

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-006.81-085.015.44:577.21.088

Мазуренко Н.Н.¹, Гуляева Л.Ф.², Кушлинский Н.Е.¹

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И МИШЕНИ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва;

²ФГБНУ НИИ молекулярной биологии и биофизики, 630117, Новосибирск

Меланома – наиболее опасное злокачественное заболевание кожи с высоким риском рецидивирования и метастазирования. Молекулярно-биологические исследования, выполненные в последнее десятилетие, кардинально изменили наши представления о механизмах канцерогенеза меланоцитов. В обзоре рассматриваются как наследственные факторы предрасположенности к меланоме (редкие аллели генов CDKN2A и CDK4, мутации MITF и BAP1), так и соматические генетические нарушения, вовлеченные в канцерогенез меланомы. Это мутации в генах, вызывающих гиперактивацию RAS-МАРК (BRAF, NRAS, MEK, NF1) и PI3K- (PTEN, AKT) сигнальных путей, а также генов тирозинкиназных рецепторов KIT, ERBB4, активирующих передачу сигнала в клетке. Рассматривается также роль cAMP и NF-κB в меланомогенезе. Выявление активирующих мутаций в онкогенах ключевых сигнальных путей позволило применять препараты целенаправленного действия (таргетные), многие из которых показали хороший терапевтический эффект. Особенно перспективно комбинированное лечение меланомы в сочетании с иммунотерапией.

Ключевые слова: меланома; молекулярный канцерогенез; генетические нарушения; RAS-МАРК- и PI3K-сигнальные пути; таргетная терапия.

Для цитирования: Мазуренко Н.Н., Гуляева Л.Ф., Кушлинский Н.Е. Генетические маркеры и мишени таргетной терапии меланомы. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (6): 363-371. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-363-371>

Mazurenko N.N.¹, Gulyaeva L.F.², Kushlinski N.E.¹

THE GENETIC MARKERS AND TARGETS OF TARGET THERAPY OF MELANOMA

¹The N.N. Blokhin Russian oncologic research center of Minzdrav of Russia, 115478 Moscow, Russia

²The research institute of molecular biology and biophysics, 630117 Novosibirsk, Russia

Melanoma is the most dangerous malignant disease of skin with high risk of relapsing and metastasis dissemination. The molecular biological studies implemented during last decade drastically altered our concepts about mechanisms of carcinogenesis of melanocytes. The review considers both hereditary factors of predisposition to melanoma (rare alleles of genes CDKN2A and CDK4, mutations MITF and BAP1) and somatic genetic disorders involved into carcinogenesis of melanoma. These mutations in genes causing hyper-activation of RAS-MAPK (BRAF, NRAS, MEK, NF1) and PI3K- (PTEN, AKT) of signaling pathways and also genes of tyrosine-kinase receptors KIT, ERBB4 activating transfer of signal in cell. Also, the role of cAMP and NF-κB in melanomagenesis is considered. The detection of activating mutations of key signaling pathways in oncogenes permitted to apply medications of target action many of which demonstrated a good therapeutic effect. The combined treatment of melanoma in aggregate with immune therapy is especially perspective.

Key words: melanoma; molecular carcinogenesis; genetic disorders; RAS-MAPK- and PI3K-signaling pathways; target therapy.

For citation: Mazurenko N.N., Gulyaeva L.F., Kushlinski N.E. The genetic markers and targets of target therapy of melanoma. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic) 2017; 62 (6): 363-371. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-363-371>

For correspondence: Mazurenko N.N., doctor of biological sciences, professor, the head of laboratory. e-mail: nnmazurenko@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. This study was supported by a grant of the Russian Scientific Foundation (№14-35-00107).

Received 01.09.2016

Accepted 15.09.2016

Введение. Меланома – наиболее опасное злокачественное заболевание кожи с высоким риском рецидивирования и метастазирования. Меланома составляет менее 10% злокачественных новообразований кожи, однако ответственна за 80% смертей в этой группе заболеваний. В 2012 г. в мире зарегистрировано 232 130 новых случаев меланомы, ежегодный прирост заболеваемости меланомой в течение последних 40 лет составил около 5% [1]. По прогнозу ВОЗ, заболеваемость меланомой в мире в течение 10 лет вырастет на 25%.

Для корреспонденции: Мазуренко Наталья Николаевна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. НИИ канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; e-mail: nnmazurenko@mail.ru

Меланома возникает в результате трансформации меланоцитов, специализированных пигментпродуцирующих клеток, находящихся в базальном слое эпидермиса или увеальной оболочке глаза. Ультрафиолетовое (УФ) облучение – главный внешний фактор развития меланомы, при этом существенно увеличивается риск образования меланомы у людей со светлой кожей. Как правило, меланоциты синтезируют пигменты меланина и переносят их в окружающие кератиноциты. В результате кожа пигментируется, что защищает ее от поврежденной, вызванной солнечной ультрафиолетовой радиацией [1].

В 30% случаев отмечено развитие меланомы из пигментных поражений, называемых доброкачественными невусами, которые затем трансформируются в диспластические невусы. Дальнейшее развитие приводит к меланоме *in situ*,

которая растет латерально (поверхностнораспространяющаяся меланома) и в основном ограничена эпидермисом (радиальная фаза роста меланомы, radial growth phase – RGP). Меланома I и II стадии местно локализованного процесса может быть излечена хирургическим путем, при этом показатели 5-летней выживаемости составляют 90–100%. Без лечения поверхностная меланома прогрессирует с инвазией дермы клетками меланомы и приобретением метастатического потенциала – вертикальная фаза роста (vertical growth phase – VGP). Показатель общей 5-летней выживаемости пациентов при метастатической меланоме составляет только 15%. В 15–40% случаев меланома развивается подкожно и возникает из эпидермальных меланоцитов в виде опухолевого узла в результате вертикального роста клеток в дерму (узловая меланома).

Меланома отличается чрезвычайной клинико-морфологической гетерогенностью и спектром молекулярно-генетических нарушений. В соответствии с локализацией и степенью воздействия солнечных лучей выделяют несколько основных подтипов меланомы кожи: 1) поверхностнораспространяющаяся на участках тела, закрытых для хронического солнечного воздействия (non chronic sun-induced damage – Non-CSD); 2) меланома на участках кожи, открытых для постоянного солнечного облучения (chronic sun-induced damage – CSD); 3) узловая; 4) акральная – меланома кожи ладоней или ногтевого ложа. Хотя фактором риска меланомы служит инсоляция, меланома кожи чаще возникает на закрытых участках тела. Более редко, у 1–2% пациентов, встречается меланома слизистых оболочек различной локализации (mucosal): синоназальной области, гениталий, аноректальной области, дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Меланома глаза более распространена (3–7% пациентов), различают увеальную меланому хориоидеи, цилиарного тела или радужки и меланому конъюнктивы [1–3].

Заболеваемость меланомой зависит от расы пациента: представители белой расы (европеиды) чаще болеют поверхностнораспространяющейся меланомой кожи, тогда как у представителей азиатской или африканской рас преимущественно выявляют меланому слизистых оболочек или акральную. В частности, в китайской популяции преобладает меланома слизистых оболочек (33,3%) и акральная меланома с частотой 38,4% [4].

