

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕЛАНОМЫ. ЧАСТЬ 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ-МИШЕНИ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ*

Л.Ф. Гуляева

д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза, ФГБНУ НИИ молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск)

Н.Н. Мазуренко

д.б.н., профессор, руководитель лаборатории онкогеномики НИИ канцерогенеза, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (Москва)

Н.Е. Кушлинский

д.м.н., профессор, член-корр. РАН, руководитель лаборатории клинической биохимии, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (Москва)

Рассмотрены соматические генетические нарушения, вовлеченные в канцерогенез меланомы. Особое внимание уделено молекулярным маркерам, участникам клеточного сигналинга – потенциальным мишеням таргетной терапии, а также микро РНК. Представлены препараты целенаправленного действия (таргетные), многие из которых показали хороший терапевтический эффект, особенно перспективно комбинированное лечение меланомы в сочетании с иммунотерапией.

Ключевые слова: меланома, генетические нарушения, RAS-МАРК- и PI3K-сигнальные пути, NF-κB, канцерогенез.

СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ И МЕЛАНОМА

С современных позиций канцерогенез меланомы можно рассматривать в несколько этапов (рис. 1).

Предполагают, что в большинстве случаев на этапе I происходит накопление соматических мутаций под действием УФ-облучения. Меланома кожи демонстрирует повышенный уровень мутаций по сравнению с другими солидными опухолями. Потеря функции белка p16^{INK4A} (этап II) может приводить к клеточному бессмертию. Дальнейший процесс трансформации, возможно, сопровождается активацией теломеразы (этап III), приводящей к альтернативному удлинению теломеры. Наконец, на этапе IV происходит активация мутированных генов, что запускает нерегулируемую пролиферацию. При этом механизм регуляции апоптоза подавлен.

В пользу такой последовательности событий указывает тот факт, что в спорадической меланоме выявлено большое количество соматических мутаций. В таблице приведены наиболее часто

встречаемые мутации в генах различных сигнальных путей клетки.

Таким образом, существует ряд фенотипов меланомы с различными комбинациями генетических повреждений. Как следует из данных, представленных в таблице, чаще всего это активирующие мутации в генах *BRAF* и *NRAS*, а также потеря функции супрессоров p16^{INK4}, p14^{INK4/ARF}, PTEN.

Таблица. Наиболее частые соматические мутации при спорадической меланоме

Сигнальный путь	Тип мутации	Частота, %
p16 ^{INK}	p16 ^{INK} мутация – потеря функции	8–35
p14	p14 ^{INK/ARF} мутация – потеря функции	20–40
p53	p53 мутация – потеря функции	10
МАРК	NRAS активирующая мутация	15–30
	BRAF активирующая мутация	26–70
PI3K	PTEN мутация – потеря функции	40–60



Рис. 1. Этапы канцерогенеза меланоцитов

* Часть 1 опубликована в журнале «Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии», №1, т.20, 2017 г.

В результате сложных взаимодействий между сигнальными молекулами ключевые онкогены, запускающие пролиферацию, остаются перманентно активными. Таким примером может быть активация транскрипционного фактора NF-κB (рис. 2).

Установлено, что генетические повреждения таких супрессоров, как p14^{INK4/ARF}, p16^{INK}, p53, PTEN, а также активирующие мутации в BRAF и NRAS могут привести в конечном итоге к нерегулируемой активации этого транскрипционного фактора. Как оказалось, знания о соматических мутациях в ключевых генах, участниках сигнальных путей, послужили важной основой для разработки стратегии таргетной терапии.

В последние 10 лет в исследованиях меланомы был сделан заметный прогресс в понимании ее генетического «ландшафта». Установлено, что для каждого подтипа меланомы характерен свой набор генетических повреждений в сигнальных клеточных каскадах (рис. 3 и 4). Акральные меланомы и меланомы слизистых оболочек имеют большее число генетических изменений, чем меланомы кожи, независимо от инсоляции.

Гиперактивация сигнального пути RAS-MAPK наблюдается в 90% меланомы кожи. Наиболее часто определяются точечные мутации в генах BRAF (50–70%) и NRAS (15–30%), которые являются взаимоисключающими, и в 2–8% случаев меланомы кожи выявляются мутации KIT. Частота мутаций различается в меланомах на закрытых и открытых для постоянного УФ-облучения участках кожи (рис. 3) [2–5].

Меланома слизистых оболочек имеет спектр генетических нарушений сходный с акральными меланомой: в них повышена частота мутаций KIT и снижена частота мутаций BRAF и NRAS. В увеальной меланоме наиболее распространены драйверные мутации GNA11, GNAQ, BAP1, EIF1AX и SF3B1 [6–10]. Нарушение функций CDK4, CCND1 и KIT не всегда является эксклюзивным, но они чаще встречаются в опухолях с диким типом BRAF и NRAS. Соматические мутации в генах молекул переда-

чи сигнала и их соотношение в разных типах меланомы представлены на рис. 4.

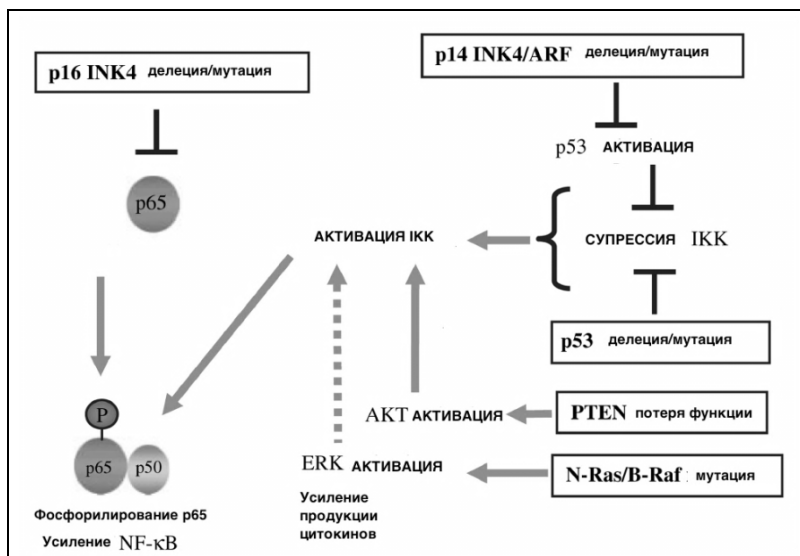


Рис. 2. Соматические мутации в генах молекул передачи сигнала, приводящие к активации NF-κB в клетках меланомы [1]

