Department of Pathophysiology, Krasnoyarsk State Medical University n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

Material and methods. Tumor samples from paraffin blocks of melanoma patients obtained from Krasnoyarsk Territorial Oncologic Center were used in the study. Skin tissue samples (n = 40) were received from the Krasnoyarsk Territorial Pathological Anatomy Bureau. The mutation in the exon 7 of the PPP6C gene was determined by the Sanger sequencing method using specific primers. Immunohistochemistry was performed based on a standard technique using primary anti-matrix metalloproteinase-2 antibodies.

Results. Mutations in the gene PPP6C were detected in 12.5% of patients; in all patients with mutation, missense mutations were observed: G266R, I271N, P259H, and a combination of two mutations in the hot spots of the P259L and R264L gene were also determined. It was found that the expression of MMP-2 in patients with a PPP6C mutant tumor type was not similar to a wild type tumor patients (p = 0.72). The predominant expression of nuclear MMP-2 is observed in PPP6C-negative patients, while in patients with

mutations in the PPP6C gene, the cytoplasmic expression of MMP-2 was predominant ($p = 0.045$). We also found a predominance of nuclear MMP-2 expression, as a prognostically unfavorable factor, for patients in the PPP6C of negative group.

Both of these facts may be related to the fact that this mutation does not affect other signaling mechanisms not associated with the BRAF and NRAS genes, nor does it directly affect the expression pattern of MMP-2.

Key words: skin melanoma; mutations; PPP6C; matrix metalloproteinase-2; BRAF.

For citation: Aksenenko M.B., Ruksha T.G. Expression of nuclear matrix metalloproteinase-2 in patients with cutaneous melanoma depending on the availability of mutations in the PPP6C genes. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Bolezney)*. 2018; 21(1): 4-9. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2018-21-1-4-9>

Acknowledgments. The reported study was funded by RFBR according to the research project N 16-34-00461 mol_a. (part of the work on the sequencing and analysis of these mutations in the PPP6C gene in patients with skin melanoma). Project "Development of methods for detection and identification of c-KIT gene mutations based on real-time PCR and sequencing for the selection of means for personalized therapy of skin melanoma" (the genomic DNA of patients was isolated).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 26 Nov 2017

Accepted 21 March 2018

Исследование генетического портрета опухоли любого гистогенеза представляет собой перспективное направление в области молекулярной онкологии, принципиально меняющее дальнейший подход к терапии онкологических заболеваний.

Исследования полногеномного секвенирования образцов ткани меланомы кожи, проводимые в последние годы, выявили, что преобладающим типом мутаций при поверхностно распространяющейся и узловой формах данной опухоли являются мутации в генах *BRAF* и *NRAS*; для меланом с локализацией в области ладоней, подошв, и на слизистых оболочках более характерными являются мутации в гене *c-KIT* [1]. Позднее были идентифицированы новые гены, мутации в которых встречаются при меланоме кожи, в частности гены *PPP6C* и *RAC* [2]. Все вышеуказанное послужило поводом к формированию подтипов меланом в соответствии с мутационным профилем опухоли, среди которых выделяют отдельно *BRAF/NRAS*-негативные меланомы, характеризующиеся высокой мутационной нагрузкой, наличием одно-типных нуклеотидных замен, а именно заменой *C>T* (цитозина на тимин), дупликациями нуклеотидов, а также возможным наличием мутаций в генах *c-KIT* и *NF1* [3]. Позднее был выделен ещё один молекулярно-генетический подтип, а именно *NRAS/BRAF/NF1*-негативные меланомы [4].

Кроме того были идентифицированы гены, часто встречающиеся в сочетании (ассоциированные) с основными драйверными мутациями при меланоме кожи. К генам, ассоциированным с *BRAF*-мутацией, были от-

несены гены *TP53* и *COL1A1*, а к генам, ассоциированным с *NRAS*-мутацией, были отнесены такие гены как: *PPP6C*, *KALRN*, *PIK3R4*, *TRPM6*, *GUCY2C* и *PRKAA2* [5]. Исследование ассоциаций гена серин треонинфосфатазы 6 (*PPP6C*) с драйверными мутациями является актуальным, поскольку считается, что совместно возникающие мутации могут изменять чувствительность к таргетной терапии *BRAF*-позитивных меланом [6]. Позднее было выявлено, что появление мутаций в данном гене может сочетаться с наличием у пациентов мутаций не только в гене *NRAS*, как считалось ранее, но и в гене *BRAF* [7].