Генетика меланомы. Гены-кандидаты. Исторически наследственные мутации высокого риска развития того или иного вида злокачественных новообразований, в частности в онкогенах или генах-супрессорах опухоли, были открыты на основании анализа родословной. В последние 5 лет с помощью полногеномного анализа (genome-wide association studies – GWAS) идентифицируют однонуклеотидные замены (SNPs), связанные с риском развития опухоли, в том числе меланомы. Недавние исследования показали, что многие болезни вызваны комбинацией различных аллелей, которые классифицируют в зависимости от степени их пенетрантности.

Около 10% наблюдений меланомы – наследственные [5]. Основные факторы риска включают семейную историю, большое число nevusов, долгое пребывание под солнцем. В семейных формах меланомы идентифицированы редкие аллели генов CDKN2A и CDK4, важных регуляторов клеточного цикла. Ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A) идентифицирован около 20 лет назад как первый высокопенетрантный ген предрасположенности к развитию меланомы. Позднее был найден другой ген циклинзависимой киназы 4 CDK4. Мутации в этих генах существенно повышают риск развития меланомы [6]. Ген CDKN2A, локализованный в локусе 9p21, кодирует супрессоры опухолевого роста p16^{INK4a} и p14^{ARF}, которые транскрибируются с разных экзо-

нов и транслируются в разных рамках считывания. Для гена CDKN2A это чаще всего мутация, соответствующая замене G101W в белке p16^{INK4a} [7]. Потеря функции p16^{INK4a} вызывает усиление киназной активности CDK4 и CDK6, которые фосфорилируют белок RB, связанный с транскрипционным фактором E2F1. Последний высвобождается из комплекса и запускает транскрипцию генов S-фазы клеточного цикла, обеспечивая дальнейшее продвижение клеточного деления. Важность белка p16^{INK4a} в развитии меланомы доказана также как повышенной частотой выявления соматических мутаций (до 50%), так и эпигенетическими нарушениями экспрессии гена в образцах опухоли (выключение метилированием в 9% наблюдений) [8]. Комплексный анализ картины генетических и эпигенетических изменений локусов-супрессоров опухолевого роста p16^{INK4a} и p14^{ARF} в меланоме показал, что p14^{ARF} также часто инактивирован [9]. Мутации p14^{ARF} приводят к недостатку p53, который контролирует целостность и репарацию ДНК [10].

Дальнейшее развитие исследований генов предрасположенности к меланоме выявило новые гены: BAP1, гены хемокинов CXС, ген субъединицы обратной транскриптазы TERT, ген POT1 (Protection of telomeres 1), гены ACD и TERF2IP [11, 12]. Последние четыре гена играют важную роль в поддержании теломерных участков хромосом. Кроме мутаций, для наследственных вариантов меланомы характерны полиморфизмы в генах, участвующих (MC1R, ASIP, MATP) и не участвующих (MTAP, TERT, CASP8) в пигментации кожи [1, 9]. Эти гены сами по себе не вносят вклад в риск развития меланомы, но могут действовать как модификаторы генов высокого риска.

Дальнейшие эпидемиологические исследования подтвердили, что некоторые гены могут быть кандидатами повышенного риска развития меланомы. Это, в частности, ген рецептора меланокортина 1 (MC1R) – ключевого регулятора пигментации кожи и дифференцировки меланоцитов. Белок MC1R относится к трансмембранным G-белковым рецепторам, которые экспрессируются на поверхности эпидермальных меланоцитов. MC1R активирует аденилатциклазу и сAMP-РКА-CREB-каскад через меланоцитстимулирующий гормон альфа (α -MSH) и адренкортикотропный гормон (АКТГ) [13]. MC1R также важен в определении фенотипа пигментации, чувствительности к солнечным лучам и восприимчивости кожи к загару. Определенные полиморфные аллельные варианты MC1R, ответственные за рыжие волосы, светлую кожу и низкую чувствительность к загару, связывают с чувствительностью к УФ-радиации и раку кожи [14]. В комбинации с мутациями в высокопенетрантном гене CDKN2A эти низкопенетрантные гены могут вносить свой вклад в риск развития меланомы [15].

Среди других генов, критичных для гомеостаза меланоцитов и развития меланомы, важен транскрипционный фактор MITF (microphthalmia-associated transcription factor). Этот фактор сейчас рассматривают как «мастер-ген» гомеостаза меланоцитов [16]. MITF принадлежит к суперсемейству транскрипционных факторов TFE, которые, как и белки Мус, Мах, Mad, содержат мотив bHLHZip. Потеря функции MITF в результате мутаций связана с наследственными нарушениями в развитии нервного гребня, синдромов Ваарденбурга и Тица, характеризующимися потерей меланоцитов и дефектами пигментации [17]. У взрослых людей MITF вовлечен в поддержание меланоцитарных стволовых клеток и контроль дифференцировки меланоцитов. Фактор MITF обеспечивает антиоксидантную защиту и усиливает антиапоптотические свойства меланоцитов [18]. Оказалось, что это белок вовлечен в патогенез меланомы. Показано, что ген MITF амплифицирован у 10–20% больных меланомой, что связано также с показателями 5-летней выживаемости [19]. Более того, MITF

запускает трансформацию иммортализованных меланоцитов совместно с мутантным V600E BRAF. Генами-мишенями для MITF служат гены выживания и апоптоза (BCL2, NIF1A, BCL2A1), миграции (DIAPH1, MET) и пролиферации (CDK2, TBX2, CDKN1B). В некоторых наблюдениях семейная меланома связана с миссенс-мутацией p.E318K в гене MITF, при которой усилено связывание MITF с промотором NIF1-а [11, 12]. Эта мутация встречается в европейских популяциях довольно редко: ее частота колеблется между 0,003% у французов и 0,085% у англичан. Интересно, что эта же мутация характерна для рака почки. Показано, что у больных раком почки в качестве 2-й неоплазии часто выявляют меланому и наоборот, что подтверждает роль транскрипционного фактора MITF в развитии этих патологий [9].

В 2011 г. описан наследственный синдром развития мезотелиомы, связанный с мутацией в гене-супрессоре VAP1 (BRCA1 – associated protein 1) [20]. Белок VAP1 участвует в процессах убиквитинзависимого протеолиза в составе белковых комплексов, что делает его важным регулятором многих клеточных процессов, включая ремоделирование хроматина, прогрессию клеточного цикла, репарацию ДНК и дифференцировку. Дальнейшие исследования показали, что носители мутации в этом гене имеют высокий риск развития других онкологических заболеваний, в том числе увеальной меланомы, меланомы кожи, светлоклеточного рака почки, аденокарциномы легких [21, 22]. Мутации VAP1 обнаружены и в спорадических меланоцитарных новообразованиях, сходных по гистологии с семейными опухолями [23]. В семьях таких больных выявляют также рак яичников, рак молочной и поджелудочной желез, что может быть проявлением наследственного VAP1-синдрома.

Показана также ассоциация генетического полиморфизма SNP309 ингибитора p53 MDM2, а также ряда других генов апоптоза с риском развития меланомы [24, 25].