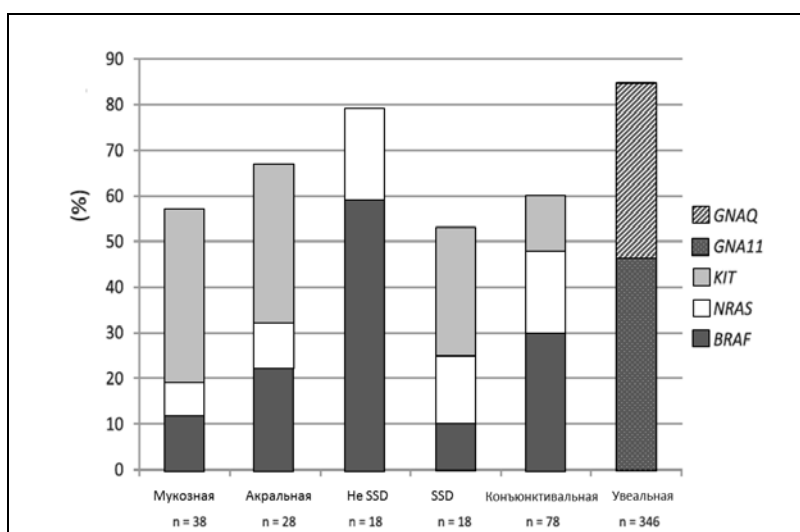


Рис. 3. Распространенность онкогенных мутаций в подтипах меланомы [4]

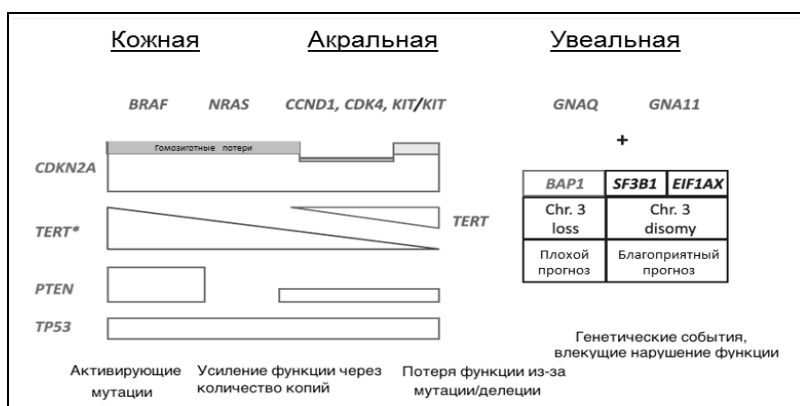


Рис. 4. Соматические мутации в генах молекул передачи сигнала в разных типах меланомы [4]

ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ МЕЛАНОМЫ

Меланома оказалась весьма устойчивой к традиционной химиотерапии с дакарбазином или его производным темозоломидом, эффективность которых составляет всего 15–20%.

Больные с высоким риском рецидива часто получают интерферон-альфа (IF- α) и/или интерлейкин-2 (IL-2) в качестве адъювантного лечения. Эффективность такого лечения широко дискутируется, и даже его сторонники признают, что преимущество не так велико и компенсируется высоким уровнем токсичности. Безусловным прорывом в лечении меланомы стало применение таргетных препаратов, которые разрабатываются на основе знаний молекулярно-генетических механизмов развития меланомы [11].

Таргетные препараты – это, как правило, антитела или небольшие молекулы, способные ингибировать онкогены, которые обычно гиперэкспрессируются в злокачественной опухоли. В настоящее время число таких препаратов растет быстрыми темпами.

На основании знаний компонентов сигнальных каскадов, задействованных в развитии меланомы, выделяют наиболее перспективные точки приложения терапевтических агентов. Это, прежде всего, тирозинкиназные рецепторы (ТКР), а также участники RAS-МАРК- и PI3K-путей (рис. 5).

KIT как мишень. Белок KIT является трансмембранным ТКР, играющим критическую роль в

развитии, пролиферации, миграции, дифференцировки и выживания меланоцитов. Связываясь с фактором стволовых клеток, ТКР димеризуется, аутофосфорилируется и активирует нижестоящие сигнальные пути, включая МАРК, PI3K/АКТ, JAK и STAT.

Мутации в *KIT* найдены в 2% меланомы кожи, но существенно чаще в меланоме слизистых оболочек (18–36%) и акральная меланоме (21–39%) [12]. В 30% наблюдений это мутация p.L576P или амплификация гена. Логично использовать этот онкоген как мишень для терапии, тем более что более 10 лет назад созданы и успешно используют тирозинкиназные ингибиторы для лечения гастроинтестинальных стромальных опухолей с мутациями *KIT*. Во второй фазе клинических испытаний тирозинкиназного ингибитора иматиниба для пациентов с меланомой показана годовая общая выживаемость 51% пациентов с мутациями *KIT* [13]. Получены обнадеживающие результаты лечения меланомы слизистых оболочек этим препаратом с ответом более 35% у пациентов с мутацией в 11-м или 13-м экзонах гена *KIT* [14]. Начаты клинические испытания других ингибиторов KIT маситиниба и нилотиниба с ожиданием позитивного клинического ответа [15, 16]. Интересно, что в китайской популяции частота мутации *KIT* составила 10,8% во всех подтипах меланомы, что существенно ниже, чем у европеоидов [17]. Этот факт предполагает различную природу патогенеза меланомы в зависимости от расы.

RAS как мишень. Семейство белков RAS, представленное малыми G-белками, состоит из KRAS, HRAS и NRAS, которые активируют нижестоящие белки RAF и PI3K. Онкогенные мутации в RAS встречаются в 1/3 опухолей человека. Наиболее частыми мутациями в меланоме (15–20% случаев) являются мутации в 61-м кодоне гена NRAS, реже – в 12-м, 13-м кодонах [18]. Мутировавший RAS теряет ГТФ-азную активность, что приводит к нерегулируемой активности этого белка, и, как следствие, неконтролируемой клеточной пролиферации и появлению трансформированного фенотипа. Этот факт был подтвержден экспериментально, когда у мышей, которым был введен активированный мутантный RAS, развивалась мелано-