Ген *PPP6C* кодирует каталитическую субъединицу PP6 серин треонинфосфатазного комплекса и специфически связывается с тремя регуляторными белками: PP6R1, PP6R2 и PP6R3 [8]. Данные о функциональной роли данного белка весьма противоречивы: в одних работах показано, что мутации в гене *PPP6C* приводят к потере активности данного белка и наличие мутаций в данном гене может рассматриваться в качестве драйверной мутации при меланоме кожи [9]. Другими авторами выявлено, что даже специфичные для меланомы мутации, в том числе мутации в гене *PPP6C* могут быть лишь «мутациями-пассажирами» и не нести никаких функциональных последствий [10]. При этом является актуальным вопрос, обладает ли опухоль, имеющая мутацию в данном гене, особыми биологическими свойствами.

ММП-2 (матриксная металлопротеиназа-2) представляет собой фермент семейства эндопептидаз, принимающий участие в таких процессах как клеточная пролиферация, апоптоз, ангиогенез [11]. При этом данный фермент рассматривается в качестве прогностического маркера при ряде онкологических заболеваний [12]. Показано, что повышение уровня ММП-2 при меланоме кожи приводит к увеличению инвазивной способности опухолевых клеток, а также способствует ремоделированию компонентов внеклеточного матрикса, данные эффекты становятся более выраженными в условия применения *BRAF*-ингибиторов, в частности вемурафениба [13]. Кроме того в проводимых ранее исследованиях, увеличение экспрессии ММП-2 было ассоциировано с увеличением количества микрососудов в ткани при меланоме кожи [14]. Взаимосвязь изменений уровня экспрессии ММП-2, а также биологических свойств *BRAF*-позитивных опухолей, позволяет думать о возможной связи экспрессии ММП-2 и с други-

Для корреспонденции:

Аксененко Мария Борисовна, кандидат медицинских наук доцент кафедры патологической физиологии с курсом клинической патофизиологии им. проф. В.В. Иванова, 660022, г. Красноярск, Россия. E-mail: aksenenko_mariya@mail.ru.

For correspondence:

Aksenenko Maria B., MD, PhD, docente, Department of Pathophysiology with a Course of a Clinical Pathophysiology, Krasnoyarsk State Medical University of prof. V.F. Voynov-Yasenetsky, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation. E-mail: aksenenko_mariya@mail.ru.

Information about authors:

Aksenenko M.B., <http://orcid.org/0000-0001-7660-700X>;
Ruksha T.G., <http://orcid.org/0000-0001-8142-4283>.

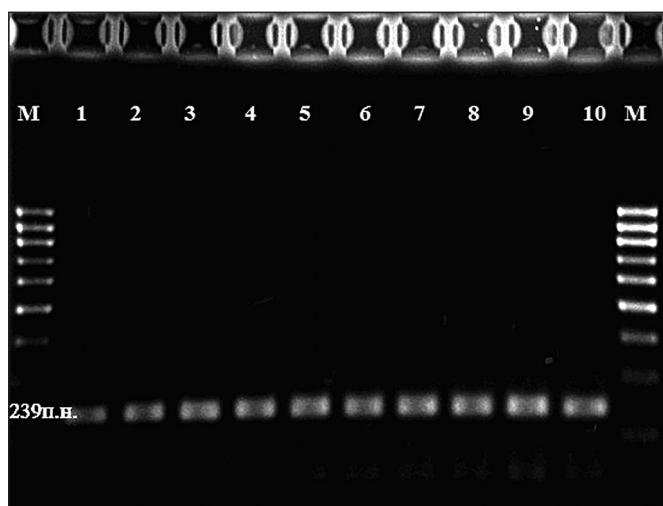


Рис. 1. Анализ продуктов амплификации методом электрофореза в 2% агарозном геле с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

На снимке чётко видны полосы на уровне 239 п.н., что соответствует изучаемому белку. Первая и последняя дорожка представляют собой маркеры молекулярной массы (обозначены буквой М) и используются в качестве контролей, посередине под порядковыми номерами размещены образцы ДНК больных меланомой кожи.