Таким образом, выявлено более десятка генов предрасположенности к меланоме с разной степенью пенетрантности. Безусловно, для использования результатов генетических исследований в клинической практике необходимы дальнейшие популяционные исследования, однако уже сегодня Международный консорциум по генетике меланомы рекомендует проводить анализ мутаций в локусе CDKN2A (p16^{INK4a}) у пациентов с семейной историей меланомы [26].

Основные сигнальные пути, вовлеченные в развитие меланомы. Ключевой сигнальный каскад, вовлеченный в патогенез развития меланомы, MAPK-путь, который служит основой для использования таргетной терапии.

RAS-MAPK-путь. Классический MAPK-каскад состоит из белков семейств RAS и собственно митогенактивированных серин/треонин протеинкиназ RAF, MEK и ERK, передающих пролиферативный сигнал с клеточной поверхности через цитоплазму в ядро. В нормальной клетке этот сигнал стимулируется митогенами, гормонами или нейротрансмиттерами, которые связываются с тирозинкиназными рецепторами. Последние димеризуются и активируют ГТФазу RAS, в результате в клетке увеличивается уровень активной формы RAS-GTP. Активированный RAS запускает активацию MAPK-каскада протеинкиназ RAF, MEK1/2, ERK1/2. Белки ERK1/2 регулируют экспрессию генов, вовлеченных в клеточную пролиферацию, дифференцировку и выживание путем фосфорилирования транскрипционных факторов ETS, ELK-1, MYC. MAPK-путь также влияет на посттрансляционное фосфорилирование апоптотических сигнальных молекул BAD, BIM, MCL-1, каспазу 9 и BCL-2, таким образом, регулируя апоптоз [27].

MAPK-путь вовлечен в развитие меланомы с проведением сигнала либо напрямую от рецепторов, либо вместе с другими путями, такими как PI3K-сигнальный путь [28,

29]. Гиперактивация сигнального пути RAS-MAPK наблюдается в 90% случаев меланомы кожи, более половины всех меланом кожи имеют активирующие мутации в BRAF и 15–20% – в NRAS. В 19% меланом с отсутствием мутаций BRAF и NRAS (pan-negative) обнаружены мутации ERBB4. Итогом становится активация RAS-MAPK- и PI3K-mTOR-сигнальных путей, приводящая к усилению пролиферации, а ERBB4, подобно BRAF и NRAS, может быть мишенью для таргетной терапии [30].

Наиболее часто (в 15%) после BRAF и NRAS соматические мутации в меланоме кожи выявлены в гене NF1. NF1 кодирует нейрофибромин, который негативно регулирует RAS-сигналинг: активируется RAS-GTF и гидролизует его до RAS-GDF. Установлено, что 40–50% pan-negative-меланом содержат функционально инактивирующие мутации NF1, причем мутации NF1 и BRAF (но не NRAS) взаимно исключены [31, 32]. В связи с этим предложено рассматривать четыре генетические подгруппы меланомы кожи [31] (Cancer Genome Atlas Network, 2015): имеющие драйверные мутации BRAF, NRAS, NF1 (pan-negative-меланомы, не имеющие BRAF- и NRAS-мутаций в «горячих точках») и Triple WT-меланомы (с трижды диким типом, не имеющие мутаций BRAF, NRAS, NF1). Пациенты NF1-подтипа более старшего возраста, чем пациенты с мутациями BRAF, содержат большее число генетических нарушений и часто имеют дополнительные мутации в генах, связанных с RAS (RASA1, RASA2, PTPN11, SOS1) [32]. В 50% десмопластической меланомы, редкой формы меланомы с саркоматозной гистологией, возникающей на участках кожи с хронической инсоляцией, обнаружены мутации NF1, что указывает на роль NF1 в меланомогенезе.

Генетические подтипы меланомы характеризуются молекулярными и клиническими особенностями. Только 30% Triple WT-меланом имеют УФ-индуцированный спектр мутаций, характерный для 90% меланом других трех типов. В Triple WT-меланоме отмечено много амплификаций, в частности на 4q12, содержащей гены KIT, PDGFR и VEGFR2, в локусах TERT, CDK4 и CCND1, а также много сложных генетических нарушений и потенциально сливных генов. В частности, в Triple WT-меланоме больше KIT-мутаций [31].

Важнейшим генетическим событием в меланоме является активация сигнального пути PI3K-AKT-mTOR, причем уровень активации серин-треонин киназы AKT3 повышается с увеличением стадийности меланомы. Активация AKT3 отмечена в 60% случаев спорадической меланомы, причем чаще за счет амплификации гена AKT3 и редко за счет мутации AKT3 либо PI3K.

В 40–60% меланомы кожи инактивирована фосфатаза PTEN, которая функционирует как опухолевый супрессор. PTEN дефосфорилирует PIP-3-продукты и, таким образом, негативно регулирует PI3K-AKT-сигнальный путь [33]. Экспрессия PTEN почти всегда наблюдается в цитоплазме доброкачественных и диспластических невусов, но отсутствует в большинстве случаев меланомы. Утрата экспрессии PTEN происходит в результате мутации, потери гетерозиготности или утраты хромосомы либо в результате эпигенетических нарушений за счет метилирования или микро-РНК-регуляции. Утрата PTEN не характерна для меланомы с мутацией NRAS, тогда в меланоме с мутацией BRAF наблюдается повышенная экспрессия AKT3 за счет амплификации. Выявленные генетические нарушения в основных молекулах данных сигнальных путей послужили основой для разработки лекарственных препаратов, направленных на ингибирование сигнальных каскадов.

sAMP-сигнальный путь. В меланоцитах, помимо MAPK-пути, важную роль играет sAMP-сигнальный каскад [34, 35]. Показано, что sAMP стимулируется через взаимодействие

α -MSH с MC1R, последний имеет 7 трансмембранных доменов, с помощью которых связывается с гетеротримерными G-белками.

Активация лигандами приводит к накоплению уровня cAMP в меланоцитах, что сопровождается активацией протеин киназы-A, которая фосфорилирует CREB, последний стимулирует транскрипционный фактор MITF, отвечающий за дифференцировку меланоцитов. MITF регулирует экспрессию генов, связанных с синтезом меланина и функцией меланосом: TYR, TYRP1, DCT, RAB27A и GPR143. Уровень cAMP регулируется фосфодиэстеразами (PDE), 8 из 11 семейств PDE могут гидролизовать cAMP. В свою очередь активность фосфодиэстераз регулируется определенными киназами, что позволяет PDE играть ключевую роль во взаимодействии cAMP-пути с другими внутриклеточными путями.

В физиологических условиях MAPK-путь активируется через тирозинкиназные рецепторы (RTK); мутации в BRAF и NRAS, приводящие к активации этого пути, характерны для меланомы. Так, конститутивная активация cAMP-пути в меланоцитах приводит к фосфорилированию и инактивации CRAF с помощью PKA. Тогда активация RTK стимулирует в меланоцитах MAPK-путь через BRAF.

При мутации RAS-клетки используют скорее CRAF (Raf-1), чем BRAF для активации MEK-ERK-пути [34]. Около 15% меланом имеют мутацию в CRAF, причем в этом случае опухоль обладает высокой скоростью митоза, а выживаемость пациентов ниже, чем в случае дикого или мутантного BRAF [36]. Поэтому CRAF служит терапевтической мишенью в опухолях, когда «драйвером» оказывается RAS.