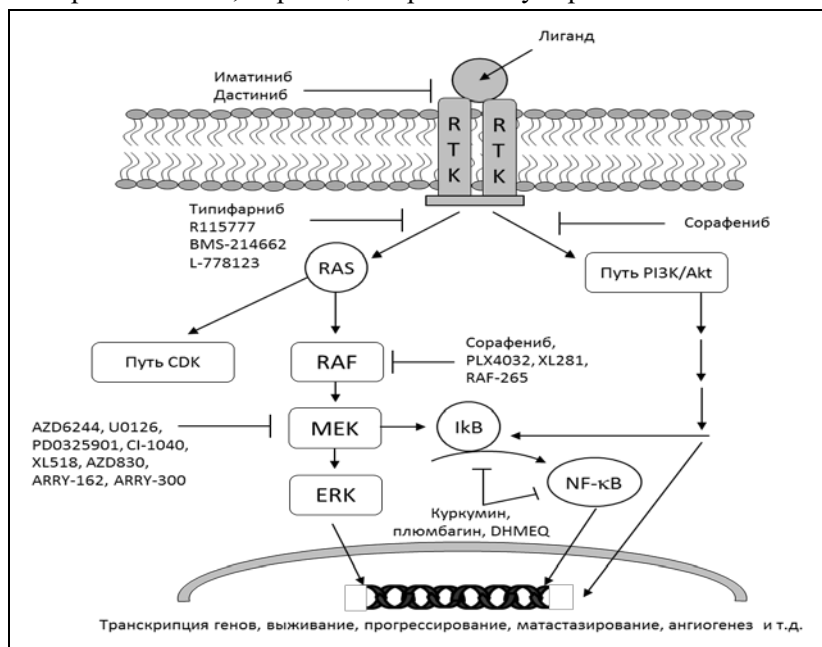


Рис. 5. Точки приложения ингибиторов МАРК- и PI3K-сигнальных путей для таргетной терапии меланомы [21]

ма [19]. Более того, экспрессия RAS может ингибировать супрессоры p16^{INK4A}, p53 и p14^{ARF}, что подтверждено экспериментами на мышах [20]: у нокаутных по экспрессии HRAS мышей наблюдали регрессию меланомы. Таким образом, белок RAS может быть потенциальной мишенью для лечения меланомы [21]. Однако попытки использовать фармакологические подходы к его ингибированию не принесли желаемого эффекта [22]. Применение ингибиторов фарнезилрования RAS, которые могли быть использованы для лечения меланомы, не увенчалось успехом [20]. Как оказалось, ингибиторы фарнезилтрансферазы показали неспецифические эффекты, поскольку другие белки используют данную жирную кислоту для закрепления в мембране [23]. Некоторые белки RAS могут связываться с мембраной через гераниловую кислоту, однако совместное применение ингибиторов фарнезил- и геранилтрансфераз привело к тотальному ингибированию всех изоформ RAS с ярко выраженным токсическим эффектом. Аналогичные результаты получены при клинических испытаниях на больных меланомой другого ингибитора фарнезилтрансферазы R115777 [24], а также непептидных ингибиторов RAS-белка. Все это позволило сделать вывод, что при меланоме надо искать другие мишени MAPK-каскада для таргетной терапии, возможно, в комбинации с другими препаратами [25].

RAF как мишень. Общеизвестно, что сегодня белки семейства RAF являются ключевыми белками для таргетной терапии меланомы [26]. Это семейство состоит из трех белков: ARAF, BRAF, CRAF (или RAF-1), которые являются нижестоящими эффекторами для RAS. Все они имеют общие консервативные области (CR1, CR2, CR3), хотя и проявляют заметные различия в аминокислотной последовательности. Белок BRAF также содержит три консервативных домена – CR1, CR2, CR3 (рис. 6).

Домен CR1 (131 а.к.) содержит RAS-связывающий участок и цистеин-богатый район. Домен CR2 (16 а.к.) содержит остатки треонина и серина, а CR3 (293 а.к.) содержит киназный домен и ключевые сайты фосфорилирования для регуляции активности. Так, когда остатки треонина 598 и серина 601 в С-концевой части белка фосфорилированы, киназная активность зна-

чительно увеличивается, а фосфорилирование по серину 364, серину 428 и треонину 439 киназой АКТ3 ингибирует активность фермента [22].

В целом регуляция активности нормального, не мутантного белка BRAF представляет собой сложный процесс, куда входит его перемещение к мембране, димеризация, фосфорилирование киназами SRC-семейства и другими киназами, диссоциации из комплекса ингибиторных белков и ассоциации со скаффолдинговыми белками. Среди участников MAPK-каскада в меланоме наиболее часто мутирует BRAF: более 60% метастазирующих меланом экспрессируют конститутивно активный мутантный белок, при этом выявлено более 65 различных мутаций [27]. Замена основания Т на А в положении 1799 (*BRAF* V600E), что приводит к замене валина на глутаминовую кислоту, встречается почти в 90% случаев, а замена валина на лизин или мутация *BRAF* V600K – в 3–30% случаев [28]. Предполагают, что частота мутации *BRAF* V600E увеличивается с возрастом, она также встречается чаще у пациентов, находящихся в регионах с интенсивной солнечной радиацией. Реже встречается мутация V600R валин-аргинин (от 1 до 5%). Частота данных мутаций может варьировать в зависимости от региона.

В случае мутации V600E активность мутантного белка BRAF выше более чем в 10 раз по сравнению с белком дикого типа, он не требует RAS-опосредованной транслокации к мембране. Последствия такой неконтролируемой активации белка разнообразны. В первую очередь, это активация MAPK-каскада. Мутантный BRAF также способствует росту новых кровеносных сосудов, контролирует развитие метастазов. Следствием мутации BRAF является также торможение роста и старение клеток из-за увеличения активности

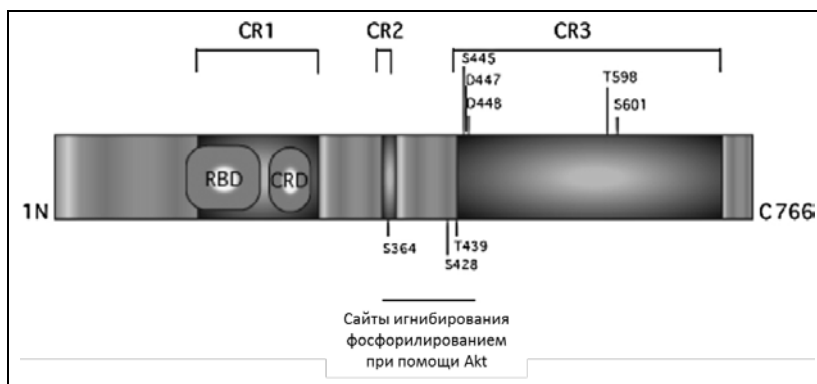


Рис. 6. Доменная организация BRAF, активность которого регулируется фосфорилированием ключевых остатков серина и треонина [22]

p16^{INK4A} и b-Gal. Индукция старения происходит за счет увеличения активности ингибиторов циклин-зависимых киназ p21^{Cip1}, p16^{INK4A} и p27^{Kip1}, которые выполняют роль защитного механизма нормальных клеток при гиперэкспрессии онкогена.