ми BRAF-ассоциированными мутациями, в частности мутациями в гене *PPP6C*.

Цель исследования – оценить экспрессию ядерной ММП-2 у больных меланомой кожи в зависимости от наличия у них мутаций в гене *PPP6C* для определения особенностей биологического поведения меланомы кожи с наличием вышеуказанной мутации.

Материалы и методы

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО КрасГМУ, протокол №52/2013 от 27.11.2013). Биоптаты больных меланомой кожи были получены в КГБУЗ «Красноярское краевое патологоанатомическое бюро». Перед выделением ДНК стекла пациентов, окрашенные гематоксилином и эозином, оценивали на содержание опухолевых клеток в срезе, отбирали образцы с содержанием опухолевых клеток 60% и более. В дальнейшем проводили выделение геномной ДНК с помощью набора ДНК-сорб В («AmpliSens», Россия).

На первом этапе работы проводили анализ мутации *BRAF*-V600E методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ). На следующем этапе исследования проанализировано наличие мутаций в 3-м экзоне гена *NRAS* методом секвенирования по Сэнгеру. В дальнейшем были отобраны 40 больных, имеющие мутации в генах *BRAF* или *NRAS*, у которых определялось наличие мутаций в 7-м экзоне гена *PPP6C*.

Затем проводили постановку реакции амплификации ПЦР, для приготовления ПЦР-смеси использовали набор Encyclo Plus PCR kit («Евроген», РФ), ПЦР-смесь готовили в количестве 25 мкл в расчёте на 1 реакцию. Состав ПЦР-смеси включал следующие компоненты: 10X Encyclo буфер 2,5 мкл; стерильная вода для ПЦР; 50x DNT 0,5 мкл; PCR-праймер (прямой) и PCR-праймер (обратный) по 1 мкл; ДНК матрица 2,5 мкл; 50X Encyclo полимеразы. Использовалась следующая последовательность праймеров к фрагменту гена *PPP6C* (7-й экзон): forward 5'-ACAGTGCCTTTCTAAATTGC-3'; reverse 5'-GGAATAACACGTCTCTGAATCTG-3'. Условия проведения ПЦР: предварительная денатурация 95°C 3 мин, далее

денатурация 95°C 15 с, отжиг 57°C 40 с, элонгация 72°C 40 с, всего 35 циклов, в завершении финальная элонгация 72°C 3 мин. Для подтверждения эффективности ПЦР проводили электрофоретическое разделение молекул в 2% агарозном геле при напряжении 90 В в течение 40 мин, с последующей окраской геля в растворе бромистого этидия с финальной концентрацией раствора 0,2 мкг/мл. После чего производили визуализацию геля на системе визуализации ChemiDoc™MP («Bio-Rad», США). Результат реакции считали положительным, если на геле чётко были видны светящиеся полосы, соответствующие молекулярной массе ампликона 239 п.н. На следующем этапе исследования проводили выделение концентрированных образцов двухцепочной ДНК из реакционной смеси, при помощи набора Cleanup Mini («Евроген», Россия). После чего повторно осуществляли электрофорез в 2% агарозном геле с целью выяснения количества концентрированного ПЦР-продукта по интенсивности свечения полос. Для постановки одной реакции секвенирования использовалось 10 мкл раствора, содержащего очищенный целевой продукт с концентрацией 20–50 нг/мкл. Секвенирование проводилось методом Сэнгера с последующим анализом хроматограмм в программе Sequence scanner 1,0 («Applied Biosystems», США).