Мутантный BRAF с низкой киназной активностью (не с мутацией V600E) может активировать MAPK-путь через активацию CRAF. Неспособность BRAF активировать MAPK-путь в RAS-мутированной меланоме объясняется перманентной негативной обратной связью, предотвращающей его взаимодействие с RAS. Белок BRAF фосфорилирован ERK в положении S151 около RAS-связывающего домена, что ингибирует образование комплекса RAS/BRAF, причем это фосфорилирование не снимается фосфатазами, что является особенностью трансформированных меланоцитов. В меланоцитах, трансформированных онкогенным RAS, а также в клеточных линиях меланомы с мутантным RAS меланоцитные гормоны, такие как α -MSH, не могут долго активировать cAMP-путь.

Такое снижение активности можно преодолеть, когда ингибирована активность PDE, особенно семейства PDE4. Важным следствием становится вывод о том, что ингибирование cAMP-пути необходимо для пролиферации клеток с мутантным RAS. Так, реактивация cAMP-пути с использованием ингибитора PDE4 ролипрама в комбинации с низкими дозами форсколина (активатора аденилатциклазы) вызывала заметное снижение пролиферации клеточных линий меланомы, но не меланоцитов, что связывают с индукцией апоптоза [37]. Это означает, что ферменты PDE4-семейства могут быть потенциальными терапевтическими мишенями для лечения меланомы с мутантным белком RAS. Это важно, поскольку такие меланомы не чувствительны ни к ингибиторам BRAF, ни к ингибиторам MEK.

NF- κ B и меланома. Транскрипционный фактор NF- κ B – важный молекулярный маркер метастатической меланомы, экспрессия которого повышена в трансформированных меланоцитах, что приводит к нарушению транскрипции регулируемых им генов-мишеней [38, 39]. Семейство NF- κ B представлено белками Rel A (p65), Rel B, C-Rel, NF- κ B1 (p50) и NF- κ B2 (p52), содержащими в N-терминальном конце Rel-гомологичный домен, который необходим для димеризации и связывания с ДНК. В неактивном состоянии белки p65, Rel B и C-Rel связаны с цитоплазматическим ингибитором I κ B,

они регулируются киназным комплексом IKK. Во время фосфорилирования и протеасомной деградации I κ B происходит фосфорилирование белка p65 большим количеством киназ и транслокация p65 в ядро. Эти посттрансляционные модификации генерируют активный комплекс NF- κ B, в основном это p65/p50 (52)-гетеродимеры, во многих типах клеток.

Среди функций NF- κ B отметим его провоспалительный ответ на инфекции, антиапоптотическую функцию, а также промоцию клеточного роста через усиление активности циклина D1 [40]. Для NF- κ B характерен плейотропный эффект: выполняя в клетке несколько важных функций, этот белок вовлечен в патогенез развития многих опухолей, включая меланому. В настоящее время транскрипционный фактор NF- κ B рассматривают также как важный фактор опухолевой прогрессии [39].

В меланоме большое число хемокинов (CXCL8 или IL-8), CXCL1 (MGSА), CCL5 и CCL2 (MCP1), которые в активированном состоянии усиливают прогрессию меланомы ауто- и паракринно. В частности, гиперэкспрессия IL-8 вызывает рост метастазов, она также связана с прогрессированием и вертикальным ростом поверхностнораспространяющейся меланомы. Показано, что антитела к IL-8 ингибировали рост сосудов опухоли и выявлено существенное снижение IL-8 в сыворотке крови пациентов, получавших химиотерапию.

Все это делает NF- κ B привлекательной мишенью для таргетной терапии. Поскольку этот белок регулируется фосфорилированием и ингибиторным белком I κ B, использование протеасомного ингибитора может представлять эффективный подход для лечения меланомы, в которой NF- κ B конститутивно активен. Такой ингибитор бортезомиб показал ингибирующий эффект на рост клеток меланомы *in vitro* и *in vivo* на мышах [41]. Начаты клинические испытания этого препарата на пациентах с меланомой [42].

Тем не менее существует мнение, что систематическое подавление NF- κ B может иметь катастрофические последствия: вызвать обратный эффект и токсичность. Описан вариант активации NF- κ B, когда клетки меланомы после лечения приобретают сценесцентный секреторный фенотип. По последним данным, провоспалительный и прометастатический фенотип характеризуется продукцией CCL2. При этом активированы NF- κ B и PARP-1, что и может быть причиной терапевтической неудачи [43].

Соматические мутации и меланома. С современных позиций канцерогенез меланоцитов развивается в несколько этапов. Предполагают, что в большинстве случаев на 1-м этапе происходит накопление соматических мутаций под действием УФ-облучения. Меланома кожи отличается повышенным уровнем мутаций по сравнению с другими солидными опухолями. Потеря функции белка p16^{INK4A} (2-й этап) может приводить к клеточному бессмертию. Дальнейший процесс трансформации может сопровождаться активацией теломерызы (3-й этап), приводящей к альтернативному удлинению теломеры. Наконец, на 4-м этапе происходит активация мутированных генов, что запускает нерегулируемую пролиферацию. При этом механизм регуляции апоптоза подавлен.

В спорадической меланоме выявлено большое количество соматических мутаций в генах различных сигнальных путей. Чаще всего это активирующие мутации в генах BRAF и NRAS, а также потеря функции супрессоров p16^{INK4}, p14^{INK4/ARF}, PTEN. В результате сложных взаимодействий между сигнальными молекулами ключевые онкогены, запускающие пролиферацию, остаются перманентно активными. Установлено, что генетические повреждения таких супрессоров, как p14^{INK4/ARF}, p16^{INK}, p53, PTEN, а также активирующие мутации в BRAF и NRAS могут привести к нерегулируемой активации транскрипционного фактора NF- κ B.

Для каждого подтипа меланомы характерен свой набор

генетических нарушений в каскадах передачи сигнала. Гиперактивация сигнального пути RAS-MAPK наблюдается в 90% меланомы кожи. Наиболее часто (соответственно в 50–70 и 15–30%) определяются точечные мутации в генах BRAF и NRAS, которые являются взаимоисключающими, и в 2–8% случаев меланомы кожи выявляются мутации KIT. Частота мутаций различается в меланоме на закрытых и открытых для постоянного УФ-облучения участках кожи [3, 33, 44].

Акральные и меланомы слизистых оболочек имеют большее число генетических изменений, чем меланомы кожи, независимо от инсоляции. Меланома слизистых оболочек имеет спектр генетических нарушений, сходный с акральной: в них повышена частота мутаций KIT и снижена частота мутаций BRAF и NRAS.

В увеальной меланоме распространены драйверные мутации GNA11, GNAQ, VAPB, EIF1AX и SF3B1 [45–48]. Мутации в генах мембранно-ассоциированных G-белков GNA11, GNAQ присутствуют в 85% увеальной меланомы, однако они выявлены также в 3–4% меланомы кожи и 9,5% меланомы слизистых оболочек.