Установлено, что белок V600E BRAF изначально стимулирует пролиферацию меланоцитов, внося также вклад в развитие невусов, однако одной мутации в *BRAF* или *NRAS* недостаточно для трансформации невусов в меланому [29]. Это наблюдение подтверждено другими исследованиями. В частности, меланома *in situ* развилась из невусов с геном *BRAF* дикого типа, тогда как в диспластических невусах регистрировали оба типа *BRAF*: дикий и мутантный [30]. Эти работы подтверждают важную роль MAPK-каскада в патогенезе меланомы и свидетельствуют о необходимости дополнительных генетических изменений, таких как потеря функции p16^{INK4A}, PTEN или активации AKT3-сигнального пути. Действительно, в 60% случаев для меланомы характерна потеря функции p16^{INK4A} и наличие активного белка V600E BRAF. Недавние исследования пациентов с метастатической меланомой, получавших мелфалан и актиномицин-D, показали, что экспрессия p16^{INK4A} и отсутствие активированного BRAF были независимыми предсказательными маркерами хемочувствительности опухоли. Одновременные события, такие как активирующая мутация BRAF и потеря функции PTEN, наблюдали у 20% пациентов с меланомой, т.е. нарушением MAPK- и PI3-сигнальных каскадов [31]. Считается, что сначала мутирует ген *BRAF*, затем повреждается PTEN/AKT-путь. Таким образом, для успешной таргетной терапии меланомы необходимо воздействовать на оба пути. Сначала были проведены эксперименты на мышах, которые показали, что siRNA ингибирует развитие меланомы и метастазов, содержащих как дикий тип *BRAF*, так и его мутантный вариант *BRAF* V600E.

Фармакологические агенты, ингибирующие BRAF, также показали схожий эффект. Введение мышам ингибитора киназ сорафениба снижало пролиферацию меланоцитов на 55%, причем его эффект был выше, чем при действии siRNA, что предполагает воздействие этого агента на другие киназные пути (FGFR1, c-Kit, p38 MAPK) или ангиогенные факторы (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGF). Хотя клинические исследования продемонстрировали противоопухолевый эффект сорафениба при монотерапии метастазирующей мела-

номы, корреляции между статусом BRAF и стабильностью болезни не установлено, что поставило под сомнение использование его для таргетной терапии.

Неудача применения сорафениба стимулировала поиск новых таргетных препаратов. Новый препарат вемурафениб (PLX4032), связываясь с молекулой BRAF с мутацией V600E, ингибирует ERK-сигнальный путь и клеточную пролиферацию только в клетках меланомы, имеющих мутантный BRAF. Первые клинические испытания показали значительный эффект как на саму опухоль, так и ее метастазы. Позитивный ответ на лечение наблюдали у 81% больных с метастатической меланомой, имеющих мутацию V600E BRAF [32].

Дальнейшие исследования механизмов канцерогенеза меланоцитов показали, что мутантный V600E BRAF ингибируется белком CRAF через образование димеров. Соотношение CRAF:BRAF очень важно в регуляции пролиферативного сигнала, тогда возникает серьезная проблема, так как применение ингибиторов V600E BRAF может привести к неконтролируемой активации MEK1/2- и ERK1/2-пути в *NRAS* мутантных клетках и даже в нормальных меланоцитах. Для пациентов, у которых мутация V600E BRAF не выявляется, лечение таргетными препаратами представляет особую проблему. Им предлагается другое лечение с использованием ингибиторов MAPK-каскада [32]. Однако единой стратегии для лечения меланомы с диким типом гена *BRAF* пока нет.

Как и в случае с мутацией в гене *KIT*, частота мутаций в генах *NRAS* и *BRAF* различается в зависимости от этнической принадлежности пациента. Показано, что частота соматических мутаций в 11-м и 15-м экзонах гена *BRAF* и в 1-м и 2-м экзонах гена *NRAS* в меланоме 432 китайских пациентов составляла 25,5% и 7,2% соответственно, что существенно ниже, чем у европейской популяции [73]. Среди 110 пациентов с мутацией *BRAF* 89,1% имели мутацию V600E *BRAF*. У белых американцев гены *BRAF* и *NRAS* дикого типа присутствуют в 31,1% меланомы, тогда как у пациентов азиатского происхождения или афроамериканцев – в 61,1% [35]. Эти различия необходимо учитывать при проведении клинических испытаний таргетных препаратов.

МЕК как мишень. MEK-1 и MEK-2 являются специфическими серин/треонин киназами, имеют 80% гомологии и активированы в 30% всех видов опухолей человека. В цепи передачи сигнала

ла они стоят ниже BRAF, единственным на сегодня известным субстратом для них является ERK. В экспериментах показано, что эффективность применения ингибиторов MEK зависит от наличия мутаций в BRAF и RAS. Так, большинство клеточных линий меланомы, содержащих мутантный BRAF и, следовательно, зависящих от активности MEK, были чувствительны к ингибированию MEK. Напротив, клетки с мутациями в KRAS были менее чувствительны к таким ингибиторам, что может быть связано с активацией других сигнальных путей. В последнее время появились первые работы об успешном применении ингибиторов MEK в лечении меланом, имеющих мутации в NRAS или V600E BRAF.

В 2013 г. государственная служба США Food and Drug Administration (FDA) одобрила новые таргетные препараты дабрафениб и траметиниб в качестве монотерапии или в комбинации для лечения метастазирующей меланомы. Оба препарата ингибируют MAPK-путь: дабрафениб направлен против мутантного BRAF, а траметиниб селективно ингибирует нижестоящие на сигнальных путях молекулы MEK1 и MEK2 [36]. Третья фаза клинических испытаний дабрафениба показала быструю регрессию опухоли у большинства пациентов и 59% объективный RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) ответ. Траментиниб был неэффективен у пациентов, которые не ответили на терапию ингибиторами BRAF.