В дальнейшем проводили анализ взаимосвязи между наличием мутации в гене *PPP6C* и клинико-морфологическими параметрами заболевания: пол, возраст, локализация опухоли, толщина опухоли по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, интенсивность лимфоцитарной инфильтрации опухоли, клинико-морфологическая форма заболевания, гистологический подтип опухоли, выраженность пигментации опухоли, наличие изъязвления опухоли, стадия меланомы по AJCC.

Исследование экспрессии ММП-2 осуществляли с помощью иммуногистохимического метода по стандартному протоколу с использованием безбиотиновой системы детекции REVEAL Biotin-Free Polyvalent (Spring, «BioScience», США) с использованием мышиных поликлональных антител (Spring, «BioScience», США) в разведении 1:100. Для визуализации продукта реакции применяли АЕС (амино-этил-корбазол) («Sigma», США) в качестве хромогена. Контр-окрашивание ядер осуществляли с помощью гематоксилина Майера. Подсчёт положительно окрашенных клеток проводили при увеличении 600 с помощью микроскопа Olympus BX-41, программа Infinity Capture, камера («Lumenera Corporation») и software V.4.6.0. Интенсивность иммуногистохимической реакции оценивали по методу гистологического счёта H-score по формуле: $S = 1a + 2b + 3c$, где a – % слабо окрашенных ядер клеток; b – % умеренно окрашенных ядер клеток; c – % сильно окрашенных ядер клеток. Степень выраженности экспрессии расценивали: 0–10 баллов – отсутствие экспрессии, 11–100 – слабая экспрессия, 101–200 – умеренная экспрессия, 201–300 – выраженная экспрессия.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7,0; проверку нормальности распределения выборки – с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Статистическую значимость различий определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Для оценки качественных признаков применяли точный односторонний критерий Фишера. Различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру были изучены соматические немолчащие протеин-кодирующие мутации в образцах меланомы кожи (рис. 1). Мутации в гене *PPP6C* были выявлены у 5 (12,5%) пациентов, при этом в 80% случаев мутации были взаимоисключающими, т.е. в генотипе опухоли встречалась только одна единственная мутация и сочетания мутаций с известными вышеуказанными

драйверными мутациями в генах *BRAF*, *NRAS* не наблюдалось. У 35 (87,5%) пациентов была определена опухоль «дикого» типа. Синонимические замены в нуклеотидах были обнаружены в позициях 265, 269, 270, 271. У всех пациентов, имеющих мутации в данном гене, наблюдались миссенс-мутации: G266R (у 1 пациента), I271N (у 2 пациентов), P259H (у 1 пациента), у одного пациента было выявлено сочетание двух мутаций в «горячих точках» гена, одна в 259-м кодоне P259L (с. 776C > T) и вторая в 264-м кодоне, R264L (с.791C > T). Не было выявлено взаимосвязи между клинико-морфологическими признаками заболевания и наличием мутаций в гене *PPP6C* (см. таблицу). Экспрессия ядерной ММП-2 среди пациентов, имеющих данную мутацию и пациентов, не имеющих данной мутации, не различалась ($p > 0,72$). Так, ИГХ-коэффициент для *PPP6C* мутантных образцов составил $30,2 \pm 8,89$; а для образцов *PPP6C* дикого типа он составил $25,4 \pm 5,26$. Преимущественная экспрессия ядерной ММП-2 наблюдалась у *PPP6C*-негативных пациентов. Более того, у пациентов, имеющих мутации в гене *PPP6C*, регистрировалась преимущественно цитоплазматическая экспрессия ММП-2 ($p = 0,045$).