Таргетная терапия меланомы. Меланома – чрезвычайно агрессивное заболевание с высокой устойчивостью к цитотоксическим агентам. Химиотерапевтические препараты остаются стандартом терапии метастатической и неоперабельной меланомы. Лечение метастатических форм и заболевания в III–IV стадии включает системную терапию препаратами дакарбазина и темодала, производными нитрозомочевины (ломустин, фотемустин), препаратами платины (цисплатин и карбоплатин), таксанами (паклитаксел) или их комбинациями. Высокодозная терапия IL-2 дает длительные полные ремиссии у небольшого числа пациентов с легочными метастазами, но применение этой терапии ограничено из-за высокой токсичности.

В последнее время значительные успехи в понимании молекулярных механизмов возникновения и развития меланомы стали основой для реального прогресса в лечении пациентов с метастатической меланомой. Улучшение результатов послеоперационного лечения стало возможно благодаря блокаде основных сигнальных путей, специфичных для меланомы, с использованием таргетных препаратов [49].

Таргетные препараты – это, как правило, антитела либо небольшие молекулы, способные ингибировать онкогены, которые обычно гиперэкспрессируются в злокачественной опухоли. На основании знаний компонентов сигнальных каскадов, задействованных в развитии меланомы, выделяют наиболее перспективные точки приложения терапевтических агентов. Это прежде всего тирозинкиназные рецепторы, а также участники RAS-MAPK- и PI3K-путей.

KIT как мишень. Белок KIT – трансмембранный тирозинкиназный рецептор (ТКР), играющий критическую роль в развитии, пролиферации, миграции, дифференцировке и выживании меланоцитов. Связываясь с фактором стволовых клеток, ТКР димеризуется, аутофосфорилируется и активирует нижестоящие сигнальные пути, включая MAPK, PI3K/AKT, JAK и STAT. Чаще всего наблюдается амплификация или мутации гена KIT.

Мутации в KIT найдены в 2% меланомы кожи, но существенно чаще – в меланоме слизистых оболочек (18–36%) и акральной (21–39%) [1]. Мутации чаще поражают 11, 13 или 17-й экзоны гена, кодирующего трансмембранный регуляторный домен рецептора, в 30% наблюдений это мутация p.L576P в 11-м экзоне. Этот онкоген служит мишенью для терапии тирозинкиназными ингибиторами, которые более 10 лет используются для лечения гастроинтестинальных стромальных опухолей с мутациями KIT (иматиниб, сунитиниб, nilotinib, десатиниб, маситиниб и др.). Во 2-й фазе клинических испытаний иматиниба для лечения пациентов с мела-

номой показана годовая общая выживаемость 51% пациентов с мутациями KIT [50]. Обнадуживающие результаты лечения этим препаратом меланомы слизистых оболочек получены более чем в 35% у пациентов с мутацией в 11-м или 13-м экзоне гена KIT [51]. Начаты клинические испытания других ингибиторов KIT, маситиниба и nilotinиба с ожиданием позитивного клинического ответа [52, 53].

RAS как мишень. Наиболее частые мутации в меланоме (15–20% случаев) – мутации в 61-м кодоне гена NRAS, реже – в 12, 13-м кодонах [1, 54]. Мутировавший RAS активирует MAPK- и PI3K/AKT-сигнальные пути, а экспрессия RAS может ингибировать супрессоры p16^{INK4A}, p53 и p14^{ARF}, что подтверждено экспериментами на мышах [55]. Однако попытки использовать фармакологические подходы ингибирования RAS не принесли желаемого эффекта [28]. Применение ингибиторов фарнезил- и геранилтрансфераз для подавления заякоривания RAS на мембране не увенчалось успехом, аналогичные результаты получены при клинических испытаниях пептидных ингибиторов RAS-белка [55].

RAF как мишень. Общепризнано, что белки семейства RAF – ключевые белки для таргетной терапии меланомы [56]. Это семейство состоит из белков ARAF, BRAF, CRAF (или RAF-1), которые являются серин-треонин киназами и нижестоящими эффекторами для RAS. Среди участников MAPK-каскада в меланоме наиболее часто мутирует BRAF: более 60% метастатических меланом экспрессируют конститутивно активный мутантный белок, при этом выявлено более 65 различных мутаций. Замена основания T1799A приводит к замене валина на глютаминовую кислоту (BRAF V600E), встречается почти в 90% случаев, а замена валина на лизин (BRAF V600K) – в 3–30% случаев [57]. Предполагают, что частота мутации BRAF V600E увеличивается с возрастом, она также чаще встречается у пациентов, находящихся в регионах с интенсивной солнечной радиацией. Реже встречается мутация V600R валин-аргинин (в 1–5% случаев).

В случае мутации V600E активность мутантного белка BRAF выше более чем в 10 раз по сравнению с белком дикого типа, он также 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 становится также торможение роста и старение клеток за счет увеличения активности ингибиторов циклинзависимых 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 [1, 58]. Наряду с активацией MAPK-каскада в патогенезе меланомы показана необходимость дополнительных генетических изменений, таких как потеря функции p16^{INK4A}, PTEN или активации AKT3-сигнального пути. Действительно, в 60% случаев для меланомы характерны потеря функции p16^{INK4A} и наличие активного белка V600E BRAF. Более того, 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: активирующую мутацию BRAF и потерю функции PTEN наблюдали у 20% пациентов с меланомой, т. е. нарушением MAPK- и PI3-сигнальных каскадов [59]. Считается, что сначала мутирует ген BRAF, затем повреждается PTEN/AKT-путь. Таким образом, для успешной таргетной терапии меланомы необхо-

димо воздействовать на оба пути. Эксперименты на мышах 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 метастатической меланомы, корреляции между статусом BRAF и стабильностью болезни не установлено.

Прорыв в лечении диссеминированной меланомы кожи состоялся в 2011 г., когда были зарегистрированы препараты ипилимумаб (MDX-010, MDX-101, рекомбинантные человеческие моноклональные IgG1 антитела к CTLA-4 лимфоцитам) и вемурафениб (зелбораф, PLX4032), селективный ингибитор BRAF с мутацией V600E.

Действие вемурафениба основано на аллостерическом ингибировании димеризации BRAF для фосфорилирования MEK1/2. Вемурафениб, 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 [60].

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, поскольку применение ингибиторов V600E BRAF может привести к неконтролируемой активации MEK1/2- и ERK1/2-пути в NRAS-мутантных клетках и даже в нормальных меланоцитах.

В 2013 г. зарегистрирован препарат дабрафениб, действие которого основано на ингибировании АТФ-связывающего сайта киназы BRAF [61]. Дабрафениб отличается высокой специфичностью в отношении меланомы с заменами V600E/K белка BRAF и меньшей токсичностью по сравнению с вемурафенибом. При лечении дабрафенибом снижена частота осложнений в виде плоскоклеточного рака кожи и кератоакантомы (14%) по сравнению с вемурафенибом (26%). Появление этих новообразований связывают с активацией MAPK-пути при подавлении RAF через активирующие мутации RAS. В настоящее время проходит испытания новый селективный ингибитор BRAF с мутацией в кодоне V600 энкорафениб (LGX818).

К сожалению, у 15% пациентов с мутацией BRAF V600E наблюдается первичная резистентность к терапии ингибиторами BRAF, которая может быть вызвана мутацией гена RAC1, потерей функции гена NF1, потерей функции PTEN, активацией рецепторной тирозинкиназы [62]. Устойчивость к ингибиторам BRAF может быть вызвана гиперэкспрессией протениназы COT (MAP3K8), которая служит активатором MAPK, но не затрагивает BRAF-сигналинг.

У некоторых пациентов наблюдается короткий ответ (менее 12 нед), практически у всех пациентов, ответивших на вемурафениб, через 6–7 мес появляется вторичная резистентность, которая связана с развитием сложной компенсаторной активацией многочисленных компонентов MAPK-пути [63]. Возможны образование новых меланом с диким типом BRAF, амплификация BRAF и его усиленная экспрессия,

альтернативный сплайсинг BRAF, образование мутантного гена BRAF с делецией 4–8 экзонов, который кодирует белок, утративший RAS-связывающий домен.

Ингибиторы BRAF вызывают парадоксальную активацию MEK, появляются мутации NRAS и MEK1/2, нарушается регуляция рецепторных тирозинкиназ PDGFR-β и IGFR и проводится передача сигнала через CRAF, что усиливает фосфорилирование ERK1/2 [62]. Вторичная резистентность также может быть вызвана активацией PI3K-AKT-mTOR-пути вследствие мутации AKT1/3, потери функции PTEN, мутации PI3K-регуляторных генов, активации рецепторных тирозинкиназ и др. [63].

Для пациентов, у которых мутация V600E BRAF не выявляется, лечение таргетными препаратами представляет особую проблему. Им предлагается другое лечение с использованием ингибиторов MAPK-каскада [64]. Однако единой стратегии для лечения меланомы с диким типом гена BRAF пока нет.

MEK как мишень. MEK-1 и MEK-2-специфические серинтреонины-киназы с 80% гомологии, они активированы в 30% опухолей человека. В цепи передачи сигнала MEK1/2 стоят ниже BRAF, и единственным субстратом для них оказываются ERK.

Созданы и одобрены к применению ингибиторы MEK траметиниб (2013) и селуметиниб (2015) [65], проходят испытания биниметиниб (MEK162) и кобиметиниб. Оказалось, что монотерапия ингибиторами MEK не столь эффективна при меланоме с мутацией BRAF V600E/K, хотя траметиниб ингибирует меланомы с мутациями BRAF L597R и K601E, нечувствительные к вемурафенибу. Надежды, возлагавшиеся на ингибирование MEK в меланоме с мутацией NRAS, не оправдались [54]. Для пациентов с увеальной меланомой получены положительные результаты при терапии ингибитором MEK селуметинибом в сравнении со стандартной химиотерапией (темозоломид) при мутациях в генах GNAQ и GNA11 [52].

На современном этапе лечение меланомы включает в себя как монотерапию, так и применение нескольких таргетных препаратов [44, 66]. Испытание комбинаций ингибиторов BRAF и MEK показало, что это направление чрезвычайно перспективно. При применении ингибиторов MEK в комбинации с ингибиторами BRAF, например траметиниб и дабрафениб [67, 68], кобиметиниб и вемурафениб [69, 70], улучшается общее выживание пациентов с мутациями V600E/K, уменьшается частота вторичных карциномы кожи (плоскоклеточный рак и кератоакантома) и снижается токсичность, т. е. улучшается переносимость лечения.

Несмотря на достигнутый прогресс в лечении меланомы с применением ингибиторов V600E BRAF и других компонентов MAPK-пути, продолжается активный поиск новых клеточных мишеней для таргетной терапии. Особые надежды связаны с комбинированным подходом, основанным на одновременном применении ингибиторов MAPK-сигнального пути в комбинации с ингибиторами других путей, таких как AKT3 в PI3K-сигнальном каскаде [71], а также регулятора клеточного цикла CDK4 [72].

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

Особый интерес вызывают исследования и испытания препаратов таргетной терапии в сочетании с иммунотерапией.

Иммунотерапия. Меланома – высокоиммуногенная опухоль, которая индуцирует иммунный ответ, опосредованный цитотоксическими Т-клетками. Эти клетки, или натуральные киллеры, представляют собой 1-ю линию защиты про-

тив 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 снижено содержание активирующих рецепторов, или они подвергаются клеточному истощению [73]. С другой стороны, в клетках меланомы снижена экспрессия основного комплекса гистосовместимости 1-го класса (МНС), поэтому они часто не распознаются CD-8 Т-клетками. В этом случае цитотоксические Т-клетки могут быть потенциальными кандидатами для иммунотерапии, если их «научить» распознавать клетки меланомы со сниженной экспрессией молекул класса МНС [74].

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 был одобрен препарат ипилимумаб, представляющий собой recombinantный человеческий иммуноглобулин IgG1 против цитотоксического белка Т4, ассоциированного с Т-лимфоцитами (CTLA-4), негативного регулятора Т-клеточной активации. Результатом действия этого препарата служит Т-клеточная активация. Показан существенный терапевтический эффект с повышением выживаемости больных меланомой, принимавших ипилимумаб. Средняя медиана выживаемости составляла 10 мес. Присоединение этого препарата в схему лечения совместно с дакарбазином существенно увеличило медиану выживаемости до 1, 2, 3 лет с момента постановки диагноза. Недавно появились новые моноклональные антитела к CTLA-4, такие как тремелимуа, а также антитела против PD1, пембролизумаб и ниволумаб, также известный как MDX1106, для лечения метастатической меланомы, одобренные в 2014 г. Эти препараты блокируют рецептор программируемой 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 к PD-1 и PD1-L1 способны стимулировать цитотоксическую активность иммунной системы и ингибировать рост опухоли.

В настоящее время наиболее перспективно комбинированное лечение, которое включает таргетную терапию, направленную главным образом на ингибирование MAPK-киназного пути с учетом мутаций в генах, кодирующих компоненты этого сигнального каскада, и иммунотерапию [75]. Благодаря использованию такого подхода удалось значительно увеличить выживаемость пациентов с метастатической меланомой [76]. Комбинация вемурафениба и ипилимумаба оказалась токсичной, более перспективными представляются комбинации ингибиторов BRAF или BRAF + MEK с антителами к PD-1 (пембролизумаб или ниволумаб) или антителами к PDL-1 (BMS-936559, MPDL3280A, MDX-1105).

МикроРНК. МикроРНК (miR) также рассматривают 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 [77]. МикроРНК могут также вносить вклад в эпигенетическую регуляцию экспрессии генов в меланоцитах. Так, R.C. Gasque Schoof и соавт. [78] показали взаимосвязь между экспрессией miR-203, miR-26 и amiR-29 и их некоторыми генами-мишенями, Dnmt3a, Dnmt3b, Mecp2, Ezh2, при клеточной трансформации. Результаты 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 экспрессии микроРНК позволили выявить 12 микроРНК, связанных с увеличением времени (более 4 лет) выживания [79]. Их них 5 микроРНК: miR-142-5p, miR-150-5p, miR-342-3p, miR-155-5p и miR-146b-5p перспективны для использования в клинике. Активно ведутся исследования, устанавливающие взаимосвязь между экспрессией микроРНК и маркерных генов меланомы. Так, недавно показано, что MiR-377 регулирует экспрессию транскрипционного фактора E2F3 и влияет на NF-kB-сигнальный путь, ингибируя MAP3K7 в меланоме [80].

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-kB. 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 доказательство причинной связи между мутациями BRAF и инактивацией TP53. Нокдаун miR-3151 ведет к каспаза-3-зависимому апоптозу. Таким образом, одновременное подавление мутантного активированного BRAF вемурафенибом и нокдаун MiR-3151 представляют новый терапевтический подход к лечению меланомы [81].

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 позволило применять таргетные препараты, многие из которых показали хороший терапевтический эффект. В настоящее время возлагают надежду на применение таких препаратов в комбинации друг с другом, а также на выявление новых молекулярных мишеней.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 14-35-00107).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п. 1, 3–43, 45–81 см. REFERENCES)

2. Мазуренко Н.Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи. *Успехи молекулярной онкологии*. 2014; (2): 26–35.
44. Мазуренко Н.Н. Генетическая гетерогенность меланомы кожи: новые мишени для селективного воздействия. *Злокачественные опухоли*. 2015; (4s2): 3–8.

REFERENCES

1. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica (Cairo)*. 2013; 2013: 635203.
2. Mazurenko N.N. Genetic features and markers of melanoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2014; (2): 26–35. (in Russian)
3. Curtin J.A., Busam K., Pinkel D., Bastian B.C. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24 (26): 4340–6.
4. Kong Y., Si L., Zhu Y., Xu X., Corless C.L., Flaherty K.T. et al. Large-scale analysis of KIT aberrations in Chinese patients with melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17 (7): 1684–91.
5. Read J., Wadt K.A., Hayward N.K. Melanoma genetics. *J. Med. Genet.* 2016; 53 (1): 1–14.

6. Aoude L.G., Wadt K.A., Pritchard A.L., Hayward N.K. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015; 28 (2): 148–60.
7. Puig-Butille J.A., Escámez M.J., Garcia-Garcia F., Tell-Marti G., Fabra À., Martínez-Santamaría L. et al. Capturing the biological impact of CDKN2A and MC1R genes as an early predisposing event in melanoma and non melanoma skin cancer. *Oncotarget.* 2014; 5 (6): 1439–51.
8. Young R.J., Waldeck K., Martin C., Foo J.H., Cameron D.P., Kirby L. et al. Loss of CDKN2A expression is a frequent event in primary invasive melanoma and correlates with sensitivity to the CDK4/6 inhibitor PD0332991 in melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27 (4): 590–600.
9. Paillerets B.B., Lesueur F., Bertolotto C. A germline oncogenic MITF mutation and tumor susceptibility. *Eur. J. Cell Biol.* 2014; 93 (1–2): 71–5.
10. Sekulic A., Haluska P.Jr., Miller A.J., Genebriera De Lamo J., Ejadi S., Pulido J.S. et al. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin. Proc.* 2008; 83 (7): 825–46.
11. Potrony M., Badenas C., Aguilera P., Puig-Butille J.A., Carrera C., Malvey J. et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann. Transl. Med.* 2015; 3 (15): 210.
12. Potrony M., Puig-Butille J.A., Aguilera P., Badenas C., Tell-Marti G., Carrera C. et al. Prevalence of MITF p.E318K in Patients With Melanoma Independent of the Presence of CDKN2A Causative Mutations. *JAMA Dermatol.* 2016; 152 (4): 405–12.
13. Kennedy C., ter Huurne J., Berkhout M., Gruis N., Bastiaens M., Bergman W. et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 117 (2): 294–300.
14. Sturm R.A., Duffy D.L., Box N.F., Chen W., Smit D.J., Brown D.L. et al. The role of melanocortin-1 receptor polymorphism in skin cancer risk phenotypes. *Pigment Cell Res.* 2003; 16 (3): 266–72.
15. Fargnoli M.C., Gandini S., Peris K., Maisonneuve P., Raimondi S. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer.* 2010; 46 (8): 1413–20.
16. Pogenberg V., Ogmundsdóttir M.H., Bergsteinsdóttir K., Schepsky A., Phung B., Deineko V. et al. Restricted leucine zipper dimerization and specificity of DNA recognition of the melanocyte master regulator MITF. *Genes Dev.* 2012; 26 (23): 2647–58.
17. Grill C., Bergsteinsdóttir K., Ogmundsdóttir M.H., Pogenberg V., Schepsky A., Wilmanns M. et al. MITF mutations associated with pigment deficiency syndromes and melanoma have different effects on protein function. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22 (21): 4357–67.
18. Vachtenheim J., Drdová B. A dominant negative mutant of microphthalmia transcription factor (MITF) lacking two transactivation domains suppresses transcription mediated by wild type MITF and a hyperactive MITF derivative. *Pigment Cell Res.* 2004; 17 (1): 43–50.
19. Wellbrock C., Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015; 28 (4): 390–406.
20. Testa J.R., Cheung M., Pei J., Below J.E., Tan Y., Sementino E. et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat. Genet.* 2011; 43 (10): 1022–5.
21. Carbone M., Ferris L.K., Baumann F., Napolitano A., Lum C.A., Flores E.G. et al. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 179.
22. Battaglia A. The Importance of Multidisciplinary Approach in Early Detection of BAP1 Tumor Predisposition Syndrome: Clinical Management and Risk Assessment. *Clin. Med. Insights Oncol.* 2014; 8: 37–47.
23. Wiesner T., Murali R., Fried I., Cerroni L., Busam K., Kutzner H. et al. A distinct subset of atypical Spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; 36 (6): 818–30.
24. Oliveira C., Lourenço G.J., Rinck-Junior J.A., Cintra M.L., Moraes A.M., Lima C.S. Association between genetic polymorphisms in apoptosis-related genes and risk of cutaneous melanoma in women and men. *J. Dermatol. Sci.* 2014; 74 (2): 135–41.
25. Thunell L.K., Bivik C., Wäster P., Fredrikson M., Stjernström A., Synnerstad I. et al. MDM2 SNP309 promoter polymorphism confers risk for hereditary melanoma. *Melanoma Res.* 2014; 24 (3): 190–7.
26. Marzuka-Alcalá A., Gabree M.J., Tsao H. Melanoma susceptibility genes and risk assessment. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1102: 381–93.
27. Regad T. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers (Basel).* 2015; 7 (3): 1758–84.
28. 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; 80 (5): 624–37.
29. Kunz M. Oncogenes in melanoma: An update. *Eur. J. Cell Biol.* 2014; 93 (1–2): 1–10.
30. Hutchinson K.E., Johnson D.B., Johnson A.S., Sanchez V., Kuba M., Lu P. et al. ERBB activation modulates sensitivity to MEK1/2 inhibition in a subset of driver-negative melanoma. *Oncotarget.* 2015; 6 (26): 22348–60.
31. Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell.* 2015; 161 (7): 1681–96.
32. Krauthammer M., Kong Y., Bacchiocchi A., Evans P., Pornputtpong 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.
33. Griewank K.G., Scolyer R.A., Thompson J.F., Flaherty K.T., Schandorf D., Murali R. Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014; 106 (2): djt435.
34. Dumaz N. Mechanism of RAF isoform switching induced by oncogenic RAS in melanoma. *Small GTPases.* 2011; 2 (5): 289–92.
35. Rodríguez C.I., Setaluri V. Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* 2014; 563: 22–7.
36. Kelleher F.C., McArthur G.A. Targeting NRAS in melanoma. *Cancer J.* 2012; 18 (2): 132–6.
37. Narita M., Murata T., Shimizu K., Nakagawa T., Sugiyama T., Inui M. et al. A role for cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 in regulation of the growth of human malignant melanoma cells. *Oncol. Rep.* 2007; 17 (5): 1133–9.
38. Dhawan P., Singh A.B., Ellis D.L., Richmond A. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor- κ B and tumor progression. *Cancer Res.* 2002; 62 (24): 7335–42.
39. Ueda Y., Richmond A. NF- κ B activation in melanoma. *Pigment Cell Res.* 2006; 19 (2): 112–24.
40. Madonna G., Ullman C.D., Gentilcore G., Palmieri G., Ascierto P.A. NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 53.
41. Amiri K.I., Horton L.W., LaFleur B.J., Sosman J.A., Richmond A. Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004; 64 (14): 4912–8.
42. Su Y., Amiri K.I., Horton L.W., Yu Y., Ayers G.D., Koehler E. et al. A phase I trial of bortezomib with temozolomide in patients with advanced melanoma: toxicities, antitumor effects, and modulation of therapeutic targets. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16 (1): 348–57.
43. Ohanna M., Giuliano S., Bonet C., Imbert V., Hofman V., Zangari J. et al. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev.* 2011; 25 (12): 1245–61.
44. Mazurenko N.N. Genetic heterogeneity of melanoma: a new target for the selective exposure. *Zlokachestvennye opukholy.* 2015; (4s2): 3–8. (in Russian)
45. Van Raamsdonk C.D., Bezrookove V., Green G., Bauer J., Gaugler L., O'Brien J.M. et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature.* 2009; 457 (7229): 599–602.
46. Harbour J.W., Onken M.D., Roberson E.D., Duan S., Cao L., Worley L.A. et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science.* 2010; 330 (6009): 1410–3.
47. 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; 45 (2): 133–5.

48. Martin M., Masshofer L., Temming P., Rahmann S., Metz C., Bornfeld N. et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nat. Genet.* 2013; 45: 933–6.
49. Puzanov I., Flaherty K.T. Targeted molecular therapy in melanoma. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 2010; 29 (3): 196–201.
50. 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.
51. Kim K.B., Alrwas A. Treatment of KIT-mutated metastatic mucosal melanoma. *Chin. Clin. Oncol.* 2014; 3 (3): 35.
52. Carvajal R.D., Lawrence D.P., Weber J.S., Gajewski T.F., Gonzalez R., Lutzky J. et al. Phase II Study of Nilotinib in Melanoma Harboring KIT Alterations Following Progression to Prior KIT Inhibition. *Clin. Cancer Res.* 2015; 21 (10): 2289–96.
53. Prosvicova J., Lukesova S., Kopecky J., Grim J., Papik Z., Kolarova R. et al. Rapid and clinically significant response to masitinib in the treatment of mucosal primary esophageal melanoma with somatic KIT exon 11 mutation involving brain metastases: A case report. *Biomed Pap Med Fac Univ. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub.* 2015; 159 (4): 695–7.
54. Johnson D.B., Puzanov I. Treatment of NRAS-mutant melanoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2015; 16 (4): 15.
55. Fedorenko I.V., Gibney G.T., Smalley K.S. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene.* 2013; 32 (25): 3009–18.
56. Furue M., Kadono T. Melanoma therapy: Check the checkpoints. *J. Dermatol.* 2016; 43 (2): 121–4.
57. 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; 11 (2): 92–6.
58. Poynter J.N., Elder J.T., Fullen D.R., Nair R.P., Soengas M.S., Johnson T.M. et al. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res.* 2006; 16 (4): 267–73.
59. 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; 126 (1): 154–60.
60. Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B., Ribas A., McArthur G.A., Sosman J.A. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363 (9): 809–19.
61. Hauschild A., Grob J.J., Demidov L.V., Jouary T., Gutzmer R., Millward M. et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012; 380 (9839): 358–65.
62. Van Allen E.M., Wagle N., Sucker A., Treacy D.J., Johannessen C.M., Goetz E.M. et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* 2014; 4 (1): 94–109.
63. Spagnolo F., Ghiorzo P., Orgiano L., Pastorino L., Picasso V., Tornari E. et al. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *Onco. Targets Ther.* 2015; 8: 157–68.
64. Johnpulle R.A., Johnson D.B., Sosman J.A. Molecular Targeted Therapy Approaches for BRAF Wild-Type Melanoma. *Curr. Oncol. Rep.* 2016; 18 (1): 6.
65. Thota R., Johnson D.B., Sosman J.A. Trametinib in the treatment of melanoma. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015; 15 (5): 735–47.
66. Eroglu Z., Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2016; 8 (1): 48–56.
67. Long G.V., Stroyakovskiy D., Gogas H., Levchenko E., de Braud F., Larkin J. et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371 (20): 1877–88.
68. Robert C., Karaszewska B., Schachter J., Rutkowski P., Mackiewicz A., Stroiakovski D. et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372 (1): 30–9.
69. Ribas A., Gonzalez R., Pavlick A., Hamid O., Gajewski T.F., Daud A. et al. Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAF (V600)-mutated melanoma: a phase 1b study. *Lancet Oncol.* 2014; 15 (9): 954–65.
70. Ascierto P.A., McArthur G.A., Dréno B., Atkinson V., Liskay G., Di Giacomo A.M. et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF (V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17 (9): 1248–60.
71. Tran K.A., Cheng M.Y., Mitra A., Ogawa H., Shi V.Y., Olney L.P. et al. MEK inhibitors and their potential in the treatment of advanced melanoma: the advantages of combination therapy. *Drug Des. Devel. Ther.* 2016; 10: 43–52.
72. Sheppard K.E., McArthur G.A. The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19 (19): 5320–8.
73. 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; 24: 295–304.
74. Tarazona R., Duran E., Solana R. Natural Killer Cell Recognition of Melanoma: New Clues for a More Effective Immunotherapy. *Front Immunol.* 2016; 6: 649.
75. 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; 8 (2): 63–75.
76. Zhu Z., Liu W., Gotlieb V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma-Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016; 99: 91–9.
77. Mirzaei H., Gholamin S., Shahidsales S., Sahebkar A., Jaafari M.R., Mirzaei H.R. et al. MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *Eur. J. Cancer.* 2016; 53: 25–32.
78. 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.
79. Jayawardana K., Schramm S.J., Tembe V., Mueller S., Thompson J.F., Scolyer R.A. et al. Identification, Review, and Systematic Cross-Validation of microRNA Prognostic Signatures in Metastatic Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2016; 136 (1): 245–54.
80. Zehavi L., Schayek H., Jacob-Hirsch J., Sidi Y., Leibowitz-Amit R., Avni D. MiR-377 targets E2F3 and alters the NF-kB signaling pathway through MAP3K7 in malignant melanoma. *Mol. Cancer.* 2015; 14: 68.
81. Lankenau M.A., Patel R., Liyanarachichi S., Maharry S.E., Hoag K.W., Duggan M. et al. MicroRNA-3151 inactivates TP 53 in BRAF-mutated human malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2015; 112 (49): E6744–51.

Поступила 01.09.16

Принята к печати 15.09.16