Таким образом, лечение меланомы на современном этапе включает в себя как монотерапию, так и применение нескольких таргетных препаратов [37]. Хотя общепринятыми мишенями в лечении меланомы являются BRAF или MEK, комбинированное ингибирование ключевых членов других сигнальных путей представляет насущную проблему. Кроме того, несмотря на достигнутый прогресс в лечении меланомы с применением ингибиторов V600E BRAF и других фармакологических агентов, ингибирующих компоненты MAPK-пути, возникает резистентность к таким препаратам. Поэтому продолжается активный поиск новых клеточных мишеней для таргетной терапии. Особые надежды связаны с комбинированным подходом, который основан на одновременном применении ингибиторов, по крайней мере, MAPK-сигнального пути и их комбинаций с ингибиторами других путей, таких как AKT3 в PI3K-сигнальном каскаде [38], а также регулятора клеточного цикла CDK4 [39].

В последнее время появились новые потенциальные кандидаты на мишени для терапии меланомы: ERBB4, TRRAP, RAC1, глутаматные рецепторы GRIN2A, GRM3, металлопротеиназа MMP-8, микроРНК. Их роль в развитии меланомы устанавливается, и есть надежда, что это существенно поможет в лечении заболевания.

ИММУНОТЕРАПИЯ

Меланома является высокоиммуногенной опухолью и индуцирует иммунный ответ, опосредованный цитотоксическими Т-клетками. Эти клетки, или натуральные киллеры, представляют собой первую линию защиты против трансформированных клеток и клеток, инфицированных вирусом. Поэтому идентифицированные Т-лимфоциты в области меланомы обычно связывают с благоприятным прогнозом. Показано, что у больных меланомой эти клетки часто дефектны, например, у них снижено содержание активирующих рецепторов, или они подвергаются клеточному истощению [40]. С другой стороны, клетки меланомы часто не распознаются CD-8 Т-клетками, так как в них снижена экспрессия основного комплекса гистосовместимости класса I (МНС). Тогда в этом случае цитотоксические Т-клетки могут быть потенциальными кандидатами для иммунотерапии, если их «научить» распознавать клетки меланомы со сниженной экспрессией молекул класса МНС [41].

Современная иммунотерапия меланомы в основном основана на применении препаратов, которые ингибируют рецепторы иммунного ответа (immune checkpoint) Т лимфоцитов. В 2011 г. для лечения метастатической меланомы в США FDA одобрила препарат ипилимумаб, представляющий собой рекомбинантный человеческий иммуноглобулин Ig1 против цитотоксического белка T4, ассоциированного с Т-лимфоцитами (CTLA-4), – негативного регулятора Т-клеточной активации. Результатом действия этого препарата является Т-клеточная активация. Показан существенный терапевтический эффект с повышением выживаемости больных меланомой, принимавших ипилимумаб. Средняя медиана выживаемости составила 10 мес. Присоединение этого препарата к схеме лечения совместно с дакарбазином существенно увеличило медиану выживаемости до 1, 2, 3-х лет с момента постановки диагноза.

Недавно появились новые моноклональные антитела против CTLA-4, такие как тремелимумаб, а также антитела против PD1 пембролизумаб

и ниволумаб, известный как «MDX1106», для лечения метастатической меланомы, одобренные в 2014 г. Данные препараты блокируют рецептор программированной клеточной гибели PD-1, который экспрессируется на поверхности Т-лимфоцитов. Этот рецептор, как и CTLA-4, связывает два лиганда PD1-L1 и PD1-L2, в результате ингибируется продукция цитокинов и цитолитическая активность PD-1, а раковые клетки избегают контроля со стороны иммунной системы. Моноклональные антитела против PD-1 и PD1-L1 способны стимулировать цитотоксическую активность иммунной системы и ингибировать рост опухоли.

В ряде обзоров обобщены имеющиеся на сегодня подходы к лечению меланомы [42, 43]. Наиболее перспективной является комбинированная терапия, которая включает таргетную терапию, направленную, главным образом, на ингибирование MAPK-пути с учетом мутаций в генах, кодирующих компоненты этого сигнального каскада, и иммунотерапию. Благодаря использованию данного подхода, удалось значительно увеличить выживаемость больных метастатической меланомой [44]. Однако остается проблема резистентности к таким препаратам, которая не решена.

МикроРНК

МикроРНК (miR) также рассматриваются как потенциальные маркеры диагностики, лечения и прогноза меланомы. Показано, что нарушение экспрессии таких микроРНК, как let-7a,b, miR-148, miR-155, miR-182, miR-200c, miR-211, miR-214, miR-221 и miR-222, связано с экспрессией ассоциированных с меланомой генов *NRAS*, *MITF*, *c-KIT*, фактора транскрипции AP-2 [45]. МикроРНК могут также вносить вклад в эпигенетическую регуляцию экспрессии генов в меланоцитах. Показана взаимосвязь между экспрессией miR-203, miR-26 и amiR-29 и их некоторых генов-мишеней *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Mesp2*, *Ezh2* при клеточной трансформации [46]. Результаты были подтверждены на модели клеток меланомы мышей: miR-203 негативно регулировала экспрессию гена метилтрансферазы *Dnmt3b*. Более того, обработка клеток меланомы ингибитором ДНК метилтрансферазы 5-аза-2'-деоксицитидином сопровождалась усилением экспрессии miR-26 и miR-29, что подтверждает эпигенетический механизм регуляции экспрессии генов. В настоящее время микроРНК также рассматривают как потенциальные прогностические маркеры меланомы. Исследования профиля экспрес-

сии микроРНК позволили вывить 12 микроРНК, связанных с увеличением времени (более четырех лет) выживания [47]. Из них пять микроРНК: miR-142-5p, miR-150-5p, miR-342-3p, miR-155-5p и miR-146b-5p являются перспективными для использования в клинике. Активно ведутся исследования, устанавливающие взаимосвязь между экспрессией микроРНК и маркерных генов меланомы. Недавно показано, что miR-377 регулирует экспрессию транскрипционного фактора E2F3 и влияет на NF-κB-сигнальный путь, ингибируя MAP3K7 в меланоме [48].

Исследования экспрессии и механизма действия микроРНК позволяют выявить взаимодействие различных патогенетических факторов. Показано, что мутации *BRAF* в метастатической меланоме и папиллярном раке щитовидной железы сопровождаются усилением экспрессии miR-3151, которая также коактивируется комплексом SP1/NF-κB. MiR-3151 непосредственно взаимодействует с *TP53*. Уменьшение экспрессии miR-3151 ведет к накоплению мРНК и экспрессии белка p53 и его локализации в ядре.