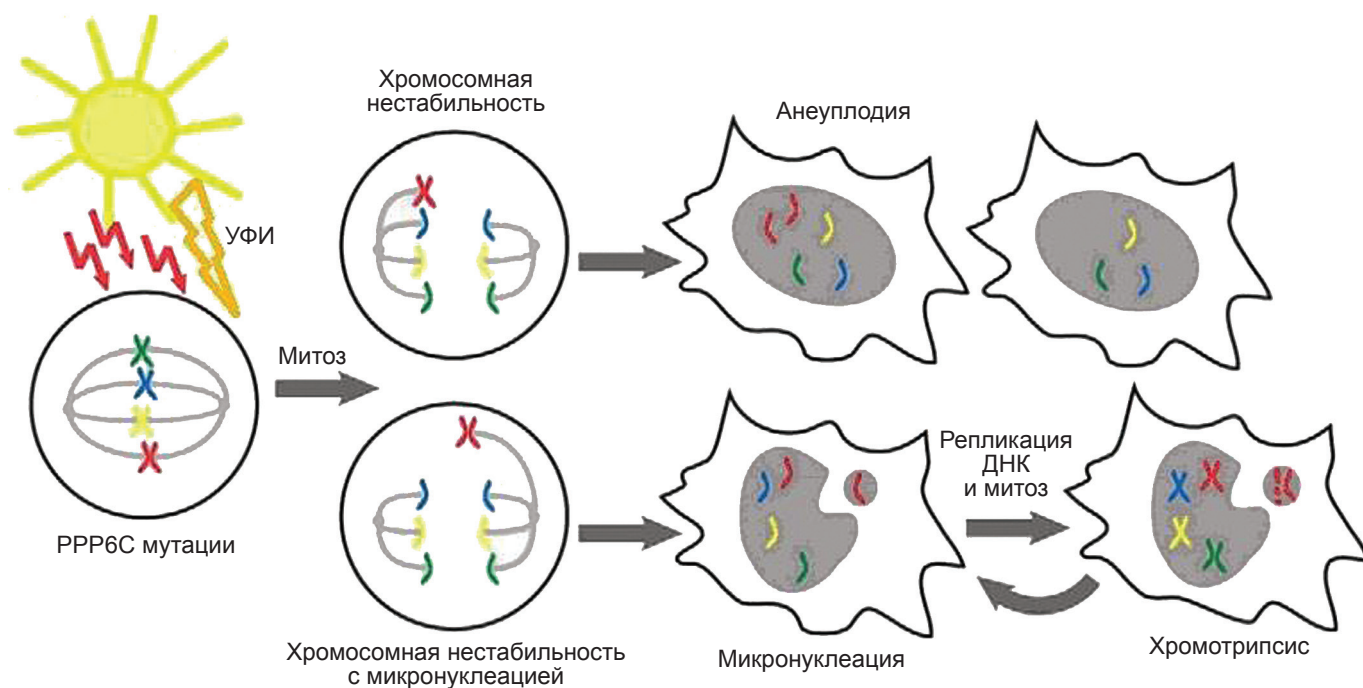
Обсуждение

По данным литературы [15], наличие мутаций в гене *PPP6C* у пациентов с первичной меланомой позволяет рассматривать данный вид мутаций как раннее событие в меланоме кожи. Известно, что мутации в гене *PPP6C* не ассоциированы с какими-либо клинико-морфологическими показателями заболевания, кроме как толщина опухоли по Бреслоу [16]. Также было показано, что прогностическое значение для пациента имеет характер мутаций: более неблагоприятный для пациента прогноз связан с наличием нонсенс-мутаций по сравнению с миссенс-мутациями. Данные мутации приводят к образованию стоп-кодона и ассоциированы с ранним появлением у больных меланомой кожи висцеральных метастазов, а также низкой выживаемостью пациентов [7]. Кластеризация мутаций в гене *PPP6C*, в частности, высокая повторяемость точечной мутаций R264C, позволяют думать о её активизирующей роли и возможности выступления данной мутации в роли онкогена [9]. Биологическая роль различного вида мутаций в данном гене заключается в том, что они дестабилизируют голоэнзим *PP6C* и приводят к усилению активности киназы *Aurora-A*, что в свою очередь влияет на эффективность хромосомной конгрессии и сегрегации, что в итоге при-

Клинико-морфологические характеристики пациентов, имеющих соматическую мутацию в гене *PPP6C*, и пациентов с опухолью «дикого типа»