Характеристика *TP53* как эффектора miR-3151 обеспечивает доказательства причинной связи между мутациями *BRAF* и инактивацией *TP53*. Нокдаун miR-3151 ведет к каспаза-3-зависимому апоптозу (рис. 7). Таким образом, одновременное подавление мутантного активированного BRAF вемурафенибом и нокдаун miR-3151 представляют новый терапевтический подход в лечении меланомы [49].

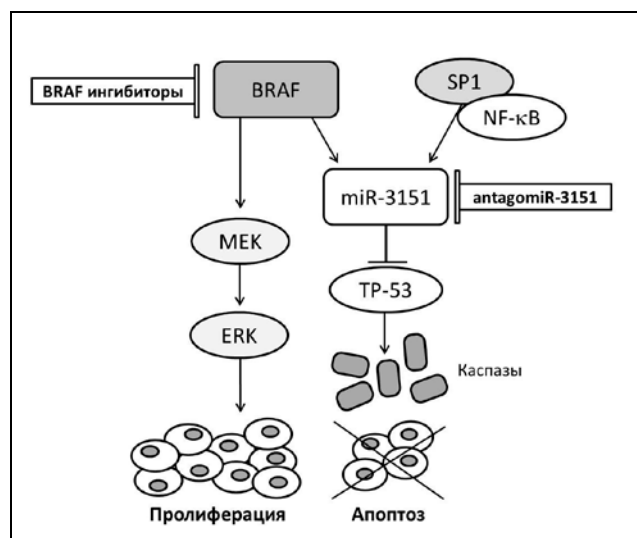


Рис. 7. Схема взаимодействия BRAF, miR-3151 и TP53. Потенциальная стратегия таргетной терапии меланомы путем ингибирования мутантного BRAF и miR-3151 [49]

Таким образом, микроРНК могут также рассматриваться как перспективные мишени для лечения меланомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования молекулярной биологии меланомы, выполненные в последнее десятилетие, кардинально изменили наши представления о механизмах канцерогенеза меланоцитов. Выявление активирующих мутаций в онкогенах ключевых сигнальных путей позволили применять таргетные препараты, многие из которых показали хороший терапевтический эффект. В настоящее время возлагается надежда на применение таких препаратов в комбинации друг с другом, а также на выявление новых молекулярных мишеней.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ueda Y., Richmond A. NF- κ B activation in melanoma // *Pigment Cell Res.* 2006. V. 19. № 2. P. 112–124.
2. Зенит-Журавлева Е.Г., Лушников А.А., Понкратова Д.А., Цыганова И.В., Михайлова И.Н., Черемушкин Е.А., Вихрова А.С., Трещалина Е.М., Мазуренко Н.Н., Демидов Л.В. Некоторые генетические особенности метастатической меланомы кожи человека // *Молекулярная медицина.* 2014. № 4. С. 57–64 (Zenit-Zhuravleva E.G., Lushnikova A.A., Ponkratova D.A., Cyganova I.V., Mihajlova I.N., Cheremushkin E.A., Vihrova A.S., Treshhalina E.M., Mazurenko N.N., Demi-dov L.V. Nekotorye geneticheskie osobennosti metastaticheskoy melanomy kozhi cheloveka // *Molekuljarnaja medicina.* 2014. № 4. S. 57–64 [In Russ.]).
3. Curtin J.A., Busam K., Pinkel D., Bastian B.C. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma // *J. Clin. Oncol.* 2006. V. 24. № 26. P. 4340–4346.
4. Griewank 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. V. 106. № 2. djt435.
5. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Лушников А.А., Понкратова Д.А., Анурова О. А., Черемушкин Е.А., Михайлова И.Н., Демидов Л.В. Спектр мутаций онкогенов различается в субтипах меланомы кожи // *Молекулярная биология.* 2015. Т. 59. № 6. С. 1061–1066 (Mazurenko N.N., Cyganova I.V., Lushnikova A.A., Ponkratova D.A., Anurova O. A., Cheremushkin E.A., Mihajlova I.N., Demi-dov L.V. Spektr mutacij onkogenov razlichaetsja v subtipah melanomy kozhi // *Molekuljarnaja biologija.* 2015. Т. 59. № 6. S. 1061–1066 [In Russ.]).
6. Van Raamsdonk C.D., Bezrookove V., Green G., Bauer J., Gaugler L., O'Brien J.M., Simpson E.M., Barsh G.S., Bastian B.C. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi // *Nature.* 2009. V. 457. № 7229. P. 599–602.
7. Van Raamsdonk C.D., Griewank K.G., Crosby M.B., Garrido M.C., Vemula S., Wiesner T., Obenaus A.C., Wackernagel W., Green G., Bowler N., Sozen M.M., Baimukanova G., Roy R., Heguy A., Dolgalev I., Khanin R., Busam K., Speicher M.R., O'Brien J., Bastian B.C. Mutations in GNA11 in uveal melanoma // *N. Engl. J. Med.* 2010. V. 363 № 23. P. 2191–2199.
8. Harbour J.W., Onken M.D., Roberson E.D., Duan S., Cao L., Worley L.A., Council M.L., Matattall K.A., Helms C., Bowcock A.M. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas // *Science.* 2010. V. 330. № 6009. P. 1410–1413.
9. Harbour J.W., Roberson E.D., Anbunathan H., Onken M.D., Worley L.A., Bowcock A.M. Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 2. P. 133–135.
10. Martin M., Masshofer L., Temming P., Rahmann S., Metz C., Bornfeld N., van de Nes J., Klein-Hitpass L., Hinnebusch A.G., Horsthemke B., Lohmann D.R., Zeschnigk M. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3 // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 8. P. 933–936.
11. Puzanov I., Flaherty K.T. Targeted molecular therapy in melanoma // *Semin. Cutan. Med. Surg.* 2010. V. 29. № 3. P. 196–201.
12. Bertolotto C. Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options // *Scientifica (Cairo).* 2013. Article ID 635203.
13. Hodi F.S., Corless C.L., Giobbie-Hurder A., Fletcher J.A., Zhu M., Marino-Enriquez A., Friedlander P., Gonzalez R., Weber J.S., Gajewski T.F., O'Day S.J., Kim K.B., Lawrence D., Flaherty K.T., Luke J.J., Collichio F.A., Ernstoff M.S., Heinrich M.C., Beadling C., Zukotynski K.A., Yap J.T., Van den Abbeele A.D., Demetri G.D., Fisher D.E. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin // *J. Clin. Oncol.* 2013. V. 31. № 26. P. 3182–3190.
14. Kim K.B., Alrwas A. Treatment of KIT-mutated metastatic mucosal melanoma // *Chin. Clin. Oncol.* 2014. V. 3. № 3. P. 35. doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2014.08.02.
15. Carvajal R.D., Lawrence D.P., Weber J.S., Gajewski T.F., Gonzalez R., Lutzky J., O'Day S.J., Hamid O., Wolchok J.D., Chapman P.B., Sullivan R.J., Teitcher J.B., Ramaiya N., Giobbie-Hurder A., Antonescu C.R., Heinrich M.C., Bastian B.C., Corless C.L., Fletcher J.A., Hodi F.S. Phase II Study of Nilotinib in Melanoma Harboring KIT Alterations Following Progression to Prior KIT Inhibition // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 10. P. 2289–2296.
16. Prosvicova J., Lukesova S., Kopecky J., Grim J., Papik Z., Kolarova R., Navratilova B., Dubreuil P., Agopian J., Mansfield C., Moussy A., Hermine O. Rapid and clinically significant response to masitinib in the treatment of mucosal primary esophageal melanomawith somatic KIT exon 11 mutation involving brain metastases: A case report // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015. V. 159. № 4. P. 695–697.
17. Kong Y., Si L., Zhu Y., Xu X., Corless C.L., Flaherty K.T., Li L., Li H., Sheng X., Cui C., Chi Z., Li S., Han M., Mao L., Lu A., Guo J. Large-scale analysis of KIT aberrations in Chinese patients with melanoma // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 7. P. 1684–1691.
18. Johnson D.B., Puzanov I. Treatment of NRAS-mutant melanoma // *Curr. Treat. Options Oncol.* 2015. V. 16. № 4. P. 15. doi: 10.1007/s11864-015-0330-z.
19. Mishra P.J., Ha L., Rieker J., Sviderskaya E.V., Bennett D.C., Oberst M.D., Kelly K., Merlino G. Dissection of RAS downstream pathways in melanomagenesis: a role for Ral in transformation // *Oncogene.* 2010. V. 29. № 16. P. 2449–2456.

20. Fedorenko I.V., Gibney G.T., Smalley K.S. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management // *Oncogene*. 2013. V. 32. № 25. P. 3009–3018.
21. Kelleher F.C., McArthur G.A. Targeting NRAS in melanoma // *Cancer J*. 2012. V. 18. № 2. P. 132–136.
22. Inamdar G.S., Madhunapantula S.V., Robertson G.P. Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail // *Biochem. Pharmacol.* 2010. V. 80. № 5. P. 624–637.
23. Moorthy N.S., Sousa S.F., Ramos M.J., Fernandes P.A. Farnesyltransferase inhibitors: a comprehensive review based on quantitative structural analysis // *Curr. Med. Chem.* 2013. V. 20. № 38. P. 4888–4923.
24. Gajewski T.F., Salama A.K., Niedzwiecki D., Johnson J., Linette G., Bucher C., Blaskovich M.A., Sefti S.M., Haluska F. Cancer and Leukemia Group B. Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in advanced melanoma (CALGB 500104) // *J. Transl. Med.* 2012. № 10. P. 246.
25. Wolfson E., Schmukler E., Schokoroy S.T., Kloog Y., Pinkas-Kramarski R. Enhancing FTS (Salirasib) efficiency via combinatorial treatment // *Biol. Cell*. 2015. V. 107. № 5. P. 130–143.
26. Furue M., Kadono T. Melanoma therapy: Check the checkpoints // *J. Dermatol.* 2016. V. 43. № 2. P. 121–124.
27. Dhoman N., Marais R. BRAF signaling and targeting in melanoma // *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 2009. V. 23. № 3. P. 529–545.
28. Goldinger S.M., Murer C., Stieger P., Dummer R. Targeted therapy in melanoma - the role of BRAF, RAS and KIT mutations // *E.J.C. Suppl.* 2013. V. 11. № 2. P. 92–96.
29. Poynter J.N., Elder J.T., Fullen D.R., Nair R.P., Soengas M.S., Johnson T.M., Redman B., Thomas N.E., Gruber S.B. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi // *Melanoma Res.* 2006. V. 16. № 4. P. 267–273.
30. Tan J.M., Lin L.L., Lambie D., Flewell-Smith R., Jagirdar K., Schaidler H., Sturm R.A., Prow T.W., Soyer H.P. BRAF wild-type melanoma in situ arising in a BRAF V600E mutant dysplastic nevus // *JAMA Dermatol.* 2015. V. 151. № 4. P. 417–421.
31. Goel V.K., Lazar A.J., Warneke C.L., Redston M.S., Haluska F.G. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma // *J. Invest. Dermatol.* 2006. V. 126. № 1. P. 154–160.
32. Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B., Ribas A., McArthur G.A., Sosman J.A., O'Dwyer P.J., Lee R.J., Grippo J.F., Nolop K., Chapman P.B. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma // *N. Engl. J. Med.* 2010. V. 363. № 9. P. 809–819.
33. Johnpulle R.A., Johnson D.B., Sosman J.A. Molecular Targeted Therapy Approaches for BRAF Wild-Type Melanoma // *Curr. Oncol. Rep.* 2016. V. 18. № 1. P. 6. doi: 10.1007/s11912-015-0485-6.
34. Si L., Kong Y., Xu X., Flaherty K.T., Sheng X., Cui C., Chi Z., Li S., Mao L., Guo J. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: Large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort // *Eur. J. Cancer.* 2010. V. 48. № 1. P. 94–100.
35. Jakob J.A., Bassett R.L. Jr., Ng C.S., Curry J.L., Joseph R.W., Alvarado G.C., Rohlf M.L., Richard J., Gershenwald J.E., Kim K.B., Lazar A.J., Hwu P., Davies M.A. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma // *Cancer.* 2012. V. 118. № 16. P. 4014–4023.
36. Thota R., Johnson D.B., Sosman J.A. Trametinib in the treatment of melanoma // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015. V. 15. № 5. P. 735–747.
37. Eroglu Z., Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy // *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2016. V. 8. № 1. P. 48–56.
38. Tran K.A., Cheng M.Y., Mitra A., Ogawa H., Shi V.Y., Olney L.P., Kloxin A.M., Maverakis E. MEK inhibitors and their potential in the treatment of advanced melanoma: the advantages of combination therapy // *Drug Des. Devel. Ther.* 2016. V. 10. P. 43–52. doi: 10.2147/DDDT.S93545.
39. Sheppard K.E., McArthur G.A. The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 19. P. 5320–5328.
40. Mirjagic Martinovic K.M., Babovic N.L., Dzodic R.R., Jurisic V.B., Tanic N.T., Konjevic G.M. Decreased expression of NKG2D, NKp46, DNAM-1 receptors, and intracellular perforin and STAT-1 effector molecules in NK cells and their dim and bright subsets in metastatic melanoma patients // *Melanoma Res.* 2014. V. 24. № 4. P. 295–304.
41. Tarazona R., Duran E., Solana R. Natural Killer Cell Recognition of Melanoma: New Clues for a More Effective Immunotherapy // *Front Immunol.* 2016. V. 6. P. 649. doi: 10.3389/fimmu.2015.00649.
42. Мазуренко Н.Н. Генетическая гетерогенность меланомы кожи: новые мишени для селективного воздействия // Злокачественные опухоли. 2015. 4s2. P. 3–8. doi.org/10.18027/2224-5057-2015-4s-2. (Mazurenko N.N. Geneticheskaja geterogennost' melanomy kozhi: novye misheni dlja selektivnogo vozdejstvija // Zlokachestvennye opuholi. 2015. 4s2. P. 3–8. doi.org/10.18027/2224-5057-2015-4s-2 [In Russ.].)
43. Vennepureddy A., Thumallapally N., Motilal Nehru V., Atallah J.P., Terjanian T. Novel Drugs and Combination Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma // *J. Clin. Med. Res.* 2016. V. 8. № 2. P. 63–75.
44. Zhu Z., Liu W., Gotlieb V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma-Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2015. V. 99. P. 91–99. pii: S1040-8428(15)30091-3. doi: 10.1016/j.critrevonc. 2015.12.002.
45. Mirzaei H., Gholamin S., Shahidsales S., Sahebkar A., Jaafari M.R., Mirzaei H.R., Hassanian S.M., Avan A. MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma // *Eur. J. Cancer.* 2016. V. 53. P. 25–32. doi: 10.1016/j.ejca.2015.10.009.
46. Gasque Schoof C.R., Izzotti A., Jasiulionis M.G., Vasques Ldos R. The Roles of miR-26, miR-29, and miR-203 in the Silencing of the Epigenetic Machinery during Melanocyte Transformation // *Biomed. Res. Int.* 2015. 2015. 634749. doi: 10.1155/2015/634749.
47. Jayawardana K., Schramm S.J., Tembe V., Mueller S., Thompson J.F., Scolyer R.A., Mann G.J., Yang J. Identification, Review, and Systematic Cross-Validation of microRNA Prognostic Signatures in Metastatic Melanoma // *J. Invest. Dermatol.* 2016. V. 136. № 1. P. 245–254.
48. Zehavi L., Schayek H., Jacob-Hirsch J., Sidi Y., Leibowitz-Amit R., Avni D. MiR-377 targets E2F3 and alters the NF-κB signaling pathway through MAP3K7 in malignant melanoma // *Mol. Cancer.* 2015. 14. P. 68. doi: 10.1186/s12943-015-0338-9.