Характеристика	PPP6C(+) (n = 5)		PPP6C (-) (n = 35)		P
	n	%	n	%	
Пол:					
мужской	1	20	12	34,3	0,65
женский	4	80	23	65,7	
Возраст, годы:			1,0		
медиана	57		57		
средний возраст $\pm$ стандартное отклонение	$54,8 \pm 10,68$		$55,9 \pm 14,82$		
Локализация:					
голова и шея	0	0	2	5,7	1,0
туловище	1	20	15	42,9	0,63
верхние конечности	0	60	4	11,4	1,0
нижние конечности	3	0	14	40,0	0,63
другая локализация	1	20	0	0	0,12
Уровень инвазии по Кларку:					
1	0	0	1	2,9	1,0
2	1	20	4	11,4	0,50
3	3	60	13	37,1	0,37
4	1	20	9	25,8	1,0
5	0	0	8	22,8	0,56
Фаза роста опухоли:					
радиальная	1	20	4	11,4	0,50
вертикальная	4	80	31	88,6	
Толщина по Бреслоу, мм:					
0,01–1,0	1	20	2	5,7	0,33
1,01–2,0	1	20	4	11,4	0,50
2,01–4,0	3	60	15	42,9	0,64
более 4,0	0	0	14	40,0	0,14
TILs статус:					
Brisk	3	60	22	62,9	1,0
Non Brisk	1	20	6	17,1	1,0
Absent	1	20	7	20,0	1,0
Патоморфологическая форма:					
Поверхностно-распространяющаяся меланома	1	20	20	57,2	0,17
Узловая меланома	2	40	8	22,8	0,58
Акрально-лентигинозная меланома	1	20	1	2,9	0,23
Лентиго меланома	0	0	6	17,1	1,0
Меланома слизистых	1	20	0	0	0,12
Гистологический подтип:					
эпителиоидноклеточный вариант	1	20	6	17,1	1,0
веретенноклеточный вариант	0	0	1	2,9	1,0
невоклеточный вариант	1	20	4	11,4	0,47
смешанноклеточный вариант	3	60	24	68,6	0,65
Наличие пигмента:					
есть	5	100	33	94,2	1,0
нет	0	0	2	5,8	
Изъязвление;					
есть	2	40	22	62,9	0,63
нет	3	60	14	37,1	
Стадия опухоли согласно AJCC*:					
0	0	0	0	0	1,0
I	1	20	4	11,4	0,50
II	3	60	23	65,7	1,0
III	0	0	2	5,8	1,0
IV	0	0	6	17,1	1,0

Примечание. * – исключена меланома слизистых (в AJCC она не включена).

Рис. 2. Биологическая роль мутации *PPP6C* при меланоме кожи.

водит к хромосомной нестабильности, которая также способствует микронуклеации из-за дефектной сегрегации хромосом [17].

Наличие ядерной экспрессии ММП-2 рассматривается как прогностически неблагоприятный признак среди пациентов, ассоциированный с ранним метастазированием и наибольшими размерами опухолевого узла [18]. Кроме того считается, что функциональная роль ядерной и цитоплазматической ММП-2 тоже могут различаться. В отдельных тканях организма цитоплазматическая экспрессия ММП-2 присуща исключительно нормальной ткани организма, появление же ядерной экспрессии наблюдается исключительно в опухолевой ткани [19].

Таким, образом, мы не выявили ассоциации между таким неблагоприятным признаком как ядерная экспрессия ММП-2 и наличием мутаций в гене *PPP6C*, однако следует отметить, что в реализацию таких свойств опухоли как инвазивность, способность к метастазированию оказывают влияние множество факторов и биологически активных веществ. Основная роль цитоплазматической ММП-2 сосредоточена на процессе ангиогенеза в опухоли [20]. Цитоплазматическая локализация в *PPP6C*-мутантных опухолях может быть связана с тем, что в условиях возникновения данной мутации, могут реализовываться другие, в частности антиангиогенные механизмы. Известно, что продукция матриксных металлопротеиназ происходит при активации NF-каппа-B-сигнального механизма, который в свою очередь может вовлекаться при наличии мутационного процесса в гене *PPP6C*.

На рис. 2 схематично показано появление мутации в гене *PPP6C*, приводящее к хромосомной нестабильности в сочетании с микронуклеацией ядра. На первом этапе УФ-лучи воздействуют на кожу пациента, приво-

дя к повреждению ДНК во множестве локусов, а также к появлению мутаций в гене *PPP6C*, что, в свою очередь, вызывает потерю каталитической активности РР6С, а также снижение стабильности белка. Таким образом, данные клетки войдут в митоз с повышенной Аиго-А киназной активностью. В конечном итоге это может вызывать нарушение формирования веретена деления и микронуклеации из-за дефектной сегрегации хромосом. Формирование микроядер способствует нарушению в них репликации ДНК из-за сниженного в них количества ядерных пор и структурных дефектов в ядерной оболочке [21]. Поэтому данные клетки будут входить в митоз с недореплицированными микроядерными ДНК, что приводит к фрагментации хромосом [22]. В результате мутаций в гене *PPP6C* наблюдается потеря клетками РР6-активности, которая способствует хромотрипсису ядра (одномоментному появлению большого числа хромосомных перестроек) в клетках и дальнейшей инициации процесса канцерогенеза через накопление микроядер с повышенной Аиго-А киназной активностью. В литературе описана роль *PPP6C* в процессе клеточного деления, так данный ген участвует в качестве регулятора мейоза ооцитов и фертильности у женщин, дефицит данного фермента приводит к аномальному расхождению хромосом в мейозе (II) и нарушению цитокинеза, что приводит к появлению зигот с высоким риском анеуплоидии и дефектов раннего эмбрионального развития [23].

Несмотря на то, что мутации в гене *PPP6C* встречаются всего в 10% случаев среди всех меланом, данные некоторых исследований показывают, что вследствие опухолевой гетерогенности, мутантные клетки могут быть обнаружены в опухоли наряду с клетками «дикого» типа [24]. Следует также отметить, что довольно часто мутации в гене *PPP6C* встречаются в BRAF-негативных

меланомах. До недавнего времени данная группа пациентов рассматривалась как группа пациентов с ограниченными химиотерапевтическими возможностями, что делает перспективным подобного рода исследования.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект № 16-34-00461, мол. а (часть работы по секвенированию и анализу данных мутаций в гене PPP6C у пациентов с меланомой кожи). В рамках государственного задания «Разработка методов детекции и идентификации мутаций гена c-KIT на основе ПЦР в режиме реального времени и секвенирования для выбора средств персонализированной терапии меланомы кожи» (выполнено выделение геномной ДНК пациентов).

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Cicenas J., Tamosaitis L., Kvederaviciute K., Tarvydas R., Stanute G., Kalyan K., et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Med. Oncol.* 2017; 34(2): 26. doi: 10.1007/s12032-016-0879-9.
- Krauthammer M., Kong Y., Ha B.H., Evans P., Bacchiocchi A., McCusker J.P., et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* 2012; 44(9): 1006–14. doi: 10.1038/ng.2359.
- Krauthammer M., Kong Y., Bacchiocchi A., Evans P., Pornputtapong N., Wu C., et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat. Genet.* 2015; 47(9): 996–1002. doi: 10.1038/ng.3361.
- Ranzani M., Alifrangis C., Perna D., Dutton – Requester K., Pritchard A., Wong K., et al. BRAF/NRAS wild-type melanoma, NF1 status and sensitivity to trametinib. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015; 28(1): 117–9. doi: 10.1111/pcmr.12316.
- Xia J., Jia P., Hutchinson K.E., Dahlman K.B., Johnson D., Sosman J., et al. 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): 1918–28. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0804.
- Grienwank K.G., Scolyer R.A., Thompson J.F., Flaherty K.T., Schadendorf D., Murali R. Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014; 106(2): djt435. doi: 10.1093/jnci/djt435.
- Gold H.L., Wengrod J., de Miera E.V., Wang D., Fleming N., Sikema L., et al. PP6C hotspot mutations in melanoma display sensitivity to Auro kinase inhibition. *Mol. Cancer Res.* 2014; 12(3): 433–9. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0422.
- Stefansson B., Brautigan D.L. Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets I kappa B epsilon. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(32): 22624–34. doi: 10.1074/jbc.M601772200.
- Hodis E., Watson I.R., Kryukov G.V., Arold S.T., Imielinski M., Theurillat J.P., et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012; 150(2): 251–63. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.024.
- Shen T., Pajaro-Van de Stadt S.H., Yeat N.C., Lin J.C. Clinical applications of next generation sequencing in cancer: from panels, to exomes, to genomes. *Front. Genet.* 2015; 6: 215. doi: 10.3389/fgene.2015.00215.
- Xu W., Xu H., Fang M., Wu X., Xu Y. MKL1 links epigenetic activation of MMP2 to ovarian cancer cell migration and invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017; 487(3): 500–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.006.
- Luke J., Vukoja V., Brandenbusch T., Nassar K., Rohrbach J.M., Grisanti S., et al. CD147 and matrix-metalloproteinase-2 expression in metastatic and non-metastatic uveal melanomas. *BMC Ophthalmol.* 2016; 16: 74. doi: 10.1186/s12886-016-0222-4.
- Sandri S., Faiao-Flores F., Tiago M., Pennacchi P.C., Massaro R.R., Alves-Fernandes D.K., et al. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulated the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacol. Res.* 2016; 111: 523–33. doi: 10.1016/j.phrs.2016.07.017.
- Trisciuglio D., Desideri M., Ciuffreda L., Motolesse M., Ribbatti D., Vacca A., et al. Bcl-2 overexpression in melanoma cells increases tumor progression-associated properties and in vivo tumor growth. *J. Cell Physiol.* 2005; 205(3): 414–21. doi: 10.1002/jcp.20413.
- Shitara D., Tell-Marti G., Badenas C., Enokihara N.M., Alos L., Larque A.B., et al. Mutational status of naevus-associated melanomas. *Br. J. Dermatol.* 2015; 173(3): 671–80. doi: 10.1111/bjd.13829.
- Sullivan R.J., ed. *BRAF targets in melanoma: biological mechanism, resistance, and drug discovery*. Springer; 2015.
- Hammond D., Zeng K., Espert A., Bastos R.N., Baron R.D., Gruneberg U., et al. Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause instability and DNA damage owing to dysregulated Auro A. *J. Cell Sci.* 2013; 126(Pt 15): 3429–40. doi: 10.1242/jcs.128397.
- Monvoisin A., Bisson C., Si-Tayeb K., Balabaud C., Desmouliere A., Rosenbaum J. Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer.* 2002; 97(2): 157–62.
- Kohrmann A., Kammer U., Kapp M., Dietl J., Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and cancer cell lines: new findings and review of the literature. *BMC Cancer.* 2009; 9: 188. doi: 10.1186/1471-2407-9-188.
- Ene C.I., Fine H.A. Many tumors in one: a daunting therapeutic prospect. *Cancer Cell.* 2011; 20(6): 695–7.
- Formet J.V., Kaidi A., Jackson S.P. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat. Rev. Cancer.* 2012; 12(10): 663–70.
- Crasta K., Ganem N.J., Dagher R., Lantermann A.B., Ivanova E.V., Pan Y., et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature.* 2012; 482(7383): 53–8. doi: 10.1038/nature10802.
- Hu M.W., Meng T.G., Jiang Z.Z., Dong M.Z., Schatten H., Xu X., et al. Protein phosphatase 6 protects prophase I-arrested oocytes by safeguarding genomic integrity. *PLoS Genet.* 2016; 12(2): e1006513. doi: 10.1371/journal.pgen.1006513.
- D'Assoro A.B., Haddad T., Galanis E. Aurora-A kinase as a promising therapeutic target in cancer. *Front. Oncol.* 2015; 5: 295. doi: 10.3389/fonc.2015.00295.

Поступила 26.11.17
Принята к печати 21.03.18