49. Lankenau M.A., Patel R., Liyanarachichi S., Maharry S.E., Hoag K.W., Duggan M., Walker C.J., Markowitz J., Carson III W.E., Eisfeld A.-K., de la Chapelle A. MicroRNA-3151

inactivates TP 53 in BRAF-mutated human malignancies // PNAS. 2015. E6744–E6751.

Поступила 20 сентября 2016 г.

MOLECULAR GENETIC ASPECTS OF MELANOMA PART 2. MOLECULAR MARKERS FOR TARGET THERAPY

© Authors, 2017

L.F. Gulyaeva

Ph.D. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Carcinogenesis, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics (Novosibirsk)

N.N. Mazurenko

Ph.D. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory of Onkogenomiks Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Russian (Moscow)

N.E. Kushlinskii

Ph.D. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Russian (Moscow)

Melanoma – the most dangerous malignant skin disease with a high risk of recurrence and metastasis. Molecular biological studies carried out in the last decade have dramatically changed our understanding of the mechanisms of melanocyte carcinogenesis. This review describes how hereditary factors predisposing to melanoma (rare mutant alleles of *CDKN2A*, *CDK4*, *MITF* and *BAP1* genes) and somatic genetic abnormalities involved in the carcinogenesis of melanocytes. Gene mutations that cause hyperactivation of RAS-MAPK- (KIT, ERBB4, BRAF, NRAS, MEK, NF1) and PI3K- (PTEN, AKT) signaling pathways are analyzed. Also considered is the role of CAMP and NF-κB in melanomagenesis. Identification of mutations in oncogenes activating key signaling pathways has allowed using drugs of targeted actions (Target therapy), many of which showed a good therapeutic effect. The combined treatment with immunotherapy is particularly promising for melanoma.

Key words: melanoma, genetic disorders, RAS-MAPK- and PI3K-signaling pathways, carcinogenesis.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Камадол (масляный экстракт) (рег. № 96/432/13) – противовоспалительное средство, получаемое из травы ромашки аптечной (ромашки ободранной) *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (*Matricaria recutita* L., *M. chamomilla* L.) и травы ноготков лекарственных (календулы лекарственной) – *Calendula officinalis* L., экстракцией маслом из плодов расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Леспефлан (экстракт жидкий очищенный) (рег. №№ 001423/01; 000571; 001865/01) – гипотензивное, диуретическое и противовоспалительное средство в комплексном лечении хронической почечной недостаточности различного генеза, получаемое из побегов леспедецы двуцветной (*Lespedeza bicolor* Turcz.).

Хелепин (таблетки, мазь) рег. №№ 87/1186/10; 87/1186/7 – противовирусное средство при заболеваниях, вызываемых ДНК-геномными вирусами группы герпеса, получаемое из травы дикорастущего растения леспедецы копеечниковой (*Lespedeza hedyсарoides* (Pall.) Kitag.).

Хелепин Д (таблетки, мазь, глазные капли), рег. №№ 94/108/6; 94/108/7; 99/47/11 – противовирусное средство, получаемое из травы культивируемого растения десмодиума канадского (*Desmodium canadense* D.C.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru