

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБНУ «РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

*Современные стратегии исследования
маркеров опухолевого роста
в клинической практике*

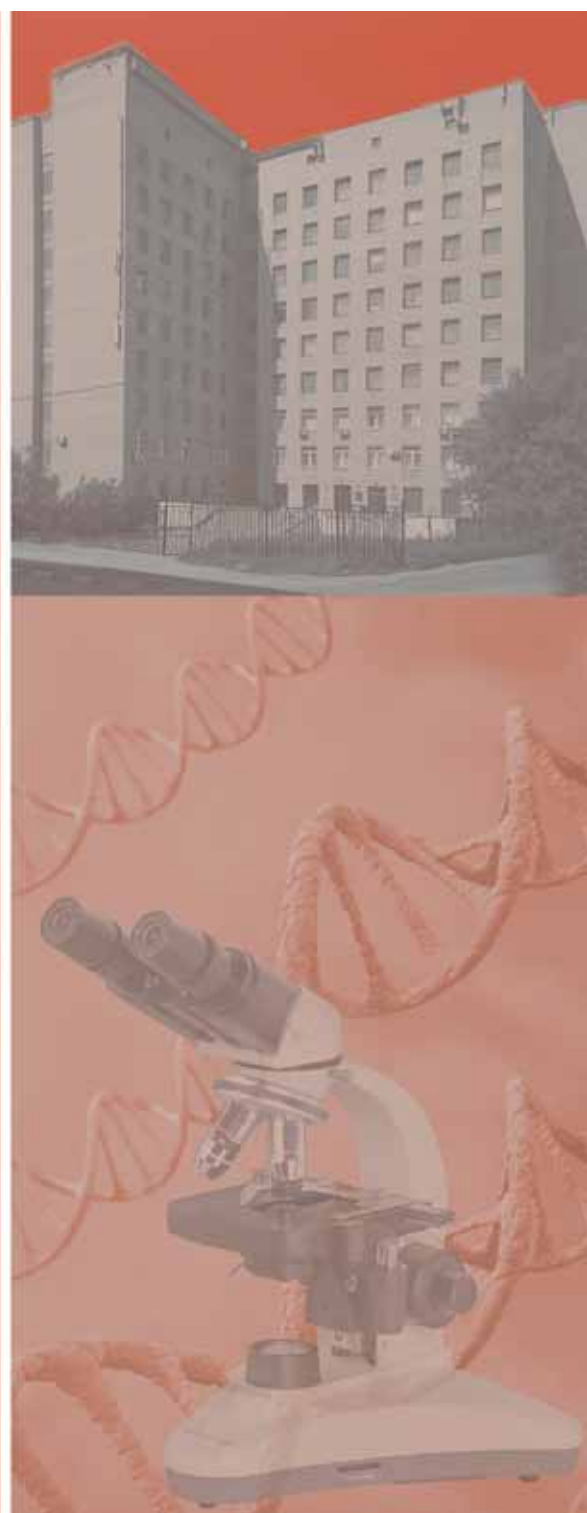
*Генетические особенности
и маркеры меланомы кожи*

*Молекулярные особенности
почечно-клеточного рака: ранняя
диагностика и перспективы терапии*

*Альтернативные убиквитин-
конъюгирующие ферменты E2
регулируют эндоцитоз рецептора
интерферона-1*

2

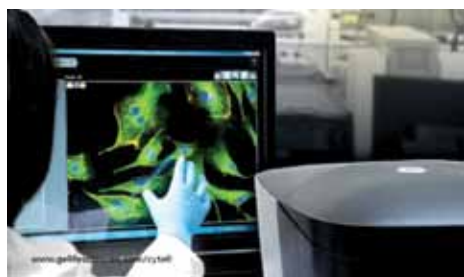
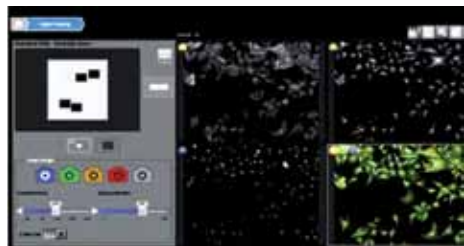
2 0 1 4



Cytell™ –

Цитофлуориметр,
микроскоп

и счетчик клеток в одной системе

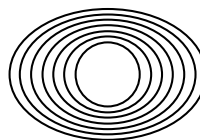


- ❖ Стандартные плашки от 6 до 384 лунок, слайды, чашки Петри (35, 60, 100 мм), матрасы (T-25, T-75)
- ❖ Источник освещения: твердотельный для флуоресценции, светодиодный для проходящего света
- ❖ Каналы флуоресценции (возбуждение/эмиссия):
 - Синий: 390/430 нм
 - Зеленый: 473/512.5 нм
 - Оранжевый: 544/588 нм
 - Красный: 631/702 нм
- ❖ 14-бит CCD-камера, 2.8 Мегапикс.
- ❖ Автоматическая смена объективов в 2-х позициях:
 - 10×/NA=0.45 - для высокого разрешения
 - 4×/NA=0.2 - широкопольный объектив
- ❖ Лазерная и контрастная автофокусировка
- ❖ Автоматизированный контроль движения платформы по X-Y-Z осям.
- ❖ Управляющая система: предустановленное на компьютере «тач скрин» (HP™ 8300, Windows 7, 64-бит) программное обеспечение BioApps (автоматизированное цифровое изображение, исследование клеточного цикла, жизнеспособности клеток, подсчет клеток, редактор карты плашки, системный «бэкап»), сохранение данных в формате.tiff, .jpg, .pdf, и .csv.
- ❖ Не требует инсталляции

Быстрый 4-стадийный анализ клеток:



УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Российский онкологический
научный центр им. Н.Н. Блохина»

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
www.ronc.ru

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

М.А. Красильников, *д-р биол. наук, проф.*

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

И.Б. Зборовская, *канд. биол. наук,*

М.Г. Якубовская, *д-р мед. наук*

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М.В. Гудкова, *канд. биол. наук (отв. секретарь) (Москва)*

Г.А. Белицкий, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Л.М. Берштейн, *д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург)*

В.К. Боженко, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Н.А. Глушанкова, *д-р биол. наук (Москва)*

В.Э. Гурцевич, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Е.Н. Имянитов, *д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург)*

Д.Б. Казанский, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

А.В. Карпукхин, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

Ф.Л. Киселев, *д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

И.Ю. Кубасова, *канд. мед. наук (Москва)*

Н.Е. Кушлинский, *д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

Н.Л. Лазаревич, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

А.В. Лихтенштейн, *д-р биол. наук (Москва)*

Н.Н. Мазуренко, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

Н.С. Сергеева, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

Е.В. Степанова, *д-р биол. наук (Москва)*

С.А. Тюляндин, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Е.М. Чевкина, *канд. биол. наук (Москва)*

Н.В. Чердынцева, *д-р биол. наук, проф. (Томск)*

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А.Ю. Барышников, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Ю.М. Васильев, *д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

А.В. Гудков, *д-р биол. наук, проф. (Баффало, США)*

М.И. Давыдов, *д-р мед. наук, проф., акад. РАН (Москва)*

Д.Г. Заридзе, *д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

Б.П. Копнин, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

EDITOR-IN-CHIEF

M.A. Krasil'nikov, *PhD, DSc, Professor*

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

I.B. Zborovskaya, *PhD*

M.G. Yakubovskaya, *PhD, DSc*

EDITORIAL BOARD

M.V. Gudkova, *PhD (Executive Editor) (Moscow)*

G.A. Belitsky, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

L.M. Berstein, *PhD, DSc, Professor (Saint Petersburg)*

V.K. Bojenko, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

N.A. Gloushankova, *PhD, DSc (Moscow)*

V.E. Gurtsevitch, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

E.N. Imyanitov, *PhD, DSc, Professor (Saint Petersburg)*

D.B. Kazansky, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

A.V. Karpukhin, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

F.L. Kissel'ov, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

I.Yu. Kubasova, *PhD (Moscow)*

N.E. Kushlinsky, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

N.L. Lazarevich, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

A.V. Lichtenstein, *PhD, DSc (Moscow)*

N.N. Mazurenko, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

N.S. Sergeeva, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

E.S. Stepanova, *PhD, DSc (Moscow)*

S.A. Tjulandin, *MD, PhD, DSc, Professor (Moscow)*

E.M. Tchekina, *PhD (Moscow)*

N.V. Tcherdyntseva, *PhD, DSc, Professor (Tomsk)*

EDITORIAL COMMITTEE

A.Yu. Baryshnikov, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

Yu.M. Vasiliev, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

A.V. Gudkov, *PhD, DSc, Professor (Buffalo, USA)*

M.I. Davydov, *MD, PhD, DSc, Academician of RAS, Professor (Moscow)*

D.G. Zaridze, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

B.P. Kopnin, *MD, PhD, DSc, Professor (Moscow)*

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

Учредители:
ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»,
ООО «ИД «АБВ-пресс»

Адрес редакции:
Москва, Каширское шоссе, д. 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза,
3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19

www.abvpress.ru
e-mail: abv@abvpress.ru

Статьи направлять по адресу:
e-mail: adv.mol.onc@ronc.ru

Заведующая редакцией В.Е. Ефремова
Корректор Е.А. Иванова

Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук
Служба подписки и распространения
И.В. Щургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Служба рекламы С.Р. Аракелян
+7 (499) 929-96-19, dir@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
ПИ № ФС 77-57560 от 08.04.2014 г.

При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.

Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.

В статьях представлена точка зрения
авторов, которая может не совпадать
с мнением редакции.

Успехи молекулярной
онкологии. 2014. № 2. 1—80

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2014

Отпечатано в типографии
ООО «Графика»

Тираж 1000 экз.

2'14

ОБЗОРЫ

И.Б. Зборовская

Современные стратегии исследования маркеров опухолевого роста в клинической практике 4

*Л.Н. Любченко, Е.И. Батенева, И.К. Воротников, С.М. Портной,
О.В. Крохина, В.А. Соболевский, Л.Г. Жукова, В.А. Хайленко, С.А. Тюлядин*

**Наследственный рак молочной железы: генетическая и клиническая
гетерогенность, молекулярная диагностика, хирургическая профилактика в группах риска. 16**

Н.Н. Мазуренко

Генетические особенности и маркеры меланомы кожи 26

О.В. Ковалева, О.Р. Назарова, В.Б. Матвеев, А.Н. Грачев

Молекулярные особенности почечно-клеточного рака: ранняя диагностика и перспективы терапии 36

В.А. Кобляков

Гипоксия и гликолиз как возможные объекты противоопухолевого воздействия 44

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Christopher J. Carbone, Hui Zheng, Serge Y. Fuchs

**Endocytosis of the IFNAR1 chain of Type 1 interferon receptor
is regulated by diverse E2 ubiquitin conjugation enzymes 50**

Christopher J. Carbone, Hui Zheng, Serge Y. Fuchs

**Альтернативные убиквитин-конъюгирующие ферменты E2
регулируют эндоцитоз рецептора интерферона-1 61**

НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

В.В. Честков, В.Ю. Табаков, Ю.В. Щепкина

Амниокар – пролиферативная среда для мезенхимальных клеток. 74

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ (ОБНОВЛЕННАЯ) 79

REVIEWS

*I.B. Zborovskaya***Modern strategies for study of tumor's markers in clinical practice 4***L.N. Lyubchenko, Ye.I. Bateneva, I.K. Vorotnikov, S.M. Portnoy, O.V. Krokhina,
V.A. Sobolevskiy, L.G. Zhukova, V.A. Khaylenko, S.A. Tyulyandin***Hereditary breast cancer: genetic and clinical heterogeneity, genetic testing, prophylactic surgery 16***N.N. Mazurenko***Genetic alterations and markers of melanoma 26***O.V. Kovaleva, O.R. Nazarova, V.B. Matveev, A.N. Gratchev***Molecular features of renal cell carcinoma: early diagnostics and perspectives for therapy 36***V.A. Koblyakov***Hypoxic state and glycolysis as a possible anticancer therapeutic target 44**

EXPERIMENTAL REPORTS

*Christopher J. Carbone, Hui Zheng, Serge Y. Fuchs***Endocytosis of the IFNAR1 chain of Type 1 interferon receptor
is regulated by diverse E2 ubiquitin conjugation enzymes 50***Christopher J. Carbone, Hui Zheng, Serge Y. Fuchs***Endocytosis of the IFNAR1 chain of Type 1 interferon receptor
is regulated by diverse E2 ubiquitin conjugation enzymes (In Russian) 61**

ADVERTISING PUBLICATION

*V.V. Chestkov, V.Yu. Tabakov, Yu.V. Shchepkina***Amniocar as a proliferative medium for mesenchymal cells 74****INFORMATION FOR AUTHORS (UPDATED) 79**

Современные стратегии исследования маркеров опухолевого роста в клинической практике

И.Б. Зборовская

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»,
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Борисовна Зборовская zborovskaya@mail.ru

В основе онкологических заболеваний и их прогрессии лежит каскадный процесс накопления генетических повреждений, затрагивающих не менее 20 генов, и поэтому важность молекулярно-генетических исследований для клинической онкологии не вызывает сомнений. Современные методы молекулярной биологии, позволяющие детерминировать структурные и функциональные изменения генов и их продуктов, которые могут служить специфическими маркерами опухолевого роста, открывают принципиально новые возможности в клинической онкологии. В обзоре рассматриваются пути совершенствования критериев для формирования диагностических тестов, оценки молекулярных факторов течения болезни и эффективности проводимых лечебных мероприятий. Для определения спектра маркеров особое внимание должно быть направлено на исследования путей передачи сигналов ключевых генов опухолевого роста и их ближайших партнеров. Одним из важных аспектов является корректное формирование групп пациентов и коллекций образцов. Подчеркивается необходимость объединения в рамках единых программ традиционных способов диагностики и лечения с современными методами молекулярно-генетического тестирования и биоинформатики.

Ключевые слова: онкомаркеры, сигнальные пути, герминальные мутации, аллельный полиморфизм, микроРНК, метилирование ДНК, полиаденилирование, сплайсинг, транскриптом, стволовые клетки опухоли

Modern strategies for study of tumor's markers in clinical practice

I.B. Zborovskaya

Scientific Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russia,
115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24;

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24

Importance of molecular genetics-based essays in clinical oncology is now unquestionable due to the fact that all oncological diseases and their progression are based on cascading accumulation of genetic aberrations involving more than 20 different genes. Essentially new capacities of clinical oncology are uncovered with the help of modern molecular biology methods that allow to determine structural and functional changes of genes and their products. This review examines approaches to improve criteria for creating diagnostic essays, evaluation of treatment efficiency and molecular factors of clinical course. In order to determine relevant markers, special consideration should be given to the research of signal transduction pathways involving key genes responsible for tumor growth and their partners. The correct formation of patient's groups and selection of samples is very important. It is emphasized that integrated clinical programs should combine traditional methods of diagnostics and treatment with modern molecular testing and bioinformatics methods.

Key words: oncomarkers, signaling pathways, germline mutations, allelic polymorphism, microRNA, DNA methylation, polyadenylation, splicing, transcriptome, tumor stem cells

Введение

Молекулярная биология находится сейчас на такой стадии развития, когда уже накоплен достаточный объем знаний о молекулярных изменениях, свойственных развитию и течению той или иной патологии. Сочетание исследований в области молекулярной онкобиологии с данными клинических реестров является необыкновенно продуктивным как в определении фундаментальных основ опухолевого роста, так и в плане диагностики и лечения опухолевых заболеваний. Молекулярная онкобиология активно интегрирует в практическую медицину. К 2014 г. только в PubMed зафиксировано более 40 тыс. публикаций, посвященных исследованию молекулярных онкомаркеров в клини-

ке, не считая огромного количества работ, проводимых на клеточных линиях и экспериментальных животных.

Еще несколько лет назад острой проблемой молекулярной онкологии являлась идентификация отдельных генетических факторов, ассоциированных с канцерогенезом. Современная наука требует исключительно комплексного подхода и анализа не только значения отдельных молекулярно-генетических нарушений, но, в первую очередь, механизмов изменений функционирования внутриклеточных сигнальных путей, вызванных тем или иным генетическим событием, а также анализа условий развития опухолевого очага на уровне целого организма. Кроме того, за по-

следние годы существенно возрос технологический уровень исследований, изменились методические подходы, что способствовало глобальному увеличению объема знаний о путях системной регуляции метаболических процессов как на клеточном уровне, так и в организме в целом. Современные геномные и протеомные технологии, применяемые или разрабатываемые, предоставляют возможность составления в самом ближайшем будущем так называемой индивидуальной «биопрописи» состояния здоровья и возможных заболеваний человека, в том числе и онкологических. Начинается век молекулярной медицины, и сейчас на повестку дня остро поставлен вопрос обобщения уже полученной информации. Поэтому назрела необходимость по-новому взглянуть на перспективы и тактику применения молекулярных маркеров в онкологической практике с учетом современных достижений молекулярной биологии.

Общие положения

Риск возникновения, гистогенез, темпы роста опухоли и прогрессия заболевания в немалой степени определяются структурными особенностями и/или абберациями клеточного генома. С возникновением и прогрессией опухоли могут быть связаны как детерминированные в геноме параметры (например, нормальный аллельный полиморфизм генов или герминальные мутации), так и изменения, появляющиеся *de novo* при злокачественной трансформации и развитии опухолевого процесса. К молекулярно-генетическим маркерам опухолевого роста и прогрессии следует отнести точечные мутации в кодирующих и регуляторных областях генов, амплификацию или утрату отдельных аллелей и генных локусов вследствие делеций и хромосомных перестроек, модуляцию экспрессии генов на уровне транскрипции и трансляции, изменение внутриклеточной локализации и модификации белковых молекул.

Малигнизация нормальных клеток является следствием каскадного накопления различных нарушений. Предполагается, что для развития рака у человека необходимы изменения не менее 6–10 генетических факторов [1, 2].

Вследствие генетической нестабильности любая группа трансформированных клеток представляет собой гетерогенную популяцию. Это дает возможность неконтролируемого отбора признаков, необходимых для формирования и закрепления опухоли в организме. Принято считать, что такими признаками являются приобретение способности к бесконечному делению, самодостаточность в ростовых факторах, нечувствительность к ингибиторам роста, уклонение от клеточной гибели, стимуляция ангиогенеза и метастазирование [2–5].

Генетическая нестабильность, являющаяся неотъемлемой чертой опухолевой прогрессии, обусловлена, в первую очередь, нарушениями в системе генов, кон-

тролирующих целостность генома, что резко увеличивает вероятность появления и накопления мутаций [6–9]. Большое значение придается исследованиям факторов эпигенетической регуляции (например, метилирование CpG-островков ДНК, модификация гистоновых комплексов, альтернативное полиаденилирование и альтернативный сплайсинг), определяющих состав транскриптома [6, 9–14]. Значительный вклад в малигнизацию клетки вносят повреждения генов, участвующих в процессах регуляции клеточного роста и дифференцировки, которые часто являются онкогенами и генами-супрессорами опухолевого роста (антионкогенами), в частности факторов роста, их рецепторов, гуанозинтрифосфатаз и т. д. [15]. Совместное функционирование генов, кодирующих нормальные регуляторы клеточного цикла и определяющих скорость клеточного деления, а также про- и антиапоптотические факторы, оказывает значительное влияние на баланс процессов пролиферации и гибели опухолевых клеток, а следовательно, рост опухолевых клонов. Кроме того, существует большая группа генов-модуляторов, напрямую не отвечающих за злокачественную трансформацию клеток, но способствующих распространению опухоли в организме [3, 16]. К ним относятся гены иммунного ответа, цитокины, гены, контролирующие функционирование протеолитических ферментов, везикулярный транспорт, неоангиогенез и т. п. Очень важно учитывать участие транскрипционных факторов в определении злокачественного потенциала клеток [2, 4, 13, 17]. Роль их на различных стадиях опухолевой прогрессии до сих пор остается несколько в тени.

Все генетические, эпигенетические и регуляторные нарушения трансформирующих генов реализуются на уровне изменения их экспрессии, т. е. уровня белковой продукции. Структурные модификации белков (фосфорилирование, пальмитилирование, миристилирование, сумоилирование, убиквитинирование и т. п.) и изменение их внутриклеточной локализации также изменяют их экспрессию и сигналинг, что имеет различные аспекты влияния на клеточный метаболизм [18–20]. Важное значение имеют и модуляции состава и структуры клеточных мембран, влияющие на функционирование многих процессов, в том числе и на сигнальную трансдукцию [21–23].

С открытием новых методик исследования генов, белков и тканей, полной расшифровкой генетического кода человека и интенсивным изучением сигнальных путей достигнут большой прогресс в определении особенностей функционирования генов и их продуктов в различных типах опухолей. Одним из многообещающих подходов являются исследования нового класса регуляторных молекул генной транскрипции — микроРНК [5, 24–27], а также изучение так называемых стволовых клеток опухолей (СКО) [27–30]. В настоящее время эти достижения являются в основном прерогативой экспериментальных лабораторий, и пу-

ти их внедрения в клиническую практику находятся в стадии разработок [31–34]. Внимание же практической молекулярной онкологии пока сосредоточено на тех известных изменениях, детекция которых в качестве молекулярных онкомаркеров уже сейчас может служить характеристикой тех или иных клинических параметров в группах онкологических больных или у отдельных индивидуумов.

Практические аспекты исследования онкомаркеров в клинической практике

В исследованиях маркеров опухолевого роста существует два основных аспекта: фундаментальный и клинический.

Фундаментальный аспект. Определение молекулярных маркеров в биопсийных образцах, клеточных линиях и ксенографтах опухолей человека в первую очередь дает не только представление о функционировании метаболических систем конкретной опухоли и биологических особенностях определенного гистологического типа новообразования, но и общие знания о природе опухолевого роста. Кроме того, экспериментальные разработки служат платформой для создания новых и эффективных таргетных препаратов.

В данном обзоре мы более подробно остановимся на **клинических аспектах**.

Диагностический аспект. Хотя спектр как наследуемых, так и соматических изменений генов в случае каждой конкретной опухоли носит индивидуальный характер, тем не менее наблюдаются определенные закономерности генных модификаций, которые дают основания связать их с развитием или характером прогрессии той или иной патологии и выделить соответствующую группу диагностических онкомаркеров. Такие маркеры используются:

1) для формирования групп риска развития тех или иных опухолевых заболеваний как в семьях с отягощенной онкологической наследственностью, так и при спорадических формах;

2) в качестве тестов для досимптоматической диагностики;

3) при дифференциальной диагностике тех или иных гистологических форм.

К сожалению, очень небольшой список одиночных онкомаркеров может служить целям как первичной, так и дифференциальной диагностики. Очевидно, что молекулярная онкодиагностика требует комплексного подхода и выявления не единичных генетических и/или метаболических молекулярных нарушений, а использования панелей тестов как для определенной совокупности опухолей, объединенных по этиологическим или гистологическим критериям, так и для каждого типа неоплазии. Следует отметить, что многие маркеры предрасположенности к возникновению спорадических солидных опухолей, хотя и являются потенциально полезными инструментами скрининга, пока не получили широкого распространения. Исклю-

чение составляют полиморфизмы и герминальные мутации, исследования которых интенсивно развиваются и имеют широкий выход в практику (медико-генетическое консультирование в отдельных популяциях, семьях с отягощенной наследственностью и группах людей, подвергнутых действию канцерогенных факторов) [35–37].

Прогностический аспект. Определение маркеров опухолевой прогрессии проводится:

1) с целью выявления метастазов и рецидивов первичного очага;

2) для прогнозирования течения опухолевого процесса (скорости прогрессирования заболевания и уровня выживаемости больных);

3) при мониторинге возможности и сроков появления очагов вторичного роста.

Вероятно, что способность метастазировать может быть приобретена отдельными клонами опухолевых клеток уже на ранних стадиях канцерогенеза, в то время как активная реализация этой способности осуществляется в ходе опухолевой прогрессии [3, 5, 38–40]. При проведении сравнительного анализа мутационного статуса и/или генной экспрессии с целью выявления маркеров, ассоциированных с метастазированием, необходимо учитывать как морфологическую, так и генетическую гетерогенность не только популяции опухолевых клеток, но и микроокружения опухоли, стволовых клеток, а также системную реакцию организма (изменение гормонального статуса, иммунологические маркеры и т.д.) [3–5, 16, 28, 40–42].

Существуют предпосылки использования данной группы онкомаркеров и для корректного стадирования онкозаболевания.

Предсказательный (предиктивный) аспект. В англоязычной литературе при обозначении онкомаркера, предсказывающего ответ на проводимую химиотерапию, широко используется устоявшийся термин predictive marker. Такие маркеры применяются:

1) при определении эффективности и коррекции проводимых лечебных мероприятий, в частности воздействия химиотерапевтических агентов и таргетных препаратов;

2) для изучения механизма действия отдельных химиопрепаратов и их комбинаций;

3) в разработке новых подходов к лечению онкологических больных методами гено- и сигналотерапии.

Исследования данного класса маркеров — наиболее интенсивно развивающееся направление. При составлении прогноза для назначения противоопухолевого лечения строго необходимо формирование кластерных диагностикумов, как при определенном типе онкозаболевания, так и при применении конкретного противоопухолевого препарата. Кроме того, наряду с прогностическими и диагностическими, данные маркеры являются инструментом для индивидуализации лечения. Применение химиотерапевтиче-

ских препаратов, как классических, так и таргетных, способно кардинально изменять спектр, экспрессию, внутриклеточную локализацию, активность и, следовательно, функционирование целого ряда белков и ассоциированных с ними сигнальных путей. Таким образом, с помощью определения индивидуального спектра предиктивных маркеров для каждого больного становится возможен мониторинг эффективности проводимой терапии.

Более детально использование прогностических и предиктивных панелей будет рассмотрено в соответствующих главах данного обзора. Следует отметить, что их спектры часто пересекаются, т. е. многие прогностические маркеры могут служить и предиктивными.

Тактика молекулярного тестирования

Используемые биопсийные материалы и требования к составлению выборки пациентов и коллекций образцов.

Как для выявления значения того или иного молекулярного нарушения или изменений функционирования группы генов и их продуктов на различных этапах канцерогенеза, так и при оценке влияния наличия молекулярных маркеров на отдаленные показатели результатов хирургического лечения (общую или безрецидивную выживаемость) крайне важно корректно формировать группы больных, обязательно учитывая следующее:

- 1) морфологические параметры исследуемой опухоли, в первую очередь гистологический тип новообразования, а также уровень дифференцировки и анаплазии клеток, тонкую структуру опухолевого образца (наличие стромальных элементов, участков другой гистологической структуры, степень васкуляризации, некротические изменения и т. д.);
- 2) клинически равную стадию развития процесса (глубину местной инвазии, наличие метастазов);
- 3) равнозначные параметры радикальности оперативного вмешательства;
- 4) проведенное до- и послеоперационное специальное противоопухолевое лечение.

Следует принимать во внимание также семейный онкологический анамнез, влияние внешних канцерогенных факторов (например, экспозиция родона, асбеста, курение, повышенная инсоляция и т. п.), хронические и сопутствующие заболевания другого профиля и применяемую при них терапию (в частности, иммуностимуляторы, антиоксиданты, витамины, препараты, содержащие никотин, и т. д.) [43]. Такие параметры, как пол, возраст и этническая принадлежность, также существенны, однако имеют большее значение для онкопатологий, связанных с наличием полиморфизмов, при определении риска в онкопораженных семьях и при гормонально-зависимых типах новообразований (рак молочной железы, яичников, щитовидной железы, простаты и т. п.) [36, 37, 44]. Возраст пациентов нужно учитывать и при формировании па-

нелей прогностических маркеров. В последние годы все большее внимание уделяется и особенностям питания. **Чем более однородными будут группы пациентов, тем выше шансы повысить специфичность тестирования.**

В зависимости от целей исследования молекулярно-генетическое тестирование может проводиться в тканевых и биопсийных образцах опухолевых и предопухолевых очагов, цельных биологических жидкостях и их фракциях (цельная кровь, лимфоциты, плазма, сыворотка, слюна, моча, панкреатический и желудочный сок), мокроте, пробах каловых масс.

Анализ молекулярного профиля нескольких тканевых и жидкостных образцов, полученных одновременно или последовательно от одного больного, расширяет возможности адекватной оценки клинических показателей.

Возможность параллельного взятия нескольких биопсий из одного патологического очага позволяет провести сравнительный анализ нарушений структуры и/или функционирования генома в различных участках малигнизированной ткани, как микроскопически однородных, так и морфологически различающихся. Кроме того, этот подход дает вероятность обнаружить такие нарушения только в одном из фрагментов анализируемой опухоли, что может оказать влияние при прогнозировании течения заболевания и результатов лечения [15, 45, 46].

В образцах, предназначенных для получения ДНК, РНК и белковых лизатов, должно содержаться не менее 60 % опухолевых клеток. Возвращаясь к морфологической структуре, необходимо еще раз подчеркнуть, что и опухолевые клетки, полученные от пациента, представляют собой, вследствие генетической нестабильности, гетерогенную популяцию. Все чаще анализ нарушений в биопсийном или операционном материале проводится с применением микродиссекции, обеспечивающей получение образца опухолевых клеток, свободных от элементов стромы, лимфоцитов или прилегающего нормального эпителия. Микродиссекцию возможно проводить в цитологических мазках и клетках, получаемых из кровяного русла [15, 47, 48].

Вопрос выбора нормальных аналогов (контролей) для исследования некоторых типов опухолей (например, рак яичников, саркомы) иногда затруднен. При взятии образца в качестве нормы необходимо строго следовать данным о гистогенезе первичного очага. Решение вопроса нормальных аналогов для исследования некоторых типов опухолей (например, саркомы, меланомы) должно учитывать также их локализацию. Очевидно, что при анализе опухолей, имеющих одну локализацию, но разную гистологическую форму, наборы диагностических и/или прогностических молекулярных маркеров отличаются, а химио- и генотерапия может иметь различные мишени для воздействия. Следует избегать использования в качестве нормальных контролей аутопсийных образцов.

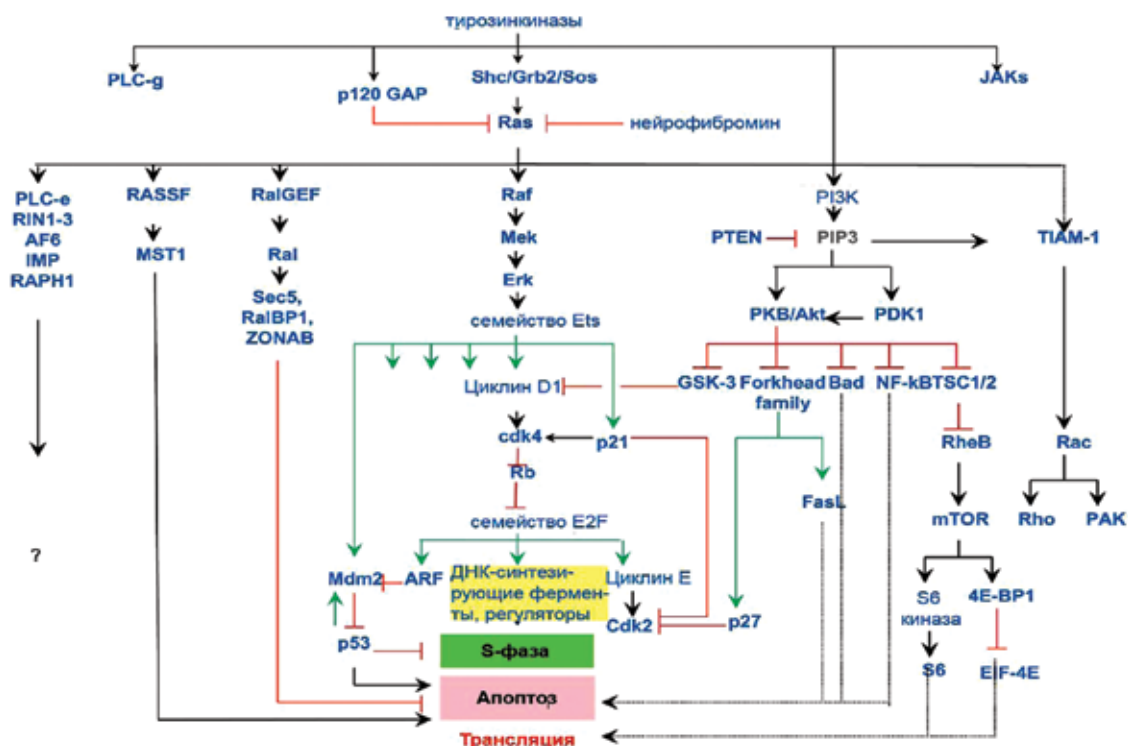
Во-вторых, взятие биологических жидкостей необходимо согласовать с сотрудниками клинических подразделений. Так, например, нельзя брать образцы крови для молекулярно-биологического исследования при гемотрансфузии и у прооперированных больных ранее 5 дней после вмешательства, так как в условиях возможности стресса и развития осложнений, а также применения послеоперационной лекарственной терапии (антибиотиков и т. п.) спектр маркеров может изменяться. При мониторинге эффективности лечения забор крови и биопсийного материала следует строго конкретизировать по срокам.

В-третьих, некоторые маркеры имеют значение при анализе образцов опухоли, находящейся на определенной стадии развития. Например, суперэкспрессия HRAS наблюдается, как правило, только на ранних

этапах малигнизации, и тестирование ее в образцах опухолей при запущенных стадиях не будет иметь принципиального значения [47].

Кроме того, должны развиваться стратегии ускорения тестирования биомолекулярных маркеров. Это касается всех этапов наблюдения — от постановки первичного диагноза до использования молекулярного мониторинга при химиотерапевтическом лечении запущенных стадий. Автоматизация и минимизация молекулярно-биологических процедур, техническое упрощение методик сильно продвинул раннюю детекцию и будут способствовать более широкому их внедрению в клиническую практику.

Определение необходимого комплекса молекулярных нарушений. Существует множество различных маркеров, определяющих малигнизацию и опухолевую прогрессию, но клиническое значение каждого отдельного теста, как правило, невелико [35]. Однако целый ряд участников ключевых сигнальных путей (p53, EGFR, RAS-семейство, c-MYC, mTOR, AKT, Wnt, β -катенин, Notch и др.) демонстрируют достоверную значимость генетических и функциональных нарушений (мутации/делеции, гиперметилирование или изменение экспрессии) при прогрессии самых различных онкозаболеваний. Этот факт связан с тем, что эти гены являются ключевыми регуляторами внутриклеточных сигнальных путей [2]. В качестве примера хочется привести далеко не полную схему активируемых сигнальных путей и их регуляции для онкогенов семейства RAS (рисунок), демонстрирующую влияние единичных нарушений на функционирование всей сети. Реализация



Онкогены *RAS*: регуляция и активируемые сигнальные пути. Адаптировано из [49]

сигналов от mTOR или p53 представляется еще более сложной. Учитывая многообразие сигналов от ключевых белков, участвующих в канцерогенезе, и их влияние как на индукцию, так и на ингибирование процессов реализации трансформированного фенотипа, при применении их в качестве маркеров опухолевого роста обязательно следует принимать во внимание изменение экспрессии непосредственных и ближайших партнеров сигнальных путей таких генов [5, 20, 50, 51], а также возможности переключения на альтернативные пути реализации сигнала.

Одним из важнейших компонентов сигнальной трансдукции в любых клетках является плазматическая мембрана, состав и структура которой определяют очень многие опухоль-ассоциированные процессы. В частности, в специальных мембранных микродоменах — липидных рафтах, обогащенных холестерином, сфинголипидами и гликосфинголипидами, а также различными белками, сосредоточены практически все рецепторы, в частности рецепторы факторов роста, интегринов и металлопротеаз, которые также являются опухолеспецифичными маркерами [21, 52]. Эти микродомены стабилизированы специальными микродомен-образующими белками и участвуют практически во всех аспектах жизнедеятельности клетки [53]. На сегодняшний день известно несколько семейств таких белков — кавеолы, SPFH-семейство, тетраспанины, галектины, многие из которых уже используются как маркеры прогрессии опухолевых заболеваний [23, 54–56]. Кроме того, репертуар микродомен-образующих белков в мембранах экзосом определяет специфичность попадания их содержимого, в первую очередь сигнальных белков и опухоль-ассоциированных микроРНК, в клетки тканей-мишеней, в том числе в районах формирования метастатических «ниш» [34, 57, 58]. Объем данного обзора не позволяет рассмотреть роль экзосом и микроРНК в канцерогенезе, однако изменения их спектра в опухолях и циркулирующих жидкостях уже сейчас служат важными диагностическими и прогностическими показателями [31–34, 59, 60].

Известно, что именно особенности реализации сигналов ответственны за пролиферацию и дифференцировку клеток, а нарушения и, как следствие, аномальные переключения на этапах сигнальной трансдукции приводят к возникновению различных типов опухолей. Так, в прогрессии колоректальных раков мутации (в широком смысле) PIK3CA/PTEN/AKT ветви проведения сигнала от EGFR менее важны, чем изменения пути RAS/RAF/MAPK [51].

По мере открытия все новые и новые маркеры могут быть включены в диагностические и прогностические панели. Это принципиально новый инструмент, позволяющий врачу уточнить диагноз, сроки метастазирования и рецидивирования для каждого конкретного пациента. Этой цели и должны служить четко рассчитанные комплексы молекулярных нарушений,

сочетание которых достоверно определяет прогноз и предоставляет возможность индивидуально подобрать противоопухолевую терапию.

Следовало бы определить некие рамки для клиницистов, поставленных в трудную ситуацию, когда из множества статей, посвященных исследованию молекулярно-биологических маркеров, нужно вычленить тот спектр, который имеет действительное значение для диагностики, определения прогноза конкретной группы онкологических больных и тактики лечения и дальнейшего мониторинга каждого пациента. Так, например, при болезни Барретта и раке пищевода исследовано более 60 маркеров, но только несколько из них прошли III и IV стадии клинических испытаний, действительно представляющих интерес для онкологических клиницистов [61], и ни один из этих маркеров, кроме широко известных, до сих пор не предложен для внедрения в повседневную клиническую практику.

Решением данной проблемы послужит идентификация достаточно информативного, но по возможности минимального спектра маркеров. В такие комплексы могут и должны входить тесты на различные типы изменений — от мутаций до белковых модификаций как непосредственно в опухолевой ткани, так и в организме носителя опухоли. Для стратификации пациентов на группы риска быстрого прогрессирования злокачественного процесса также необходимо использовать панели, причем, исходя из собственного многолетнего опыта, в эти панели должны входить от 5 до 15 маркеров, в зависимости от показателей их значимости. При определении сроков и уровня метастазирования у конкретного больного спектр маркеров может быть расширен или сужен исходя из первичного тестирования в панели маркеров риска быстрой прогрессии.

Очевидно, что в данном обзоре невозможно представить рекомендации по композиционному составу диагностикумов даже для одной из нозологических единиц, хотя такие работы в последнее время проводятся крайне интенсивно. В следующих двух главах приводятся примеры формирования достаточно ограниченных по составу, но специфичных и достоверно повторяющихся наборов маркеров.

Примеры использования онкомаркеров в прогнозировании течения злокачественного процесса и определении тактики противоопухолевой терапии

Одним из самых прогностически неблагоприятных онкозаболеваний является немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), но использование только клинических и морфологических критериев не позволяет прогнозировать его течение после радикального хирургического лечения с достаточной точностью. Сегодня уже практически сформировано несколько вариантов панелей биомаркеров, на основании которых возможно в той или иной степени предсказать исход болезни [1, 62, 63].

В сентябре 2014 г. опубликовано масштабное исследование сотрудников NCI/NIH, определивших риск быстрого прогрессирования у 1069 радикально прооперированных больных аденокарциномой легкого I стадии в 12 когортах, представляющих различные этнические популяции. Отбор проводился на основании изменений экспрессии 4 генов — *BRCA1*, *HIF1A*, *DLC1* и *XPO1* — в опухолевых образцах. Для 10 из 12 когорт получены результаты, позволяющие стратифицировать группы высокого и низкого риска рецидивирования у пациентов с IA и IB стадиями заболевания. Данный пример демонстрирует, что высокодостоверный прогноз может быть определен при исследовании достаточно ограниченной, но тщательно подобранной панели маркеров [64].

В России также разработаны подходы к выработке алгоритма определения индивидуального прогноза больных НМРЛ после радикального лечения. Впервые проведено сравнение аденогенного и плоскоклеточного рака легкого по спектру 18 факторов, характеризующих клиническое течение онкологического процесса и биологические свойства опухолевого очага более чем у 200 больных. Впервые после комплексного исследования единого, строго стратифицированного по группам клинического материала был проведен многофакторный анализ для оценки весовой значимости каждого из изученных клинических, морфологических и молекулярно-биологических факторов в зависимости от распространенности опухолевого процесса. При регрессионно-факторном анализе в группах пациентов с различными клинико-морфологическими характеристиками, как то: гистологическая структура опухоли (плоскоклеточный рак и аденокарциномы легкого), наличие или отсутствие метастазов во внутригрудные лимфатические узлы (N0 и N+) выявлены значимые различия в молекулярно-биологических характеристиках опухолевого процесса. На основе полученных данных с высокой точностью можно разделить пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом течения заболевания и даже определить сроки безрецидивного периода для каждого, используя 5 маркеров различной природы (анеуплоидия опухоли, иммуногистохимическая экспрессия мутантного p53, BAX, BCL-2 и VEGF, делеции локуса 1p36.2). Полученные данные указывают на необходимость использования этих характеристик в комплексной оценке выживаемости больных НМРЛ после радикального хирургического лечения с учетом особенностей каждой группы и позволяют вплотную приблизиться к индивидуальному прогнозированию течения НМРЛ [65].

Тактика химиотерапевтического лечения может определяться разным спектром молекулярных маркеров и, как следствие, набором препаратов, учитывающих характер генетических повреждений и модифицирующих действие традиционных цитостатиков.

Пример правильного выбора комплекса маркеров для определения стратегии таргетной генотерапии ра-

ка легкого с использованием гефитиниба — ингибитора EGFR — продемонстрирован в совместном исследовании сотрудников Университета Онкологического центра и Центра изучения здоровья в Колорадо [66, 67]. Взаимодействующий с EGFR E-кадгерин, экспрессия которого во многом определяет прогноз при НМРЛ, ингибируется ZEB1 (zinc finger transcriptional repressor 1) при участии гистон-деацетилазы HDAC. После серии экспериментов по повышению чувствительности клеточных линий рака легкого к воздействию ингибиторов тирозинкиназ при добавлении ингибиторов HDAC (MS-275) авторы добились заметных успехов в преодолении резистентности к гефитинибу в группе больных НМРЛ при дополнительном лечении данных пациентов ингибиторами HDAC.

В практике передовых специализированных лечебных учреждений РФ для назначения адекватных противоопухолевых препаратов уже широко используется определение мутационных спектров ДНК опухолевых клеток и других маркеров. Лидерами подобных исследований являются сотрудники ФГБУ НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) под руководством д.м.н., проф. Е.Н. Имянитова [35, 68–72] и ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» в содружестве с другими институтами и клиниками Москвы [65, 73–77]. В зарубежных клиниках онкологического профиля такие исследования стали повседневными и обязательными.

Сопряженные фундаментальные и клинические исследования онкомаркеров позволяют по-новому взглянуть на инновации в лечении онкологических больных.

В 2010 г. в самом авторитетном периодическом издании опубликован обзор, посвященный молекулярным механизмам действия препаратов ретиноевой кислоты и триоксида мышьяка (As_2O_3) при лечении больных острым промиелоцитарным лейкозом (ОПЛ) [78]. Позитивное действие As_2O_3 на клеточную дифференцировку незрелых миелоцитов при лечении ОПЛ заключается в деградации аномального комплекса PML–RAR α , что опосредованно снижает репрессию транскрипции генов-мишеней. Предлагаемая авторами схема действия ретиноевой кислоты объясняет и отсутствие ответа на терапию ATRA при редкой форме транслокации, при которой образуется слитный протоонкоген PLZF–RAR α . Следует отметить, что антрациклины, используемые при лечении ОПЛ, также усиливают продукцию ROS. Авторы предполагают, что терапия, опосредованная применением препаратов, прицельно приводящих к деградации белков, является перспективным направлением в стратегии лечения многих типов злокачественных новообразований, вызываемых наличием патогенных слитных онкобелков или повышенной продукцией транскрипционных факторов.

Остается открытым очень важный вопрос о правомерности объяснений процессов клеточной дифференцировки результатами, полученными на клеточных линиях и ксенографтах опухолей человека у бестимус-

ных животных. Однако в данном случае выводы строго согласуются с клиническими наблюдениями и, безусловно, заслуживают самого пристального внимания гематологов. Высокая цена As_2O_3 , конечно же, может лимитировать применение данной схемы лечения, хотя данная проблема вполне разрешима.

Противоопухолевая терапия должна опираться не только на стохастическую, но, в первую очередь, на иерархическую модель строения опухоли, а именно учитывать состояние СКО. Первые сведения о существовании стволовых клеток в солидных опухолях появились в 2003 г., но уже к 2008 г. были открыты и протестированы рецепторы СКО: мембранный гликопротеид Pgp1 (CD44), мембранный гликопротеид промиелин (CD133), альдегиддегидрогеназа 1 (ALDH1) и др. [28, 47, 79, 80]. Показано, что CD133+ клетки аденокарцином легкого устойчивы к действию цисплатина [81], а ALDH1+ клетки — к действию паклитаксела и таксола [82]. Повышенная экспрессия ALDH1 является предиктивным маркером хеморезистентности и в случае других онкозаболеваний, в частности при неoadъювантной терапии рака молочной железы [83].

В последнее время крайне интенсивно развивается использование малых интерферирующих РНК (siRNA) [84] и микроРНК в терапии различных патологий, что стало возможным благодаря уже доказанной диагностической и прогностической значимости ряда онко- или антионкомиров [26, 27, 32]. Примером микроРНК-терапии, достигшей стадии клинических испытаний, является препарат MRX34 (синтетический аналог miR-34 в липосомном векторе). Онкосупрессорное действие miR-34, ранее продемонстрированное на мышинной модели гепатоцеллюлярной карциномы, обусловлено тем, что мишенями для нее является целый ряд важных онкогенов, включая *MYC*, *MET*, *BCL2*, *CDK4* и др. [85]. В проводимом в настоящий момент исследовании I фазы (NCT01829971) участвуют пациенты с нерезектабельным первичным раком печени, а также другими опухолями с диагностированными печеночными метастазами.

Прочие микроРНК-агенты, в том числе и ингибиторы miR-21, экспрессия которой ассоциирована с высокой агрессивностью многих типов раков [86], пока находятся на стадии доклинических и первых фаз клинических исследований. Особого внимания заслуживают микроРНК, регулирующие функционирование СКО [27, 29, 34]. К настоящему времени в одобренную клиническую практику в России еще не введены препараты, основанные на микроРНК или взаимодействии с микроРНК, однако появления подобных средств можно ожидать в ближайшем будущем.

Методологические подходы в определении тех или иных генетических нарушений и их развитие

Высокотехнологичные методы кардинально меняют тактику не только фундаментальных, но и приклад-

ных молекулярных исследований. Однако в настоящее время в клинической практике применяются уже рекомендовавшие себя методики: иммуногистохимия, иммуноцитохимия, диагностика методом полимеразной цепной реакции, проточная спектрофотометрия и т.д. Отдельные крупные клиники в России для определения мутационного статуса все шире используют секвенирование по Сэнгеру, биочипы и масс-спектроскопию [74, 75, 87].

Для демонстрации гиперэкспрессии или потери функции и молчания генов на уровне продукции белков в клинике используются различные методы, в первую очередь иммуногистохимия на биопсийных или цитологических препаратах и ELISA. Белковая экспрессия некоторых генов в тканях, определяемая с помощью масс-спектропии и вестерн-блоттинга, должна подтверждаться с применением иммуногистохимических процедур. Вестерн-блоттинг также необходим для анализа модифицированных форм белка. Альтернативой иммуногистохимии является использование молекулярных «маяков» — строго специфических последовательностей с флуоресцентными довесками, позволяющими детектировать клетки, содержащие мутантные или неэкспрессируемые в норме гены и белки, как в тканях, так и в биологических жидкостях (FISH-диагностика, иммуноферментный анализ и т.п.) [76, 88].

Инновационные методы молекулярно-биологических исследований и широкое внедрение биоинформатических программ определяют новые направления молекулярного скрининга и тактику лечения онкологических больных. В настоящее время на первый план в онкомолекулярной диагностике при определении химиотерапевтической лечебной тактики или прогнозировании течения опухолевого процесса выходят микрочипирование и методы секвенирования нового поколения (NGS) [33]. Однако даже в самых современных и перспективных методах, посвященных сравнительному анализу экспрессии генов, существует ряд несовершенств. Следует отметить, что, применяя в целях сравнения различных опухолей или групп пациентов микрочипы, нужно пользоваться каким-либо одним источником их получения. Ввиду разного качества предлагаемых чипов (на рынке в настоящее время — 5–6 крупных компаний) сравнение одних и тех же образцов, даже с применением сходных панелей ДНК и РНК, дает иногда разночтение. Следует отметить, что в рамках одного исследования предпочтительно пользоваться одним источником получения антител или проводить уточняющий сравнительный анализ результатов, полученных с применением антител к одному белку, предлагаемых разными производителями.

Современный уровень развития молекулярной онкологии свидетельствует о несомненной важности изучения наличия изоформ мРНК, образующихся в результате мутаций, аномального полиаденилирова-

ния или альтернативного сплайсинга, и здесь на авансцену выходят методы масштабного глубокого секвенирования экзомов и транскриптомов [89]. В отличие от экспрессионных микрочипов, РНК-секвенирование позволяет получить точную количественную информацию о представленности различных транскриптов в пробе. Эти методы необходимы также при определении спектра микроРНК. Однако для практического внедрения необходимо получить достоверную качественную информацию о клинической значимости каждого сплайс-варианта или микроРНК и их сочетаний в зависимости от цели применения возможного маркера. Сложное программное обеспечение и отсутствие повторяющихся результатов сегодня лимитируют практическое использование этих экспериментальных разработок.

Основным недостатком микроРНК как биомаркеров является высокая вариабельность уровня их экспрессии в зависимости от целого ряда факторов. Наборы микроРНК-кандидатов, составленные в результате независимых исследований, могут очень сильно различаться между собой, что требует дополнительной валидации с расширением выборки, строгой нормализацией и статистической обработкой. К преимуществам микроРНК в качестве биомаркеров можно отнести универсальность детекции, высокую чувствительность и относительную стабильность при хранении. Отдельные микроРНК и их сочетания уже сейчас предлагаются в качестве диагностических маркеров и факторов прогноза.

Одним из серьезных вопросов в исследованиях прогностических маркеров является также **грамотный выбор объектов сравнения**. Наиболее существенная проблема — подбор клеток, близких по происхождению, но различных по метастатической активности. Зачастую поиск генов, вовлеченных в проявление метастатического потенциала, проводится путем сравнения клеток, полученных из первичных и вторичных опухолей одного и того же пациента. Альтернативой образцов из вторичных опухолей могут служить высокометастатические варианты клеточных линий, полученные селекцией *in vivo* у иммунодефицитных животных. Кроме того, вероятно, что способность метастазировать может быть приобретена отдельными клонами опухолевых клеток уже на ранних стадиях канцерогенеза, в то время как активная реализация этой способности осуществляется в ходе опухолевой прогрессии. Таким образом, еще раз необходимо подчеркнуть, что при проведении сравнительного анализа генной экспрессии с целью выявления маркеров, ассоциированных с метастазированием, необходимо учитывать

как морфологическую, так и генетическую гетерогенность популяции опухолевых клеток [13, 40, 90].

Очень полезным инструментом в проверке и оценке результатов молекулярного тестирования служат многочисленные биоинформационные базы данных, с помощью которых можно более адекватно формировать и панели онкомаркеров. Например, в связи с возникшей потребностью организовывать и систематизировать информацию об открываемых микроРНК создана очень удобная специализированная база данных (miRBase). В настоящее время база поддерживается Манчестерским университетом и является основным централизованным хранилищем информации, куда в обязательном порядке заносятся все вновь открываемые микроРНК, данные об их геномной локализации, последовательности и экспрессии [91, 92]. Текущая версия базы (выпуск № 21 от июня 2014 г.) содержит сведения о 28 645 микроРНК, включая 2588 человеческих, и доступна на сайте <http://mirbase.org>. В будущем планируется создание компьютерной базы, содержащей сведения и о прогностических и предиктивных диагностикумах.

Заключение

В недалеком будущем широкое использование молекулярно-генетических тестов в клинической практике может расширить возможности диагностики онкопатологии, а также способствовать разработке более точных прогностических критериев, что позволяет надеяться на существенное улучшение результатов лечения этого грозного заболевания. Современные тенденции использования молекулярных маркеров в клинической практике заключаются в персонализации прогноза и индивидуальном подходе к лечению онкологических больных. Учитывая системный характер онкопатологий, на сегодняшний день очевидно, что при их исследовании наиболее целесообразен комплексный подход.

Помимо совершенствования непосредственно хирургических и терапевтических методов лечения онкологических заболеваний, формирование групп канцерогенного риска, разработка новых методов ранней диагностики, точное прогнозирование течения заболевания и индивидуализация противоопухолевой терапии могут значительно повысить эффективность медицинской помощи и снизить затраты на обследование и лечение онкологических больных. Таким образом, работы, направленные на изучение молекулярно-генетических нарушений, необходимы для разработки более специфичных молекулярных маркеров, а также более чувствительных методов их детекции.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Sato M., Shames D.S., Gazdar A.F., Minna J.D. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2(4):327–43.
2. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
3. Langley R.R., Fidler I.J. The seed and soil hypothesis revisited – the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer* 2011;128(11):2527–35.
4. Копнин Б.П. Современные представления о механизмах злокачественного роста: сходства и различия солидных опухолей и лейкозов. *Клиническая онкогематология* 2012;5(3):165–83. [Kopnin B.P. Modern conceptions of malignant growth mechanisms: similarities and differences of solid tumors and leukosis. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2012;5(3):165–83. (In Russ.)]
5. McAllister S.S., Weinberg R.A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 2014;16(8):717–27.
6. Verma M., Manne U. Genetic and epigenetic biomarkers in cancer diagnosis and identifying high risk populations. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;60(1):9–18.
7. Thomas R.K., Baker A.C., Debiase R.M. et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 2007;39(3):347–51.
8. Hesson L.B., Hitchins M.P., Ward R.L. Epimutations and cancer predisposition: importance and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20(3):290–8.
9. Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res* 2012;318(4):299–310.
10. Suzuki H., Yamamoto E., Maruyama R. et al. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 2014. pii: S0006-291X(14)01221–2. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.007.
11. Shames D.S., Minna J.D., Gazdar A.F. DNA methylation in health, disease, and cancer. *Curr Mol Med* 2007;7(1):85–102.
12. Киселева Н.П., Киселев Ф.Л. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в вирус-ассоциированных опухолях человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;(1):48–55. [Kiseleva N.P., Kiselev F.L. Epigenetic regulation of gene expression in virus-associated human tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2014;(1):48–55. (In Russ.)].
13. Tam W., Weinberg R. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med* 2013;19(11):1438–49.
14. Curinha A., Braz S.O., Pereira-Castro I. et al. Implications of polyadenylation in health and disease. *Nucleus* 2014;5(6). PMID: 25191751.
15. Wennerberg K., Rossman K.L., Der C.J. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 5):843–6.
16. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21(3):309–22.
17. Недоспасов С.А., Купраш Д.В. Цитокины, их рецепторы и передача внутриклеточных сигналов. В кн.: *Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Медицина, 2004. С. 158–68. [Nedospasov S.A., Kuprash D.V. Cytokines, their receptors, and intracellular signal transfer. In: Carcinogenesis. D.G. Zaridze (ed.). Moscow: Medicine, 2004. Pp. 158–68. (In Russ.)]*
18. Gorovetz M., Baekelandt M., Berner A. et al. The clinical role of phospholipase A2 isoforms in advanced-stage ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2006;103(3):831–40.
19. Gelman I.H. The role of SSeCKS/gravin/AKAP12 scaffolding proteins in the spatiotemporal control of signaling pathways in oncogenesis and development. *Front Biosci* 2002;7: d1782–97.
20. Zhang B., Wang J., Wang X. et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2014;513(7518):382–7.
21. Arkhipova K.A., Zborovskaya I.B. Microdomain-forming proteins of different families in common signal pathways. *Biologicheskie Membrany* 2013;29(6):387–99.
22. Глушанкова Н.А., Житняк И.Ю., Айолло Д.В., Рубцова С.Н. Роль E-кадгерина в неопластической эволюции эпителиальных клеток. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;(1):12–7. [Gloushankova N.A., Zhitnyak I.Yu., Ayollo D.V., Rubtsova S.N. The role of E-cadherin in neoplastic evolution of epithelial cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2014;(1):12–7. (In Russ.)].
23. Gupta R., Toufaily C., Annabi B. Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer. *Biochimie* 2014. pii: S0300-9084(14) 00259–4. doi: 10.1016/j.biochi.2014.09.010.
24. Santarpia L., Nicoloso M., Calin G.A. MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. *Endocr Relat Cancer* 2010;17(1):51–75.
25. White N.M., Fatoohi E., Metias M. et al. Metastamirs: a stepping stone towards improved cancer management. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(2):75–84.
26. Lee S.K., Calin G.A. Non-coding RNAs and cancer: new paradigms in oncology. *Discov Med* 2011;11(58):245–54.
27. Takahashi R., Miyazaki H., Ochiya T. The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Front Genet* 2014;4:295. doi: 10.3389/fgene.2013.00295.
28. Gupta P.B., Chaffer C.L., Weinberg R.A. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 2009;15(9):1010–2.
29. Krutovskikh V., Partensky C. New insights in oncology: epigenetics and cancer stem cells. *Cancer Radiother* 2011;15(8):716–22.
30. Mannelli G., Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treat Rev* 2012;38(5):515–39.
31. Aushev V.N., Zborovskaya I.B., Laktionov K.K. et al. Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2013;8(10):e78649. doi: 10.1371/journal.pone.0078649.
32. Ishida M., Selaru F.M. miRNA-based therapeutic strategies. *Curr Anesthesiol Rep* 2013;1(1):63–70.
33. Mäbert K., Cojoc M., Peitzsch C. et al. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *Int J Radiat Biol* 2014;90(8):659–77.
34. Volinia S., Nuovo G., Drusco A. et al. Pluripotent stem cell miRNAs and metastasis in invasive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(12). pii: dju324. doi: 10.1093/jnci/dju324.
35. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб.: Издательский дом СПбМАПО, 2007. 212 с. [Imaynitov E.N., Hanson C.P. Molecular oncology: clinical aspects. St. Petersburg: SPbMAPO Publishing House, 2007. 212 p. (In Russ.)]
36. Goode E.L., Ulrich C.M., Potter J.D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(12):1513–30.
37. Timofeeva M.N., Hung R.J., Rafnar T. et al. Influence of common genetic variation on lung cancer risk: meta-analysis of 14 900 cases and 29 485 controls. *Hum Mol Genet* 2012;21(22):4980–95.
38. Sosa M.S., Bragado P., Aguirre-Ghiso J.A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):611–22.
39. Suvà M.L., Riggi N., Bernstein B.E. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 2013;339(6127):1567–70.
40. Marjanovic N.D., Weinberg R.A., Chaffer C.L. Poised with purpose: cell plasticity enhances tumorigenicity. *Cell Cycle* 2013;12(17):2713–9.

41. Красильников М.А., Шербаков А.Н. Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска. Успехи молекулярной онкологии 2014;(1):18–26. [Krasil'nikov M.A., Shcherbakov A.M. Estrogen-dependent signaling pathways and their role in the tumor progression: progress and perspectives. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;(1):18–26. (In Russ.)].
42. Сергеева Н.С., Маршутина Н.В., Солохина М.П. и др. Современные представления о серологических опухолеассоциированных маркерах и их месте в онкологии. Успехи молекулярной онкологии 2014;(1):69–80. [Sergeeva N.S., Marshutina N.V., Solokhina M.P. et al. Modern conceptions of serological tumor markers and their role in oncology. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;(1):69–80. (In Russ.)].
43. Denholm R., Schüz J., Straif K. et al. Is previous respiratory disease a risk factor for lung cancer? Am J Respir Crit Care Med 2014;190(5):549–59.
44. Taioli E., Gaspari L., Benhamou S. et al. Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years. Int J Epidemiol 2003;32(1):60–3.
45. Fidler I.J. Biological heterogeneity of cancer: implication to therapy. Hum Vaccin Immunother 2012;8(8):1141–2.
46. Zborovskaya I., Gasparian A., Karseladze A. et al. Somatic genetic alterations (LOH) in benign, borderline and invasive ovarian tumours: intratumoral molecular heterogeneity. Int J Cancer 1999;82(6):822–6.
47. Gupta P.B., Fillmore C.M., Jiang G. et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. Cell 2011;146(4):633–44.
48. Подгорный О.В., Лазарев В.Н., Говорун В.М. Лазерная микродиссекция в биологии и медицине. Цитология 2012;54(5):381–9. [Podgorniy O.V., Lazarev V.N., Govorun V.M. Laser dissection in biology and medicine. Tsitologiya = Cytology 2012;54(5):381–9. (In Russ.)].
49. van Dam E.M., Robinson P.J. Ral: mediator of membrane trafficking. Int J Biochem Cell Biol 2006;38(11):1841–7.
50. Xiong J., Liu J., Rayner S. et al. Protein-protein interaction reveals synergistic discrimination of cancer phenotype. Cancer Inform 2010;9:61–6.
51. Neumann J., Wehweck L., Maatz S. et al. Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis. Virchows Arch 2013;463(4):509–23.
52. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки: от эксперимента к клинике. Успехи молекулярной онкологии 2014;(1):27–35. [Gershtein E.S., Kushlinsky N.E. Growth factors, their receptors and down-stream signaling proteins in human tumors: from experiment to clinical practice. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;(1):27–35. (In Russ.)].
53. George K.S., Wu S. Lipid raft: A floating island of death or survival. Toxicol Appl Pharmacol 2012;259(3):311–9.
54. Chowdhury I., Thompson W.E., Thomas K. Prohibitins role in cellular survival through Ras–Raf–MEK–ERK pathway. J Cell Physiol 2014;229(8):998–1004.
55. Sotgia F., Martinez-Outschoorn U.E., Howell A. et al. Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms. Annu Rev Pathol 2012;7:423–67. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-120856.
56. Arkhipova K.A., Sheyderman A.N., Laktionov K.K. et al. Simultaneous expression of flotillin-1, flotillin-2, stomatin and caveolin-1 in non-small cell lung cancer and soft tissue sarcomas. BMC Cancer 2014;14:100. doi: 10.1186/1471-2407-14-100.
57. Andreu Z., Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. Front Immunol 2014;5:442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.
58. Kaplan R., Raffi S., Lyden D. Preparing the “soil”: the premetastatic niche. Cancer Res 2006;66(23):11089–93.
59. Pant S., Hilton H., Burczynski M.E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. Biochem Pharmacol 2012;83(11):1484–94.
60. Braicu C., Tomuleasa C., Monroig P. et al. Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? Cell Death Differ. 2014. doi: 10.1038/cdd.2014.130.
61. Brabender J., Marjoram P., Salonga D. et al. Expression analysis of a limited number of highly selected genes may have clinical usefulness for the treatment of patients with this disease. A multigene expression panel for the molecular diagnosis of Barrett's esophagus and Barrett's adenocarcinoma of the esophagus. Oncogene 2004;23(27):4780–8.
62. Singhal S., Vachani A., Antin-Ozerkis D. et al. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. Clin Cancer Res 2005;11(11):3974–86.
63. Zhu C.Q., Shih W., Ling C. H., Tsao M.S. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. J Clin Pathol 2006;59(8):790–800.
64. Okayama H., Schetter A.J., Ishigame T. et al. The expression of four genes as a prognostic classifier for stage I lung adenocarcinoma in 12 independent cohorts. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2014. pii: cebp. 0182.2014.
65. Юдин Д.И. Молекулярно-биологические особенности опухоли в индивидуальном прогнозировании результатов хирургического лечения немелкоклеточного рака легкого, Дис. ... канд. мед. наук. М., 2005. 126 с. [Yudin D.I. Molecular and biological peculiarities of tumors in individual prediction of results of surgical treatment of non-small cells lung cancer: Thesis ... of candidate of medical sciences. Moscow, 2005. 126 p. (In Russ.)].
66. Witta S.E., Gemmill R.M., Hirsch F.R. et al. Restoring e-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. Cancer Res 2006;66(2):944–50.
67. Witta S.E., Jotte R.M., Konduri K. et al. Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy. J Clin Oncol 2012;30(18):2248–55.
68. Imyanitov E.N. Ovarian cancer genome. Methods Mol Biol 2013;1049:3–7. doi: 10.1007/978-1-62703-547-7_1.
69. Iyevleva A.G., Mitiushkina N.V., Karaseva N.A. et al. Lung carcinomas with EGFR exon 19 insertions are sensitive to gefitinib treatment. J Thorac Oncol. 2014;9(4):e31–3.
70. Семглазова Т.Ю., Клименко В.А., Филатова Л.В. и др. Маркеры эффективности предоперационной таксансодержащей химиотерапии местнораспространенного рака молочной железы. Вопросы онкологии 2013;59(3):363–7. [Semiglazova T.Yu., Klimenko V.A., Filatova L.V. et al. Markers of efficiency of preoperative taxane-containing chemotherapy of locally advanced breast cancer. Voprosy onkologii = Oncology Issues 2013;59(3):363–7. (In Russ.)].
71. Городнова Т.В., Максимов С.Я., Гусейнов К.Д., Имянитов Е.Н. Оценка эффективности платиносодержащей химиотерапии у больных раком яичников носительниц мутаций в гене BRCA1. Вопросы онкологии 2014;60(3):339–42. [Gorodnova T.V., Maximov S.Ya., Guseinov C.D., Imyanitov E.N. Assessment of efficiency of platinum-containing chemotherapy of patients with ovarian carcinoma that carry mutations in the BRCA1 gene. Voprosy onkologii = Oncology Issues 2014;60(3):339–42. (In Russ.)].
72. Имянитов Е.Н. Меланома: от исследований молекулярного патогенеза к революции в лечении. Архив патологии 2013;75(5):63–72. [Imyanitov E.N. Melanoma: from research of molecular pathogenesis to revolution in therapy. Arkhiv patologii = Pathology Archive 2013;75(5):63–72. (In Russ.)].
73. Герштейн Е.С., Кушлинский Д.Н., Левкина Н.В. и др. Взаимосвязь экспрессии компонентов VEGF-сигнального пути и матричных металлопротеиназ в опухолях больных с новообразованиями яичников. Бюллетень экспериментальной

- биологии и медицины 2011;151(4):431–6.
[Gerstein E.S., Kushlinskiy D.N., Levkina N.V. et al. Interconnection between expression of components of VEGF signal route and matrix metalloproteinases in tumors of patients with ovarian neoplasms. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2011;151(4):431–6. (In Russ.)]
74. Bogush T.A., Dudko E.A., Semakov A.V. et al. Immunofluorescent assay of ERCC1 and estimation of clinical significance of the protein expression in ovarian cancer tissue. *Dokl Biochem Biophys* 2014;457(1):141–5.
75. Emelyanova M., Arkhipova K., Mazurenko N. et al. Sensitive Genotyping of Somatic Mutations in the EGFR, KRAS, PIK3CA, BRAF Genes from NSCLC Patients Using Hydrogel Biochips. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2014. [Epub ahead of print].
76. Demidova I., Barinov A., Savelov N. et al. Immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements in patients with non-small cell lung cancer: potential advantages and methodologic pitfalls. *Arch Pathol Lab Med* 2014;38(6):794–802.
77. Blom R.L., Bogush T., Brücher B.L. et al. Therapeutic approaches to gastroesophageal junction adenocarcinomas. *Ann NY Acad Sci* 2014;1325(1):197–210.
78. de Thé H., Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer* 2010;10(11):775–83.
79. Grosse-Gehling P., Fargeas C.A., Dittfeld C. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol* 2013;229(3):355–78.
80. Roudi R., Madjd Z., Korourian A. et al. Clinical significance of putative cancer stem cell marker CD44 in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Biomark* 2014;14(6):457–67. doi: 10.3233/CBM-140424.
81. Bertolini G., Roz L., Perego P. et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(38):16281–6.
82. Sun Q.L., Sha H.F., Yang X.H. et al. Comparative proteomic analysis of paclitaxel sensitive A549 lung adenocarcinoma cell line and its resistant counterpart A549-Taxol. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(3):521–32.
83. Alamgeer M., Ganju V., Kumar B. Changes in aldehyde dehydrogenase-1 expression during neoadjuvant chemotherapy predict outcome in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014;16(2):R44. doi: 10.1186/bcr3648.
84. Shtam T.A., Kovalev R.A., Varfolomeeva E.Y. et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*. *Cell Commun Signal* 2013;11:88. doi: 10.1186/1478-811X-11-88.
85. Ling H., Fabbri M., Calin G.A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature reviews. Drug Discov* 2013;12(11):847–65.
86. Li S., Liang Z., Xu L., Zou F. MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases. *Mol Cell Biochem* 2012;360(1–2):147–58.
87. Shevchenko V., Kovalev S., Arnotskaya N. et al. Human blood plasma proteome mapping for search of potential markers of the lung squamous cell carcinoma. *Eur J Mass Spectrometry* 2013;19(2):123–33.
88. Bridge J.A., Cushman-Vokoun A.M. Molecular diagnostics of soft tissue tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(5):588–601.
89. Nookaew I., Papini M., Pornputtapong N. et al. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2012;40(20):10084–97.
90. Marjanovic N.D., Weinberg R.A., Chaffer C.L. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem* 2013;59(1):168–79.
91. Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006;34(Database issue):D140–4.
92. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39(Database issue):D152–7.

Наследственный рак молочной железы: генетическая и клиническая гетерогенность, молекулярная диагностика, хирургическая профилактика в группах риска

Л.Н. Любченко, Е.И. Батенева, И.К. Воротников, С.М. Портной, О.В. Крохина,
В.А. Соболевский, Л.Г. Жукова, В.А. Хайленко, С.А. Тюляндин

Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»,
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Людмила Николаевна Любченко clingen@mail.ru

На долю наследственных форм приходится 5–10 % случаев рака молочной железы, 30 % из них обусловлены мутациями в генах *BRCA1/2* (синдром наследственного рака молочной железы/рака яичников). Средние кумулятивные риски для носителей мутаций в гене *BRCA1* достигают 87 % в отношении развития рака молочной железы и 44 % в отношении развития рака яичников. Высокий риск контралатерального рака молочной железы: при манифестации первичной опухоли у носителей мутаций в гене *BRCA1* в возрасте до 40 лет он составляет 62,9 %. Активно изучается роль однонуклеотидных полиморфизмов, модифицирующих риск развития рака молочной железы и других опухолей женской репродуктивной системы у носителей мутаций в генах *BRCA1/2*. Молекулярная диагностика проводится в рамках медико-генетического консультирования. Основными показаниями для генетического тестирования являются онкологическиотягощенный семейный анамнез, рак молочной железы у женщин в молодом возрасте (до 35–50 лет), рак яичников, рак молочной железы у мужчин, морфологические особенности рака молочной железы (трижды негативные, медуллярные опухоли), этническая принадлежность (ашкеназские евреи). В группах высокого генетического риска проводятся профилактические химиотерапевтические и хирургические мероприятия. Показана высокая эффективность профилактических операций в отношении развития рака молочной железы и рака яичников. Двусторонняя профилактическая мастэктомия снижает риск развития рака молочной железы на 90–94 %.

Ключевые слова: наследственный рак молочной железы, наследственный рак яичников, *BRCA1*, *BRCA2*, мутация, однонуклеотидный полиморфизм, медико-генетическое консультирование, молекулярная диагностика, профилактическая мастэктомия, профилактическая овариэктомия

Hereditary breast cancer: genetic and clinical heterogeneity, genetic testing, prophylactic surgery

L.N. Lyubchenko, Ye.I. Bateneva, I.K. Vorotnikov, S.M. Portnoy, O.V. Krokhina,
V.A. Sobolevskiy, L.G. Zhukova, V.A. Khaylenko, S.A. Tyulyandin

Scientific Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24

5–10 % of breast cancer cases are hereditary, 30 % of them are caused by *BRCA1* and *BRCA2* mutations (breast/ovarian cancer syndrome). Average cumulative risks of breast and ovarian cancer in *BRCA1* mutation carriers run up to 87 % and 44 %, correspondingly. The risk for contralateral breast cancer is also high: after 25 years, 62.9 % of patients with *BRCA1* mutation who were younger than 40 years of age at first breast cancer develop contralateral breast cancer. The role of single nucleotide polymorphisms in *BRCA1* and *BRCA2* genes modifying breast and gynaecological cancer risks is actively studied. Genetic testing is performed as a part of genetic counselling. The main inclusion criteria are multiple affected family members with breast/ovarian cancer, breast cancer at young age (under 35–50 years), ovarian cancer at any age, male breast cancer, morphological features of breast cancer (triple-negative, medullary tumors), ethnicity (Jewish ancestry). High-risk individuals carrying *BRCA* mutations undergo specific surveillance, chemoprophylaxis and surgery protocols. Prophylactic bilateral mastectomy reduces breast cancer risk by 90–94 %.

Key words: hereditary breast cancer, hereditary ovarian cancer, *BRCA1*, *BRCA2*, mutation, single nucleotide polymorphism, genetic counselling, genetic testing, prophylactic mastectomy, prophylactic oophorectomy

Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным заболеванием среди женщин в развитых индустриальных странах. Ежегодная заболеваемость РМЖ в мире составляет 1 383 000 случаев. Доля наследственно-обусловленного РМЖ колеблется от 5 до 10 %, что составляет 69 150–138 000 случаев, 30 % из которых ассоциировано с мутациями в генах *BRCA1/2*. Семейную историю накопления случаев РМЖ и опухолей женской репродуктивной системы отмечают 25 % заболевших

женщин. Таким образом, число больных с наследственными и семейными формами РМЖ в целом составляет 345 700 [1]. Этиопатологическим фактором являются структурные и функциональные перестройки высокопенетрантных генов *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *MLH1*, *MSH2* и генов средней и низкой вероятности проявления – *CHEK2*, *STK11/LKB1*, *CDH1*, *PALB* и др., ассоциированных с развитием РМЖ на фоне наследственных онкологических синдромов (табл. 1).

Таблица 1. Синдромы, ассоциированные с наследственным РМЖ [2–4]

Синдром	Вовлеченный ген и его локализация	Основные клинические проявления
Наследственный РМЖ и/или рак яичников (РЯ)	<i>BRCA1</i> (17q21) <i>BRCA2</i> (13q12.3)	РМЖ, РЯ, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, меланома, рак толстой кишки
Синдром Ли–Фраумени	<i>TP53</i> (17p13.1) <i>CHEK2</i> (22q12.1)	РМЖ, мягкотканые саркомы, остеосаркомы, опухоли головного мозга, лейкозы, рак коры надпочечников
Синдром Линча (наследственный неполипозный рак толстой кишки)	<i>MSH2</i> (2p22-p21) <i>MSH3</i> (5q11-q12) <i>MSH6</i> (2p16) <i>MLH1</i> (3p21.3) <i>PMS1</i> (2q31-q33) <i>PMS2</i> (7p22)	Рак толстой кишки, первично-множественные злокачественные опухоли: РМЖ, РЯ, рак тела матки, желудка, тонкой кишки, мочеочника или почечной лоханки, желчных путей; возможно сочетание с опухолями головного мозга (синдром Тюрко) или множественными аденомами слюнных желез (синдром Торре)
Синдром Луи–Бар	<i>ATM</i> (11q22.3)	Лимфома, мозжечковая атаксия, глиома, поражения кожи, дефицит иммунной системы, глиома, медуллобластома, РМЖ
Наследственный диффузный рак желудка	<i>CDH1</i> (16q22.1)	Рак желудка, дольковый РМЖ
Синдром Коудена	<i>PTEN</i> (10q23.31)	Поражение слизистых оболочек и кожи, множественные гамартомы (чаще в желудочно-кишечном тракте), РМЖ, рак щитовидной железы, опухоли матки и др.
Синдром Пейтца–Егерса	<i>STK11</i> (19p13.3)	Пигментация кожи, слизистой оболочки ротовой полости, множественные гамартомы желудочно-кишечного тракта, РМЖ, герминогенные опухоли
Синдром хромосомной нестабильности	<i>NBS1</i> (8q21)	Микроцефалия, комбинированный первичный иммунодефицит, повышенная чувствительность к радиоактивному излучению, РМЖ
Анемия Фанкони	<i>BRIP1/FANCF</i> (17q23.2) <i>PALB2/FANCD1</i> (16p12) <i>FANCA</i> (16q24.3)	Апластическая анемия, аномалии скелета, неврологические расстройства, врожденные пороки сердца, РМЖ

Наследственный РМЖ характеризуется аутосомно-доминантным типом наследования, ранним возрастом возникновения, передачей как с материнской, так и с отцовской стороны и выраженной генотипической и фенотипической гетерогенностью. В значительной части случаев (около 30 %) наследственный РМЖ является составляющей так называемого синдрома РМЖ и/или РЯ, в 70 % случаев ассоциированного с мутациями в генах *BRCA*. Распространенность носителей мутаций генов *BRCA* в общей популяции составляет от 1:800 до 1:1000 [5].

Критериями для постановки генетического диагноза наследственного РМЖ служат наличие в семье 2 и более родственников I–II степени родства, страдающих РМЖ и/или РЯ, ранний возраст манифестации заболевания, двухстороннее поражение, первично-множественные опухоли у пациента или его родственников, синдромальная патология.

Для подтверждения генетического диагноза используются различные методы ДНК-диагностики и их комбинации: полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим электрофорезом при мутационном скрининге всего гена с целью выявления структурных перестроек; ПЦР в реальном времени (real-time PCR), позволяющая производить количественную оценку копийности гена, мультиплексная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидными биочипами для тестирования известных частых мутаций.

Для определения полной нуклеотидной последовательности кодирующей части генов *BRCA1* и *BRCA2* используется автоматическое секвенирование. Для обнаружения крупных геномных перестроек применяют метод MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) и др.

Наиболее востребованной и значимой на сегодняшний день является ДНК-диагностика генов *BRCA1/2*, *CHEK2*, *TP53* с целью выявления наследственной предрасположенности к РМЖ. Частота мутаций этих генов в общей популяции составляет 3–5 % для женщин моложе 40 лет и 1,1 % – в возрасте 50–70 лет [6]. Пенетрантность мутаций не является полной и зависит как от внутригенных (тип мутации, местоположение, сочетание с однонуклеотидными полиморфизмами), так и от экзогенных факторов (популяционных и внешнесредовых). Стиль жизни, репродуктивное поведение определяют временные рамки реализации наследственной предрасположенности.

Согласно современным представлениям, гены *BRCA1* и *BRCA2* проявляют себя как классические опухолевые супрессоры. Функционирование этих генов вовлечено в репарацию двунитевых разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации, участвующей в процессе поддержания стабильности генома [7, 8]. Утрата их функции влечет за собой ошибки репарации повреждений ДНК, вследствие чего активизируются гены контроля клеточного цикла, ингибирующие дальней-

ший рост клеток с возникшими генетическими аномалиями и индуцирующие программированную клеточную гибель — апоптоз. Накопление ошибок репарации, приводящих к нарушениям регуляции клеточного цикла, апоптоза и дифференцировки клетки и, как следствие, к генетической нестабильности, является ключевым событием в процессе канцерогенеза (рис. 1).

При наследственном РМЖ для инициации опухолевого роста, помимо герминальной мутации необходима инактивация второго аллеля, которая происходит в соматической клетке [9, 10]. Иницирующим моментом инактивации может служить как соматическая мутация, так и ряд эпигенетических событий, таких как аномальное метилирование [11].

Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* значительно увеличивают индивидуальный риск развития РМЖ и РЯ. Средние кумулятивные риски для носителей мутаций *BRCA1* к возрасту 70 лет составляют 57–65 % в отношении развития РМЖ и 39–40 % — РЯ.

Риск развития РМЖ для носителей мутаций в гене *BRCA2* составляет 45–49 %, тогда как риск развития РЯ не превышает 11–18 % [12].

При отягощенном семейном анамнезе риски возрастают: для носителей мутаций в гене *BRCA1* до 87 % в отношении развития РМЖ и до 44 % — РЯ [13]; для носителей мутаций в гене *BRCA2* — до 84 и 27 % соответственно [14].

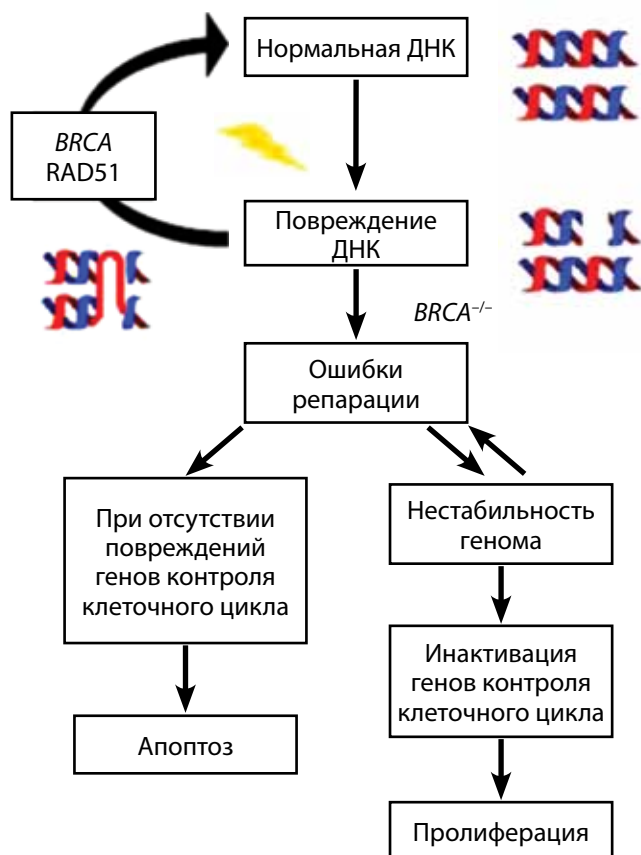


Рис. 1. Схематическое изображение функционирования генов *BRCA1/2* и нарушения при инактивации их функциональной активности [10]

Как и в общей популяции, так и у носителей мутаций в генах *BRCA* риск развития двустороннего РМЖ в молодом возрасте тесно коррелирует с молодым возрастом первичного рака [15, 16]. L. Verhoog et al. в 2002 г. определили ежегодный риск контралатерального рака для больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ моложе 41 года в 4,5 %, в возрасте 41–50 лет этот риск составляет 6,3 %, в то время как среди больных старше 60 лет риск развития контралатерального РМЖ равен нулю [17].

Аналогичные работы были выполнены и другими группами исследователей: M. Robson et al. оценили 5-летний риск развития контралатерального РМЖ в 31 % в группе из 30 носителей *BRCA*-мутаций, заболевших до 42 лет [18]. L.J. Pierce et al. рассчитали, что риск развития двустороннего РМЖ в течение 5 лет после постановки диагноза составляет 20 % в когортной группе больных — носителей *BRCA*-мутаций ($n = 71$) [19]. P.O. Chappius et al. констатировали развитие контралатерального РМЖ в 10 % случаев среди 32 больных *BRCA*-ассоциированным РМЖ [20].

В одной из работ показано, что кумулятивный риск развития контралатерального РМЖ через 25 лет после постановки первичного диагноза РМЖ у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* составляет 47,4 %, при этом у больных с мутациями *BRCA1* риск в 1,6 раза выше. При манифестации первичного РМЖ у носителей мутаций в гене *BRCA1* в возрасте до 40 лет риск развития контралатерального РМЖ в последующие 25 лет составляет 62,9 %, в то время как у заболевших после 50 лет риск не превышает 19,6 %, что необходимо учитывать при медико-генетическом консультировании [21].

C. Begg et al. обнаружили, что риск развития РМЖ у родственниц больных двусторонним РМЖ выше, чем у родственниц пациенток, страдающих односторонним РМЖ ($p < 0,001$) [22]. Такая же тенденция наблюдалась и для носителей *BRCA1/2*-мутаций. Риск заболевания для родственниц увеличивался также при молодом возрасте манифестации РМЖ у пробанда.

В исследовании, проведенном в РОНЦ им. Н.Н. Блохина, частота мутаций генов *BRCA1/2* в выборке российских больных двусторонним РМЖ с положительной семейной историей составила 53 % и достоверно отличалась от таковой у больных без семейной отягощенности — 15,6 %. Молодые пациентки, возраст которых на момент постановки первоначального диагноза РМЖ не превышал 41 года, составили 42 %. Средний временной интервал между первичным и контралатеральным РМЖ составил 8,3 года для носителей мутаций в генах *BRCA* и был несколько больше для больных спорадическим двусторонним РМЖ — 10,6 года. В 43,8 % случаев у носителей мутантного *BRCA*-статуса был диагностирован синхронный двусторонний РМЖ [23].

Рак молочной железы у мужчин

РМЖ у мужчин встречается в среднем в 100 раз реже, чем у женщин, и составляет менее 1 % всех зло-

качественных новообразований у мужчин. Популяционные оценки зависят от этнических и географических факторов.

Эпидемиологические факторы риска включают патологические состояния, ассоциированные с первичным и вторичным гиперстероидизмом, влиянием радиоактивного излучения, онкологически отягощенным анамнезом и генетической предрасположенностью.

Герминальные мутации генов *BRCA* определяют высокий риск развития РМЖ у мужчин — в 80 раз выше по сравнению с общепопуляционными оценками. Частота носительства таких мутаций колеблется, по данным разных авторов, от 4 до 40 %. При изучении РМЖ у мужчин в выборках больных, не учитывающих онкологически отягощенный анамнез, частота мутаций имела популяционную зависимость (табл. 2). S. Thorlacious et al. продемонстрировали очень высокую частоту — 40 % — носительства основополагающих *BRCA2*-мутаций в исландской популяции мужчин, страдающих РМЖ [24]. Частотные оценки носительства *BRCA1*-мутаций в среднем не превышали 11 %, тогда как высокие показатели наследственно-обусловленного *BRCA*-ассоциированного МРМЖ были характерны для закрытых популяций с «эффектом родоналичника». M.S. Brose et al. рассчитали, что кумулятивный возраст-зависимый риск развития РМЖ у мужчин — носителей *BRCA*-мутаций составляет 5,8 % по сравнению с 0,1 % в общей популяции [25].

В канцерогенезе РМЖ у мужчин задействованы и другие гены, такие как андрогенрецепторный ген (*AR*) и гены, ответственные за ошибки репарации ДНК, — *MLH1*, *MSH2*, а РМЖ как у женщин, так и у мужчин может быть одним из проявления синдрома Линча, или наследственного неполипозного колоректального рака. J. Boyd et al. описали мужчину — члена большой семьи с синдромом Линча, страдающего первично-множественными злокачественными опухолями — РМЖ и раком толстой кишки [35]. При проведении

молекулярно-генетического исследования ДНК, выделенной из лимфоцитов крови пациента, выявлена герминальная мутация гена *MLH1*, подтвержденная соматической гомозиготной *MLH1*-мутацией и микросателлитной нестабильностью в опухоли молочной железы. Аналогичный пример дифференциальной молекулярно-генетической диагностики представлен на клиническом случае развития 5 первично-множественных злокачественных опухолей, включая РМЖ, удовлетворяющих критериям синдрома Линча, у пациента — носителя герминальной мутации гена *MLH1* (618del3), проходившего лечение и наблюдающегося в РОНЦ им. Н.Н. Блохина (рис. 2) [23].

Герминальные мутации и полиморфные варианты в генах *BRCA*

Согласно целому ряду исследований, в России преобладает мутация 5382insC в гене *BRCA1*, она составляет около 70 % всех мутаций в *BRCA1* при РМЖ (рис. 3) [23, 36–43] и около 60 % при РЯ [23]. В гене *BRCA1* часто встречаются мутации 4153delA [36, 40–42], Cys61Gly [23, 40, 42], 185delAG [23, 38, 40, 42]. В нескольких российских исследованиях также выявлены



Рис. 2. Пример первично-множественных злокачественных опухолей у больного РМЖ в составе синдрома Линча. РТК — рак толстой кишки; РПЖ — рак предстательной железы

Таблица 2. Исследования, посвященные изучению частоты носительства мутаций генов *BRCA* при РМЖ у мужчин

Автор	Страна	Клинические исследования	Число больных	Частота мутаций <i>BRCA</i>
L.S. Friedman, 1997 [26]	США, Южная Калифорния	Популяционное	54	2/54 (4 %)
S. Thorlacious, 2007 [24]	Исландия	Популяционное	30 (МРМЖ)	12/30 (40 %)
K. Haraldsson, 1998 [27]	Швеция	Популяционное	34	7/34 (21 %)
B. Csokay, 1999 [28]	Венгрия	Популяционное	18	6/18 (33 %)
R.S. Sverdlov, 2000 [29]	Израиль	Семейно-популяционное	31	2/31 (6 %)
E. Kwiatkowska, 2000 [30]	Польша	Популяционное	37	74/37 (11 %)
V.M. Basham, 2002 [31]	Англия	Популяционное	94	5/94 (8 %)
T.S. Frank, 2002 [32]		Популяционное	76	14/76 (18 %)
L. Ottini, 2003 [33]	Италия	Популяционное	25	4/25 (16 %)
L. Ottini, 2012 [34]	Италия	Популяционное	382	50/382 (13 %)

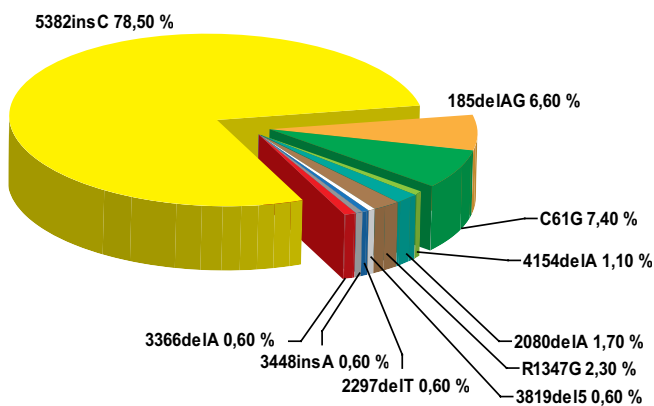


Рис. 3. Спектр и частота мутаций *BRCA1* (данные РОНЦ им. Н.Н. Блохина)

мутации 2080delA, 3819delGTAAA, 3875delGTCT в гене *BRCA1* [23, 37, 40, 41, 43] и мутация 6174delT в гене *BRCA2* [23, 38, 40, 42].

В последнее время большое внимание уделяется поиску, характеристике и определению клинической значимости полиморфных вариантов ДНК (single nucleotide polymorphism — варианты последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме индивида) в кодирующих и некодирующих областях генов, задействованных в наследственном и спорадическом канцерогенезе. Предполагают, что эти варианты являются модификаторами риска у пациентов с наследственной предрасположенностью, а полиморфизмы генов *BRCA* — важными структурно-функциональными составляющими при развитии злокачественных опухолей женской репродуктивной системы той или иной локализации [44–46].

Для определения генетических локусов, ассоциированных с развитием спорадического РМЖ, было предпринято полногеномное исследование более 220 тыс. полиморфных вариантов в различных генах, в результате которого обнаружено 5 независимых локусов, ассоциированных с возникновением рака данной локализации ($p < 10^{-7}$) [47]. Исследование влияния низкопенетрантных аллельных вариантов генов также было выполнено при анализе 710 полиморфных вариантов в 120 генах с заведомо известной функцией у 4400 больных РМЖ и в равной по объему контрольной выборке. Последовательность гена *BRCA1* очень вариативна. Полагают, что некоторые его участки имеют незначительную структурную консервативность, и аминокислотные замены внутри них не оказывают влияния на функциональную активность белка. В то же время имеются высококонсервативные участки, например домены RING-finger и BRCT. Миссенс-варианты внутри этих доменов в большей степени ассоциированы с предрасположенностью к РМЖ по сравнению с мутациями в других участках. Менее консервативная последовательность белка кодируется 11-м экзоном гена. Установлено, что в гене *BRCA1* присутствует гаплотип из 11 однонуклеотидных полиморфных вариантов (IVS1-103T/C — 1-й интрон, IVS1-115T/C — 1-й инт-

рон, IVS8-58delT — 8-й интрон, S694S — 11-й экзон, L771L — 11-й экзон, P871L — 11-й экзон, E1038G — 11-й экзон, K1183R — 11-й экзон, S1436S — 13-й экзон), которые находятся почти в полном неравновесии по сцеплению по отношению друг к другу и наследуются в совокупности. Их делят на два основных гаплотипа: А и В [48].

Полноразмерный ген *BRCA2* имеет несколько высококонсервативных сайтов. Миссенс-варианты в гене *BRCA2* являются наиболее частыми изменениями и составляют 54 % всех мутаций. Наиболее изученным полиморфизмом в гене *BRCA2* является миссенс-вариант Ex10 + 321 A > C (rs144848) — N372H (Arg372His) в 10-м экзоне, приводящий к замене кодируемой аминокислоты. Частота встречаемости по редкому аллелю 372H довольно высока во всех популяциях и превышает 10 %. В российской популяции частота гомозиготного варианта N372H в группе семейного РМЖ в два раза превышает таковую в группе спорадического рака. Аллельная частота минорного гомозиготного варианта 372H в группах больных РМЖ также оказалась выше.

По результатам международных исследований, гомозиготный НН-аллельный вариант (372H/H) ассоциируется с повышением риска развития РМЖ в 1,3–1,5 раза по сравнению со среднепопуляционным и, кроме того, увеличивает риск развития РЯ [49–51]. Показано, что носителями гомозиготного варианта чаще являются мужчины, а риск развития РМЖ ассоциирован с более молодым возрастом манифестации заболевания [52]. Другим наиболее изученным полиморфным вариантом, наличие которого ассоциируется с повышенным риском развития РМЖ и РЯ, является аминокислотная замена в 5'-нетранслируемой области (Ex2 + 14G/A, rs1799943) 2-го экзона гена *BRCA2* — 203 G/A [51].

С целью оценки частотного спектра и клинического значения различных генотипических аллельных вариантов генов *BRCA* и *TP53*, вовлеченных в канцерогенез РМЖ, инициировано исследование, выполненное в РОНЦ им. Н.Н. Блохина в 2012 г. [53]. Показано, что частота делеторных мутаций в генах *BRCA* и гаплотипа В гена *BRCA1* составила 31 и 32,6 % соответственно, что обосновало необходимость дальнейшего изучения патоморфологических характеристик герминального гаплотипа.

У родственников больных с наличием аллельных вариантов в генах *BRCA* РМЖ выявлялся с частотой от 23,1 до 50 %, РЯ — от 3,3 до 23,1 %, первично-множественные злокачественные опухоли — от 3,5 до 15 %. У родственников (I–II степени родства) носителей миссенс-варианта Q356R в гене *BRCA1* наблюдалась высокая частота заболеваемости раком желудка — 30,8 %. Полученные данные свидетельствуют также о том, что женщины с наличием *BRCA*-мутаций и пациентки с наличием аллельных вариантов в генах *BRCA* имеют повышенный риск заболеть РМЖ в молодом (репродуктивном) возрасте. Медианы возраста развития РМЖ

не превышали 42 лет во всех анализируемых группах наследственного РМЖ.

Аллельные *BRCA*-варианты в 30,8 % случаев были ассоциированы с развитием первично-множественных злокачественных опухолей, включая двусторонний РМЖ. Медиана времени до возникновения вторых первичных опухолей была одной из самых длительных у носительниц гаплотипа В (*BRCA1*) и миссенс-варианта N372H (*BRCA2*) и составила 8 лет по сравнению с 2 годами у носителей миссенс-мутации Q356R (*BRCA1*). Случаи двустороннего РМЖ чаще всего отмечались у носительниц миссенс-варианта Q356R в гене *BRCA1* (30,8 %) и при *BRCA*-мутациях (29,8 %), что необходимо учитывать при расчете риска развития рака контралатеральной молочной железы в процессе медико-генетического консультирования.

Патоморфологическими особенностями РМЖ, ассоциированного с герминальным гаплотипом В (*BRCA1*), являются инфильтративный протоковый рак (66,7 %), уницентрический характер роста (81,7 %), II степень злокачественности (71,7 %), положительный рецепторный статус (43,3 %), низкий пролиферативный индекс, отсутствие экспрессии гена *HER-2/neu* (58,3 %) и регионарного метастазирования (53,3 %). Редкие гистологические варианты РМЖ достоверно чаще выявляются при наличии гаплотипа В (18,3 %) по сравнению с *BRCA*-мутациями (5,3 %) ($p = 0,023$). РМЖ, ассоциированный с наличием миссенс-варианта Q356R в гене *BRCA1*, в 69,2 % случаев характеризуется преимущественно отрицательным рецепторным статусом в отличие от РМЖ, ассоциированного с полиморфным вариантом N372H в гене *BRCA2*. Опухоли с отсутствием экспрессии гена *HER-2/neu* и высоким индексом пролиферативной активности составляют 46,1 и 30,8 % случаев соответственно. В группе больных РМЖ, ассоциированным с наличием миссенс-варианта N372H в гене *BRCA2*, в 25 % отмечен инфильтративный дольковый рак с уницентрическим характером роста, II и III степени злокачественности (45 и 40 % соответственно), с наличием раковых эмболов в лимфатических щелях (65 %) и высокой частотой регионарного метастазирования (65 %), по сравнению с *TP53*-ассоциированным РМЖ ($p < 0,04$).

Генотипические аллельные *BRCA*-варианты являются важными прогностическими факторами при РМЖ. Достоверно более высокие показатели общей 1-, 3- и 5-летней выживаемости отмечаются у носительниц гаплотипа В в гене *BRCA1* и миссенс-варианта N372H в гене *BRCA2*, а показатели 10-летней общей выживаемости определяют более благоприятный прогноз таких пациентов по сравнению с носителями делеционных *BRCA*-мутаций ($p = 0,02$).

Репродуктивное здоровье в группах генетического риска

Ранние роды, которые являются общепризнанным фактором защиты от возникновения РМЖ, не оказы-

вают защитного действия у носителей *BRCA*-мутаций. Н. Jernstrom et al., анализируя связь доношенной беременности, числа родов и риска РМЖ в молодом возрасте, показали, что рожавшие женщины — носительницы *BRCA*-мутаций существенно чаще — в 1,7 раза — заболевают РМЖ в возрасте до 40 лет по сравнению с нерожавшими [54]. Каждая последующая беременность у них связана с возрастанием риска развития РМЖ независимо от временного промежутка между родами. Т. Rebbeck et al., не ограничивая выборку по возрасту, выявили более высокий риск развития РМЖ у носительниц *BRCA*-мутаций которые не имели детей или родили первого ребенка после 30 лет, по сравнению с пациентками, родившими в более молодом возрасте. В этой выборке 82,6 % составили носители мутаций гена *BRCA1* [55]. В исландском исследовании, объединившем только рожавших женщин — носительниц основополагающей мутации 999del5 *BRCA2*, подтверждено, что каждая последующая беременность и роды повышали риск развития РМЖ [56]. Однако аналогичное популяционное исследование у носителей “founder mutation” *BRCA1*185delAG, 5382insC и *BRCA2* 6174delT показало, что беременность по сравнению с бездетностью ассоциирована с отсрочкой начала болезни, а грудное вскармливание в течение года и более снижает риск развития РМЖ у носителей мутаций на 40 % [57].

Интересные результаты получены в международном многоцентровом исследовании, включившем 1260 носительниц *BRCA*-мутаций, где показано, что у женщин с патологическим *BRCA1*-генотипом, родивших 4 и более детей, риск РМЖ снижается на 38 % по сравнению с женщинами, не имевшими беременности. В то же время у носительниц мутаций гена *BRCA2*, родивших 2 и более детей, риск заболеть РМЖ повышен на 50 % по сравнению с бездетными. При этом риск развития заболевания возрастает на 17 % с каждой последующей беременностью и сохраняется на уровне 70 % в течение 2 лет после родов [58]. Исследования последних лет показали, что частота РМЖ, развившегося на фоне беременности и лактации, выше среди пациенток с наследственной предрасположенностью.

В работе, выполненной в РОНЦ им. Н.Н. Блохина, изучен вклад молекулярно-генетических факторов в развитие и патогенез РМЖ, диагностированного на фоне беременности у 80 пациенток из семейного госпитального регистра и у 75 больных РМЖ молодого возраста (до 36 лет). Мутации гена *BRCA1* выявлены у 17,5 % беременных больных РМЖ, тогда как в контрольной группе «молодого» спорадического РМЖ мутации обнаружены лишь в 8 % случаев.

Медико-генетическое консультирование при наследственной предрасположенности к раку молочной железы

Критерии включения в группы риска с последующим генетическим тестированием с целью подтверж-

дения или исключения наследственной предрасположенности к РМЖ и/или РЯ не являются общепринятыми и варьируют в разных странах. После анализа соответствующих национальных руководств и рекомендаций, применяемых в странах Европы (Великобритания, Франция, Нидерланды, Германия) [53] и США [59], можно выделить следующие общие моменты:

1) генетическое тестирование осуществляется в рамках медико-генетического консультирования сертифицированными специалистами-генетиками, первым объектом для тестирования является больной РМЖ и/или РЯ (если доступен биологический материал);

2) основным критерием направления на генетическое тестирование является онкологически отягощенный семейный анамнез по РМЖ и/или РЯ (учитываются количество и степень родства заболевших родственников, возраст постановки диагноза, двустороннее поражение и первично-множественные злокачественные опухоли);

3) показаниями для генетического тестирования пациента являются наличие в личном анамнезе: РЯ, РМЖ у женщин в возрасте до 35 лет, двустороннего РМЖ, РМЖ у мужчины, подтвержденное носительство мутаций у родственников.

В некоторых странах (США, Нидерланды) дополнительными критериями являются морфологические особенности РМЖ (трижды негативный рак, редкие гистологические варианты), синдромальная патология, а также этническая принадлежность (ашкеназские евреи) [53, 59].

Дополнительно могут использоваться различные модели для оценки вероятности носительства мутации в генах *BRCA1* или *BRCA2* (BRCARPO, Myriad II, BOADICEA, Manchester score, Penn II и др.), основанные на семейном онкологическом анамнезе (РМЖ, РЯ, иногда злокачественные новообразования других локализаций).

Классическим примером наследственного BRCA-ассоциированного РМЖ служит родословная семьи, находящейся под наблюдением в медико-генетическом кабинете научно-консультативного отделения НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина (рис. 4).

Методы профилактики наследственного рака молочной железы

В связи с развитием за последние 15 лет генетического тестирования, позволяющего идентифицировать пациентов с предрасположенностью к развитию РМЖ и/или РЯ, на первый план выходит необходимость проведения профилактических мероприятий в группах онкологического риска. Вариантами первичной профилактики рака для женщин из группы высокого генетического риска являются лекарственная профилактика с использованием тамоксифена или его аналогов, превентивные операции — профилактическая мастэктомия или профилактическая овариэктомия.

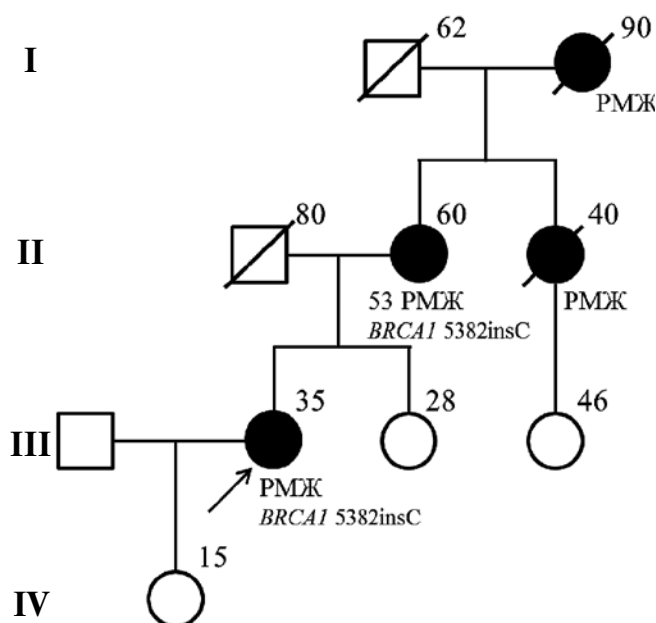


Рис. 4. Пример родословной семьи с наследственным *BRCA1*-ассоциированным РМЖ

Мировой опыт представлен крупными исследованиями, касающимися снижения риска развития рака контралатеральной молочной железы при использовании тамоксифена. Так, S. Narod et al. (2000) проводили наблюдение в группе из 593 женщин с мутациями генов *BRCA1* и *BRCA2*. Исследователи отметили, что у пациенток, которые принимали тамоксифен в течение 2–4 лет, риск метакронного РМЖ снижался до 75 % [60]. В 2006 г. опубликовано обновленное исследование «случай—контроль» с включением 285 больных билатеральным РМЖ и 751 женщины с односторонним РМЖ с мутациями *BRCA*. Прием тамоксифена был ассоциирован со снижением риска рака контралатеральной молочной железы на 50 % у носителей мутаций *BRCA1* и на 58 % у носителей мутаций *BRCA2*. Защитный эффект тамоксифена не наблюдался у женщин, перенесших овариэктомию [61].

В качестве меры профилактики развития РМЖ может быть использована и овариэктомия. Так, в проспективном мультицентровом исследовании с включением 1079 женщин выполнение овариэктомии было связано с сокращением риска развития РМЖ и среди носителей мутаций *BRCA1*, и среди носителей мутаций *BRCA2*, но во второй группе оказалось более выраженным (отношение рисков 0,28; 95 % доверительный интервал 0,08–0,92) [62].

T. Rebbeck et al. в 2009 г. провели метаанализ 10 исследований, в которых сообщалось о превентивной овариэктомии среди носителей мутаций *BRCA1* и *BRCA2*. Авторы подтвердили, что выполнение профилактической овариэктомии связано с существенным сокращением риска развития РМЖ (на 51 % в целом) [63]. Сходные результаты получены и в исследовании K. Metcalfe et al. (2011), включавшем 810 женщин

с мутациями *BRCA*, где убедительно продемонстрировано, что выполнение овариэктомии снижает риск развития рака контралатеральной молочной железы на 52 % ($p = 0,002$) [64].

Тем не менее на сегодняшний день самым эффективным методом первичной профилактики РМЖ является профилактическая мастэктомия.

Наиболее масштабные исследования по оценке эффективности профилактических мастэктомий выполнены в Mayo Clinic (США), где подобные операции выполняются с 1960 г. L. Hartmann et al. (1999) опубликовали результаты наблюдения 639 женщин с семейной историей заболевания, которым были выполнены двусторонние профилактические мастэктомии. Пациентки были поделены на 2 группы — высокого риска (один или более больных РМЖ родственников, ранний возраст манифестации заболевания, семейная история РЯ, двустороннего РМЖ или РМЖ у мужчин) и среднего (остальные женщины с отягощенным РМЖ семейным анамнезом). В качестве контрольной группы исследовались сестры пациенток группы высокого риска. Медиана периода наблюдения составила 14 лет. Снижение риска развития болезни при двусторонней профилактической мастэктомии в группе со средним риском (расчет производился с использованием модели Гейла) составило 89,5 % ($p < 0,001$), в группе с высоким риском — 90–94 %. Средний возраст пациенток на момент выполнения операции составил 42 года [65].

Исследовательская группа PROSE (Prevention and Observation of Surgical End Points) из США также оце-

нивала риск развития рака после профилактической мастэктомии. Сравнивалось число случаев развития РМЖ между группой 105 носителей мутаций *BRCA1* или *BRCA2*, перенесших превентивную двустороннюю мастэктомию, и группой 378 носителей мутаций, подвергшихся наблюдению. РМЖ в 1-й группе был диагностирован в 2 случаях (1,9 %), во 2-й — у 184 женщин (48,7 %) при медиане наблюдения 6,4 года. Таким образом, билатеральная профилактическая мастэктомия сократила риск развития болезни приблизительно на 90 % [66].

В литературе представлено большое количество исследований, свидетельствующих о сокращении риска развития метакронного РМЖ при выполнении мастэктомии с профилактической целью. Так, в работе S. McDonnell et al. (2001) из Mayo Clinic эффективность контралатеральной профилактической мастэктомии у 388 больных РМЖ репродуктивного возраста (моложе 50 лет) из семей, в которых наблюдался РМЖ и/или РЯ, оценена в 94,4 %. При этом у 357 больных в менопаузе (старше 50 лет) снижение риска развития болезни составило 96,0 % [67].

Опубликованные в 2009 г. данные 10 европейских центров по наблюдению 550 женщин, перенесших профилактические мастэктомии, также подтверждают высокую эффективность подобных операций [68]. Вероятность развития РМЖ после контралатеральной профилактической мастэктомии, по данным различных исследований, составляет от 0,4 % [69] и 0,5 % (медиана наблюдения 17,3 года) [70, 71] до 1,1 % случаев (медиана наблюдения 10 лет) [67].

ЛИТЕРАТУРА

- Lynch H.T., Snyder C., Lynch J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann Surg Oncol* 2012;19(6):1723–31.
- van der Groep P., van der Wall E., van Diest P.J. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)* 2011;34(2):71–88.
- Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. В кн.: Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Медицина, 2004. С. 125–56. [Kopnin B.P. Tumor suppressors and mutator genes. In: *Carcinogenesis*. D.G. Zaridze (ed.). Moscow: Medicine, 2004. Pp. 125–56. (In Russ.)]
- Имянитов Е.Н. Молекулярная диагностика в онкологии. Молекулярная биология 2008;42(5):772–85. [Imyanitov E.N. *Molecular diagnostics in oncology*. *Molekulyarnaya biologiya* = *Molecular Biology* 2008;42(5):772–85. (In Russ.)]
- Balmana J., Diez O., Rubio I.T. et al. ESMO Clinical Practice Guidelines on BRCA in breast cancer includes chapters on referral for BRCA testing, mutation detection, risk reduction options, breast cancer risk modifiers, and breast cancer treatment in BRCA carriers. *Ann Oncol* 2011; 22 Suppl 6: vi31–4.
- Walsh T., Casadei S., Coats K.H. et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 2006;295(12):1379–88.
- Deng C.X., Wang R.H. Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 1:R113–23.
- Sankaran S., Starita L.M., Simons A.M. et al. Identification of domains of BRCA1 critical for the ubiquitin-dependent inhibition of centrosome function. *Cancer Res* 2006;66(8):4100–7.
- Turner N., Tutt A., Ashworth A. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumors. *Nat Rev Cancer* 2004;4(10):814–9.
- Prat J., Ribé A., Gallardo A. Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol* 2005;36(8): 861–70.
- Артамонов В.В., Михайленко Д.С., Любченко Л.Н. и др. Системы ДНК-маркеров для проспективной диагностики высокого риска развития рака молочной железы. В кн.: Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. Под ред. М.А. Пальцева, Д.В. Залетаева. М.: Медицина, 2009. С. 318–48. [Artamonov V.V., Mikhailenko D.S., Lyubchenko L.N. et al. DNA markers systems for prospective diagnostics of high risk of breast cancer development. In: *Systems of genetic and epigenetic markers in diagnostics of cancer*. M.A. Paltsev, D.V. Zaletayev (eds.). Moscow: Medicine, 2009. Pp. 318–48. (In Russ.)]
- Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S. et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003;72(5): 1117–30.
- Ford D., Easton D.F., Bishop D.T. et al. Risks of cancer in BRCA1 mutation carriers. *Breast Cancer Linkage Consortium*. *Lancet* 1994;343(8899):692–5.
- Ford D., Easton D.F., Stratton M. et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *The Breast Cancer*

- Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998;62(3):676–89.
15. Adami H.O., Bergström R., Hansen J. Age at first primary as a determinant of the incidence of bilateral breast cancer. Cumulative and relative risks in a population-based case-control study. *Cancer* 1985;55(3):643–7.
 16. Broët P., de la Rochefordière A., Scholl S.M. et al. Contralateral breast cancer: annual incidence and risk parameters. *J Clin Oncol* 1995;13(7):1578–83.
 17. Verhoog L.C., Brekelmans C.T., Seynaeve C. et al. Contralateral breast cancer risk is influenced by the age at onset in BRCA1-associated breast cancer. *Br J Cancer* 2000;83(3):384–6.
 18. Robson M., Levin D., Federici M. et al. Breast conservation therapy for invasive breast cancer in Ashkenazi women with BRCA gene founder mutations. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(24):2112–7.
 19. Pierce L.J., Strawderman M., Narod S.A. et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving treatment in women with breast cancer and germline BRCA1/2 mutations. *J Clin Oncol* 2000;18(19):3360–9.
 20. Chappuis P.O., Kapusta L., Bégin L.R. et al. Germline BRCA1/2 mutations and p27(Kip1) protein levels independently predict outcome after breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(24):4045–52.
 21. Graeser M.K., Engel C., Rhiem K. et al. Contralateral breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2009;27(35):5887–92.
 22. Begg C.B., Haile R.W., Borg A. et al. Variation of breast cancer risk among BRCA1/2 carriers. *JAMA* 2008;299(2):194–201.
 23. Любченко Л.Н. Наследственный рак молочной железы и/или яичников: ДНК-диагностика, индивидуальный прогноз, лечение и профилактика. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2009. 238 с. [Lyubchenko L.N. Hereditary breast cancer and/or ovarian cancer: DNA diagnostics, individual prediction, therapy, and prevention. Thesis ... of MD. Moscow, 2009. 238 p. (In Russ.)]
 24. Thorlacius S., Sigurdsson S., Bjarnadottir H. et al. Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. *Am J Hum Genet* 1997;60(5):1079–84.
 25. Brose M.S., Rebbeck T.R., Calzone K.A. et al. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(18):1365–72.
 26. Friedman L.S., Gayther S.A., Kurosaki T. et al. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. *Am J Hum Genet* 1997;60(2):313–9.
 27. Haraldsson K., Loman N., Zhang Q.X. et al. BRCA2 germ-line mutations are frequent in male breast cancer patients without a family history of the disease. *Cancer Res* 1998;58(7):1367–71.
 28. Csokay B., Udvarhelyi N., Sulyok Z. et al. High frequency of germ-line BRCA2 mutations among Hungarian male breast cancer patients without family history. *Cancer Res* 1999;59(5):995–8.
 29. Sverdlov R.S., Barshack I., Bar Sade R.B. et al. Genetic analyses of male breast cancer in Israel. *Genet Test* 2000;4(3):313–7.
 30. Kwiatkowska E., Teresiak M., Lamperska K.M. et al. BRCA2 germline mutations in male breast cancer patients in the Polish population. *Hum Mutat* 2001;17(1):73.
 31. Basham V.M., Lipscombe J.M., Ward J.M. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002;4(1):R2.
 32. Frank T.S., Deffenbaugh A.M., Reid J.E. et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 2002;20(6):1480–90.
 33. Ottini L., Masala G., D'Amico C. et al. BRCA1 and BRCA2 mutation status and tumor characteristics in male breast cancer: a population-based study in Italy. *Cancer Res* 2003;63(2):342–7.
 34. Ottini L., Silvestri V., Rizzolo P. et al. Clinical and pathologic characteristics of BRCA-positive and BRCA-negative male breast cancer patients: results from a collaborative multicenter study in Italy. *Breast Cancer Res Treat* 2012;134(1):411–8. doi: 10.1007/s10549-012-2062-0.
 35. Boyd J., Rhei E., Federici M.G. et al. Male breast cancer in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53(1):87–91.
 36. Szabo C.I., King M.C. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1997;60(5):1013–20.
 37. Грудина Н.А., Голубков В.И., Тихомирова О.С. и др. Преобладание широко распространенных мутаций в гене BRCA1 у больных семейными формами рака молочной железы Санкт-Петербурга. *Генетика* 2005;41(3):405–10. [Grudinina N.A., Golubkov V.I., Tikhomirova O.S. et al. Predominance of frequently met mutations in the BRCA1 gene in patients with familial breast cancer in St. Petersburg. *Genetika = Genetics* 2005;41(3):405–10. (In Russ.)]
 38. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О. и др. BRCA1 и BRCA2 мутации у больных раком молочной железы в сибирском регионе. *Сибирский онкологический журнал* 2010;5:32–5. [Chasovnikova O.B., Mitrofanov D.V., Demchenko D.O. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in patients with breast cancer in the Siberian region. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Oncological Journal* 2010;5:32–5. (In Russ.)]
 39. Loginova A.N., Pospekhova N.I., Lyubchenko L.N. et al. Spectrum of mutations in BRCA1 gene in hereditary forms of breast and ovarian cancer in Russian families. *Bull Exp Biol Med* 2003;136(3):276–8.
 40. Батенева Е.И., Мещеряков А.А., Любченко Л.Н. и др. Частота одиннадцати мутаций генов BRCA1 и BRCA2 в неотобранной выборке больных раком молочной железы россиянок. *Уральский медицинский журнал* 2011;3:69–73. [Bateneva E.I., Meshcheryakov A.A., Lyubchenko L.N. et al. Frequency of eleven mutations of genes BRCA1 and BRCA2 in the non-selected sample population of Russian patients with breast cancer. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal = Urals Medical Journal* 2011;3:69–73. (In Russ.)]
 41. Gayther S.A., Harrington P., Russell P. et al. Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia. *Am J Hum Genet* 1997;60(5):1239–42.
 42. Федорова О.Е., Любченко Л.Н., Паяниди Ю.Г. и др. Использование биочипов при изучении распространенных мутаций в генах BRCA1/2 и CHEK2 у больных органоспецифическим раком яичников и первично-множественными злокачественными новообразованиями с поражением яичников (российская популяция). *Молекулярная биология* 2007;41:37–42. [Fedorova O.E., Lyubchenko L.N., Payanidi Yu.G. et al. Use of gene arrays in the study of common mutations in genes BRCA1/2 and CHEK2 in patients with organ-specific ovarian cancer and primary multiple malignant neoplasms with lesions of the ovaries (Russian population). *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2007;41:37–42. (In Russ.)]
 43. Iyevleva A.G., Susptitsin E.N., Kroeze K. et al. Non-founder BRCA1 mutations in Russian breast cancer patients. *Cancer Lett* 2010;298(2):258–63.
 44. Chenevix-Trench G., Milne R.L., Antoniou A.C. An international initiative to identify genetic modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2 (CIMBA). *Breast Cancer Res* 2007;9(2):104–9.
 45. Johnson N., Fletcher O., Palles C. et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 2007;16(9):1051–7.
 46. Baynes C., Healey C.S., Pooley K.A. et al.; SEARCH breast cancer study. Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 2007;9(2):R27.
 47. Easton D.F., Pooley K.A., Dunning A.M. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007;447(7148):1087–93.

48. Карпукhin A. В., Логинова A. Н., Хомич E. Н., Поспехова Н. И. Наследственная предрасположенность к раку молочной железы. Медицинская генетика 2002;1(6):254–61. [Karpukhin A. V., Loginova A. N., Khomich E. N., Pospekhova N. I. Hereditary predisposition to breast cancer. Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2002; 1 (6):254–261. (In Russ.)]
49. Palli D., Falchetti M., Masala G. et al. Association between the BRCA2 N372H variant and male breast cancer risk: a population-based case-control study in Tuscany, Central Italy. BMC Cancer 2007;7:170.
50. Auranen A., Spurdle A. B., Chen X. BRCA2 Arg372 His polymorphism and epithelial ovarian cancer risk. Int J Cancer 2003;103(3):427–30.
51. Healey C. S., Dunning A. M., Teare M. D. et al. A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability. Nat Genet 2000;26(3):362–4.
52. Hughe D., Ginolthac S., Coupret A. Common BRCA2 variants and modification of breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;14(1):265–7.
53. Сытенкова К. В. Клинические особенности различных генотипических вариантов при наследственном и sporadическом раке молочной железы. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2012. [Sytenkova C. V. Clinical peculiarities of different genetic type variants of hereditary and sporadic breast cancer: Thesis ... of candidate of medical sciences. Moscow, 2012. (In Russ.)]
54. Jernstrom H., Lerman C., Ghadirian P. et al. Pregnancy and risk of early onset breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2. Lancet 1999;354(9193):1846–50.
55. Rebbeck T. R., Wang Y., Kantoff P. W. et al. Modification of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer risk by AIB1 genotype and reproductive history. Cancer Res 2001;61(14):5420–4.
56. Tryggvadottir L., Olafsdottir E., Gudlaugsdottir S. et al. BRCA2 mutation carriers, reproductive factors and breast cancer risk. Breast Cancer Res 2003;5(5):R121–8.
57. King M. C., Marks J. H., Mandell J. B.; New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science 2003;302(5645):643–6.
58. McLaughlin J. R., Risch H. A., Lubinski J. et al.; Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. Reproductive risk factors for ovarian cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: a case-control study. Lancet Oncol 2007;8(1):26–34.
59. National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. Version 1. 2012. URL: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
60. Narod S. A., Brunet J. S., Ghadirian P. et al. Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. Lancet 2000;356(9245):1876–81.
61. Gronwald J., Tung N., Foulkes W. D. et al. Tamoxifen and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers: an update. Int J Cancer 2006;118(9):2281–4.
62. Kauff N. D., Domchek S. M., Friebel T. M. et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study. J Clin Oncol 2008;26(8):1331–7.
63. Rebbeck T. R., Kauff N. D., Domchek S. M. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst 2009;101(2):80–7.
64. Metcalfe K., Gershman S., Lynch H. T. et al. Predictors of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Br J Cancer 2011;104(9):1384–92.
65. Hartmann L. C., Schaid D. J., Woods J. E. et al. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. N Engl J Med 1999;340(2):77–84.
66. Rebbeck T. R., Friebel T., Lynch H. T. et al. Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. J Clin Oncol 2004;22(6):1055–62.
67. McDonnell S. K., Schaid D. J., Myers J. L. et al. Efficacy of contralateral prophylactic mastectomy in women with a personal and family history of breast cancer. J Clin Oncol 2001;19(19):3938–43.
68. Evans D. G., Baildam A. D., Anderson E. et al. Risk reducing mastectomy: outcomes in 10 European centres. J Med Genet 2009;46(4):254–8.
69. Goldflam K., Hunt K. K., Gershenwald J. E. et al. Contralateral prophylactic mastectomy. Predictors of significant histologic findings. Cancer 2004;101(9):1977–86.
70. Boughey J. C., Hoskin T. L., Degnim A. C. et al. Contralateral prophylactic mastectomy is associated with a survival advantage in high-risk women with a personal history of breast cancer. Ann Surg Oncol 2010;17(10):2702–9.
71. Herrinton L. J., Barlow W. E., Yu O. et al. Efficacy of prophylactic mastectomy in women with unilateral breast cancer: a cancer research network project. J Clin Oncol 2005;23(19):4275–86.

Генетические особенности и маркеры меланомы кожи

Н.Н. Мазуренко

НИИ канцерогенеза ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталья Николаевна Мазуренко npmazurenko@mail.ru

Меланома — наиболее опасное злокачественное заболевание кожи человека с высоким риском метастазирования. Метастазирующая меланома прогностически крайне неблагоприятна и резистентна ко всем видам традиционной химиотерапии и биологическим препаратам. В последнее время достигнуты значительные успехи в понимании патогенеза и лечении меланомы. В развитие меланомы вовлечены как внешние (ультрафиолетовое облучение), так и внутренние (наследственные генетические) факторы. В 5–14 % случаев меланома кожи является наследственным заболеванием, обусловленным изменениями в генах предрасположенности. Факторами риска развития семейной меланомы являются герминальные мутации в генах регуляции клеточного цикла *CDKN2A* и *CDK4*, гене гомеостаза меланоцитов *MITF*, а также однонуклеотидные полиморфизмы ряда низкопенетрантных генов, в частности гена *MC1R*. В патогенез меланомы вовлечены онкогены и гены-супрессоры, входящие в состав различных сигнальных каскадов. В 75 % случаев меланомы кожи наблюдается гиперактивация сигнального пути *RAS/RAF/MEK/ERK*. Важнейшим генетическим событием в меланоме является активация сигнального пути *PI3K–AKT–mTOR*, причем уровень активации повышается с увеличением стадийности меланомы. Меланома представляет собой генетически и фенотипически гетерогенную группу опухолей. Спектр хромосомных нарушений и активирующих мутаций, формирующих различные молекулярные портреты опухоли, отличается в меланоме различной локализации. В меланоме поверхности кожи доминируют мутации в генах *BRAF* (50 %), *NRAS* (20 %), причем мутации *NRAS* характерны для опухолей на участках кожи, подверженных инсоляции. Активирующие мутации *KIT* выявляют в 20–30 % случаев меланомы акральной или мукозальной локализации, а также в меланоме, возникшей в результате ультрафиолетового повреждения кожи. В 25 % случаев меланома кожи развивается из предсуществующего невуса, в обзоре обсуждаются молекулярные механизмы малигнизации невусов. Использование полноэкзомного секвенирования меланомы позволило обнаружить новые гены, нарушения в которых связаны с повреждающим действием ультрафиолета: *PPP6C*, *RAC1*, *SNX31*, *TACC1* и *STK19*. Успехи в изучении меланомы привели к положительным результатам в ее лечении, особенно с помощью таргетной терапии. В обзоре рассмотрены молекулярные мишени и перспективы таргетной терапии метастатической меланомы кожи.

Ключевые слова: меланома кожи, акральная, мукозальная, метастазирующая меланома, наследственные факторы риска меланомы, гены *MC1R*, *CDKN2A*, *CDK4*, *MITF*, мутации генов *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, гены *PPP6C*, *RAC1*, *TACC1*, малигнизация невусов, таргетная терапия меланомы

Genetic alterations and markers of melanoma

N.N. Mazurenko

Scientific Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24

Melanoma remains the most deadly form of malignant skin disease with high risk of metastases. Metastatic melanoma is prognostic highly unfavorable and resistant to traditional chemotherapy and biologic treatment. There is a great progress in understanding of the molecular mechanisms underlying melanoma initiation and progression. The external (ultraviolet irradiation) and internal (genetic) factors are involved in melanoma genesis. 5–14 % of melanoma cases occur in familial context due to genetic predisposition risk factors. Among them rare germinal mutations in the cell cycle genes regulators *CDKN2A* and *CDK4* and in the master gene of melanocyte homeostasis *MITF*, as well as single nucleotide polymorphisms of several low-penetrated genes, namely *MC1R*, have been identified. The main cell signaling pathways and oncogene driver mutations are involved in melanoma pathogenesis. *RAS/RAF/MEK/ERK* cascade is hyperactivated in 75 % of cutaneous melanoma cases. Activation of *PI3K/AKT/mTOR* signaling pathway is important for melanoma progression. Recent studies revealed that melanomas are genetically and phenotypically heterogeneous tumors. Spectrum of chromosomal alterations and activating mutations corresponding to tumor molecular portraits varies in melanomas of different location. Most of cutaneous melanomas contain *BRAF* (50 %) or *NRAS* (20 %) mutations, and *NRAS* mutations occur on chronically sun-exposed skin. Activating *KIT* mutations have been reported in approximately 20–30 % of certain subtypes of melanoma, including acral and mucosal, and melanoma that develop on photodamaged skin. Cutaneous metastatic melanoma derive from preexisting nevi in 25 % of cases, molecular mechanisms of nevi malignization are discussed. Deepsequencing approaches of melanoma samples of different melanoma types highlighted new melanoma driver genes, that are damaged due to tumorigenic effects of ultraviolet: *PPP6C*, *RAC1*, *SNX31*, *TACC1* and *STK19*. The progress in melanoma studies allow to receive the positive results in melanoma treatment in particularly with targeted therapy. The molecular targets and future perspectives for targeted therapy of metastatic skin melanoma are discussed.

Key words: cutaneous melanoma, acral, mucosal, metastatic melanoma, genetic predisposition melanoma risk factors, genes *MC1R*, *CDKN2A*, *CDK4*, *MITF*, “driver” genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, genes *PPP6C*, *RAC1*, *TACC*, nevi malignization, melanoma targeted therapy

Меланома — наиболее опасное злокачественное заболевание кожи человека с высоким риском рецидивирования и метастазирования. Метастазирующая меланома прогностически крайне неблагоприятна и резистентна ко всем видам традиционной химиотерапии и биологическим препаратам, однако в последнее время улучшение результатов лечения стало возможным благодаря выявлению потенциальных онкогенов — мишеней таргетной терапии.

Заболеваемость меланомой составляет менее 2 % от общего числа онкозаболеваний: в 2012 г. в мире зарегистрировано 232 130 случаев меланомы и 14,1 млн вновь выявленных онкологических больных. Однако рост заболеваемости меланомой отмечен почти во всех странах мира и за 40 лет составил примерно 5 % в год [1]. По прогнозу Всемирной организации здравоохранения, заболеваемость меланомой в мире в течение ближайших 10 лет вырастет на 25 %.

В России в 2012 г. зарегистрировано 8723 новых случая меланомы при общем числе новых онкозаболеваний 525 931 [2]. С 2007 по 2012 г. в России прирост абсолютного числа заболевших меланомой составил 23,3 % у мужчин и 15,6 % у женщин. Заболеваемость меланомой в России (3,8 на 100 000 мужчин и 4,2 на 100 000 женщин) [2] и странах Восточной Европы (3 случая на 100 000 населения) ниже, чем в западноевропейских странах, США и Австралии (10–20, 20–30 и 54 случая на 100 000 населения соответственно) [3].

Составляя структурно не более 10 % злокачественных новообразований кожи, меланома ответственна за 80 % смертей от заболеваний этой группы [1]. В России в 2012 г. умерло от меланомы 3419 человек, что составляет 67 % от числа смертей от всех новообразований кожи, причем отмечен рост смертности мужчин при меланоме кожи на 5,9 % с 2007 по 2012 г. [2].

В 2013 г. в США заболело меланомой 76 690 человек и умерло 9480 [4]. В США смертность от меланомы занимает 5-е место у мужчин и 6-е у женщин среди пациентов с онкологическими заболеваниями, заболеваемость значительно выше у белого населения, чем у афроамериканцев [5]. В странах с высокой заболеваемостью меланома кожи — одна из самых частых злокачественных опухолей у молодых пациентов. Она является основной причиной смерти от злокачественных опухолей женщин в возрасте 25–30 лет в США и в возрасте 30–35 лет — в Австралии [4].

Развитие меланомы — сложный процесс, в который вовлечены различные факторы [6].

Эпидемиологические данные свидетельствуют, что ультрафиолетовое (УФ) облучение является главным внешним фактором, связанным с возникновением меланомы. Персональный риск развития меланомы удваивается при наличии пяти случаев солнечного ожога, особенно в детском и юношеском возрасте [3]. Хотя фактором риска для меланомы является инсоляция, меланома кожи чаще возникает на закрытых участках тела [6].

В 75 % случаев меланома кожи возникает из отдельных кожных меланоцитов, а в 25 % — из предсуществующих невусов [1]. Важным экзогенным фактором появления меланомы является травма пигментных невусов, часто одеждой или обувью.

Основные типы злокачественной меланомы кожи классифицируются в зависимости от локализации и прохождения определенной фазы роста [7].

Поверхностно-распространенная меланома составляет 80 % случаев меланомы кожи, характеризуется наличием микроинвазии, состоит из крупных эпителиоидных неопластических меланоцитов. Одинаково часто встречается у мужчин и женщин, чаще возникает на коже спины у мужчин и коже бедер и голени у женщин.

Злокачественное лентиго составляет 10–13 % случаев меланомы, представляет собой большое асимметричное пигментное поражение открытых частей кожи с увеличенным количеством атипичных меланоцитов в базальном слое эпидермиса, преимущественно локализуется на коже головы, шеи, тыльных частей конечностей.

Акрально-лентигинозная меланома составляет 8 % случаев меланомы, состоит из атипичных неопластических меланоцитов в базальном слое в акральном эпидермисе, встречается на стопе, ладонной поверхности кисти, под ногтями.

Лентигинозная меланома слизистых оболочек (мукозальная) составляет 1,2 % случаев меланомы, представлена опухолями синоназального тракта, гениталий женщин, аноректальной области. Крайне редко встречается меланома слизистых дыхательного и желудочно-кишечного трактов [8].

Узловая меланома встречается в 15–30 % всех случаев меланомы, возникает из эпидермальных меланоцитов в виде опухолевого узла в результате вертикального роста клеток в дерму, через все слои, и в подлежащую жировую клетчатку. Клинически имеет форму узла темно-синего или черного цвета, характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом.

Часто меланома является беспигментной (не содержит меланин), что затрудняет диагностику. Иногда клиническая картина обусловлена именно наличием метастазов, а первичную локализацию меланомы установить невозможно, поскольку первичная опухоль может подвергаться обратному развитию, вплоть до полного исчезновения. Меланома кожи метастазирует гематогенным и лимфогенным путем и инвазирует в кожу, регионарные лимфоузлы, подкожные ткани, легкие, печень, головной мозг и кости [9]. В США 10–15 % вновь выявленных случаев меланомы имеют метастазы [5], в России частота выявления меланомы на поздних стадиях в два раза выше (25 %).

Наследственные факторы возникновения меланомы

В 5–14 % случаев меланома кожи является наследственным заболеванием, обусловленным герми-

нальными мутациями в генах предрасположенности [10, 11]. Риск возникновения меланомы повышен в 8 раз в семьях, члены которых страдали меланомой. Риск развития второй первичной опухоли у пациентов с меланомой в 9 раз выше, чем в популяции [12].

Гены *CDKN2A* и *CDK4* ассоциированы с риском развития семейной меланомы. Ген-супрессор *CDKN2A* локализован на хромосоме 9p21 и кодирует белки p16^{INK4a} и p14^{ARF} [13]. Мутации гена *CDKN2A* обнаруживают в 20–40 % случаев семейной меланомы [14]. Мутации p16^{INK4a} являются причиной возникновения 1400–2800 новых случаев меланомы в США ежегодно [15], что составляет 2–4 % от числа заболевших [16]. Мутация *CDKN2A* (дупликация кодона R112), затрагивающая оба белка – p16^{INK4a} и p14^{ARF}, доминирует у носителей наследственной меланомы в шведских семьях, причем в 95 % случаев имеется мутация в 61-м кодоне гена *NRAS* [17]. Авторы считают, что мутация *CDKN2A* у носителей наследственной меланомы в шведских семьях связана с повышенным риском развития онкологических заболеваний у курильщиков [18]. Мутации p14^{ARF} приводят к недостатку p53, который контролирует целостность и репарацию ДНК [13].

Помимо наследственных мутаций в образцах меланомы встречаются соматические генетические и эпигенетические изменения *CDKN2A/p16^{INK4a}*. В 50 % случаев меланомы происходит инактивация p16^{INK4a} либо за счет мутации, либо за счет гиперметилирования промотора (10 % меланом). Инактивация p16^{INK4a} приводит к активации cyclin D/CDK4 и фосфорилированию pRB1, что ведет к активации клеточного цикла и пролиферации клеток [13]. Низкая экспрессия p16^{INK4a} коррелирует с прогрессией заболевания, усилением пролиферации и плохим прогнозом при спорадической меланоме.

Нарушения гена *CDK4* (кодирует циклинзависимую киназу CDK4, входящую в комплекс CDK4/6), так же как и нарушения гена *CDKN2A*, ведут к усилению риска развития меланомы кожи [14]. Наследственные активирующие мутации гена *CDK4* (R24C и R24H) делают комплекс CDK4/6 устойчивым к ингибированию p16^{INK4a}. Активирующие мутации *CDK* связаны с небольшим процентом случаев меланомы у детей. Амплификация *CDK4* больше характерна для акральной и мукозальной меланомы и не встречается в меланоме с гомозиготной потерей p16^{INK4a}.

Ген *CCND1* кодирует циклин D1, который в комплексе с CDK4/6 регулирует переход из фазы G1 клеточного цикла в S-фазу. Во всех случаях амплификации гена *CCND1* при меланоме наблюдается гиперэкспрессия белка и ген *CCND1* рассматривают в качестве онкогена. Амплификация *CCND1*, как и *CDK4*, характерна для акральной меланомы.

Алельные герминальные варианты генов *MC1R*, *ASIP*, *MTAP*, *MATP* и *Casp8* рассматривают как гены низкого риска или модификаторы генов высокого риска [19, 20].

Ген *MC1R* является важным фактором риска развития меланомы. Рецептор меланокортина 1 (MC1R) относится к трансмембранным G-белковым рецепторам и экспрессируется на поверхности эпидермальных меланоцитов. MC1R активирует аденилатциклазу и cAMP/PKA/CREB каскад через меланоцитстимулирующий гормон α -MSH и адренотропный гормон [21]. Потеря функций MC1R ответственна за определенный фенотип у представителей населения Северной Европы, главным образом у людей с рыжим цветом волос, светлой кожей, веснушками и плохой способностью к загару [22]. Генетические вариации (однонуклеотидные полиморфизмы, SNIP) локуса *MC1R* являются фактором риска развития меланомы. Наиболее частыми SNIP-вариантами являются V60L, D84E, R151C, R160W и R163Q. Наличие одной структурно-функциональной перестройки гена *MC1R* увеличивает риск развития меланомы в 2,2–4,8 раза [23]. Присутствие SNIP-варианта *MC1R* в дополнение к мутации *CDKN2A* значительно усиливает риск возникновения меланомы по сравнению с наличием только мутантного *CDKN2A*. Пациенты с вариантами *MC1R* имеют в 5–15 раз больший риск развития меланомы с мутацией *BRAF* независимо от УФ-инсоляции [20].

Ген *MITE*. Герминальные мутации важного гена гомеостаза меланоцитов *MITE* усиливают риск развития меланомы и рака почек. *MITE* регулирует гены, участвующие в пролиферации (*CDK2*), дифференцировке, выживании (*BCL2*, *BCL2A1*, *ML-IAP*, *MET*, *APE1* и *HIF1A*) и выработке пигмента. Часто в меланоме ген *MITE* амплифицирован либо мутирован [24]. *MITE* вовлечен в антиоксидантную защиту меланоцитов, и мутация E318K усиливает связывание *MITE* с промотором гена *HIF1A* [25]. Мутация также уменьшает сумоилирование белка *MITE*. Экспрессия мутантного *MITE* усиливает миграцию и инвазивные свойства клеток меланомы [26]. *MITE* является ценным диагностическим иммуногистохимическим маркером для обнаружения метастатической меланомы, негативной по другим маркерам [27]. Его специфичность зависит от типа меланомы, она ниже для веретенчатой и десмопластической меланомы [28].

Генетическая нестабильность и хромосомные нарушения в гистологических субтипах меланомы

Меланома кожи демонстрирует повышенный уровень мутаций по сравнению с другими солидными опухолями в основном за счет усиления транзиций цитозина на тимин (C > T), характерных для мутаций, вызванных УФ-облучением [29, 30]. При полногеномном секвенировании 105 образцов меланомы выявлено 86 813 кодирующих мутаций, что гораздо больше, чем при других опухолях. В 20 % опухолей мутировали 78 генов, при этом 85 % мутаций возникли за счет транзиции C > T, что указывает на эффект УФ-облучения [29, 31]. Однако эффект УФ на возникновение мутаций не однозначен, так как наиболее частые

мутации генов *BRAF* и *NRAS* не вызваны С > Т транзициями. Наблюдаемая негативная корреляция между экспрессией и частотой мутации гена подтверждает, что гены с низким уровнем экспрессии имеют тенденцию к повышенной скорости возникновения соматических мутаций [30, 32].

Молекулярный генетический анализ подтверждает гетерогенность меланомы наличием различных генетических нарушений в меланомах отдельных гистологических субтипов и локализаций. В образцах первичной меланомы с мутацией *BRAF* чаще выявляют потери на 10q23–26 и амплификацию ДНК на хромосоме 7 и 1q23–25 по сравнению со случаями меланомы с мутацией *NRAS*. Потери на 11q23–25 в основном присутствуют в образцах меланомы с мутацией *NRAS*. В образцах первичной меланомы с диким типом *BRAF* и *NRAS* чаще обнаруживают изменения на хромосомах 17 и 4 [33].

В образцах меланомы на участках кожи, облучаемых солнцем, часто выявляют потери хромосом 17p и 13q. При этом обнаружено значительно меньше мутаций в области гена *BRAF* по сравнению с меланомой, возникающей на коже в отсутствие постоянного воздействия солнца. Это подтверждает, что два наиболее распространенных типа меланомы различаются генетически и биологически.

Акральная и мукозальная меланомы имеют большее число генетических изменений, чем меланома кожи на участках, как подверженных, так и не подверженных инсоляции. Амплификации выявлены в 89 % случаев акральной и 85 % мукозальной меланомы, при этом вовлечены разные хромосомные районы [6].

В акральной меланоме существуют нарушения локусов 11q13, 22q11–13 и 5p15 и характерна точечная амплификация генов, которая возникает на самых ранних этапах опухолевой прогрессии. В частности, локус 11q13 содержит гены *CCND1*, *FGF3* и *FGF4*.

В мукозальной меланоме повышена частота мутаций *KIT* и снижена частота мутаций *BRAF* и *NRAS* по сравнению с меланомой кожи [34]. Для меланомы слизистой оболочки носа и околоносовых пазух по сравнению с другими субтипами меланомы в высоком проценте случаев обнаружено увеличение копий плеча 1q, а также амплификация 6p и 8q, причем мутации гена *BRAF* очень редки, что позволяет отличать этот тип меланомы от других.

Нарушения генов и сигнальных путей, ассоциированных с возникновением и прогрессией меланомы

Сигнальный путь RAS/RAF/MEK/ERK. В патогенез меланомы кожи вовлечены онкогены и гены-супрессоры, входящие в состав различных сигнальных каскадов. Основная роль принадлежит сигнальному пути RAS–MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) – ключевому регулятору клеточной пролиферации, дифференцировки, выживания и метастазирования, гиперактив-

ация которого наблюдается в 75 % случаев меланомы кожи [35, 36].

Ген *BRAF* (7q34) кодирует серин-треониновую киназу, мутации в активирующем домене которой вызывают стабильную каскадную гиперактивацию митоген-активированных протеинкиназ MEK и ERK [37]. Каталитические функции *BRAF* регулируются через димеризацию киназного домена, при этом активен только один из участников гомо- или гетеродимера. В качестве партнера при димеризации могут выступать белки CRAF, *BRAF* или RAF-родственные псевдокиназные репрессоры RAS [38].

Активирующие мутации *BRAF* обнаруживают в 50–60 % случаев меланомы кожи. В 80 % случаев выявляется нуклеотидная замена T1799A в 15-м экзоне *BRAF*, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в кодоне 600 (V600E) [39]. В 20 % случаев мутации кодона 600 представлены заменой V600K, редко встречаются замены V600R/D/M [37, 40]. Мутации в киназном домене приводят к конформационным изменениям и повышению активности киназы до 480 раз *in vitro* или 70–130 раз *in vivo* [41]. Мутантный белок *BRAF* способствует не только гиперактивации каскада MAPK, но и выживанию меланомы, регулируя экспрессию и функционирование проапоптотических и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 (BIM, BAD) и MCL-1. Миграция клеток меланомы и их инвазия также усиливаются при мутации V600E *BRAF*.

При других мутациях в 15-м экзоне (D594V, L597R/S/Q, K601) или 14-м экзоне (G464E, G466V, G469E/R/S) активность белка *BRAF* составляет лишь 30 % активности мутантного V600E *BRAF* [42].

Активирующие мутации *BRAF* находят в 59 % случаев меланомы кожи, не подверженной хроническому солнечному повреждению, тогда как при меланоме с хронической инсоляцией – в 11 %, при акральной меланоме – в 23 %, при меланоме слизистых оболочек – в 11 % случаев [43]. Примечательно, что мутации *BRAF* обнаруживают в 70 % случаев беспигментной меланомы, причем в 89 % из них опухоль имеет толщину менее 1 мм.

Новые мутантные продукты *BRAF* открыты с помощью секвенирования нового поколения: получены данные об образовании слитных белков в результате хромосомных транслокаций, включающих ген *BRAF*. Слитные химерные белки PAPSS1–*BRAF*, TRIM24–*BRAF* и др. содержат серин-треонинкиназный домен и обладают киназной активностью белка *BRAF*. Такие белки находят в 4–8 % меланом с ранее неизвестным «драйверным» геном (pan-negative). *BRAF*-химерные белки выявлены во многих опухолях: раке предстательной железы, желудка, астроцитоме, меланоме и др. Меланома с *BRAF*-химерными белками нечувствительна к ингибиторам *BRAF*, но чувствительна к ингибиторам MEK [44].

Ген *NRAS* является вторым геном, наиболее часто мутирующим в меланоме. Малый гуанозинтрифосфат-

связывающий (ГТФ-связывающий) белок *NRAS* является регулятором ответа на внеклеточные стимулы, включая ростовые факторы, и активирует основные сигнальные пути, включая *RAF*–*MEK*–*ERK*, *Ral*–*GDS*, *PI3K*–*AKT*–*mTOR* и *PLC*–*PKC* [45].

Мутации *NRAS* выявлены в 15–20 % случаев меланомы кожи [46]. Большинство мутаций *NRAS* (80 %) – замены в кодоне 61 экзона 3 (Q61K и Q61R), приводящие к образованию aberrантной формы белка, который не может гидролизовать *RAS*-ГТФ и остается гипер-активным [47]. Мутации во 2-м экзоне гена *NRAS* (чаще в кодоне G12, чем G13) находят на ранних стадиях заболевания, и поэтому считается, что они вовлечены в инициацию меланомы. Мутации в 3-м экзоне *NRAS* обнаруживают на более поздних этапах и, скорее всего, они участвуют в метастазировании меланомы [45].

Мутации *NRAS* чаще присутствуют в меланоме, связанной с хроническим солнечным повреждением [6]. Мутантный *NRAS* часто выявляют в мукозальной меланоме, особенно в синоназальной [48, 49]. В этой группе опухолей наблюдалась амплификация и повышенная экспрессия циклина D1 (62,5 %). В акральной и мукозальной меланомах с генами *BRAF* и *NRAS* дикого типа амплифицированы гены *CDK4* и *CCND1* (циклин D1).

Биологические последствия мутаций генов *BRAF* и *NRAS* отличаются, потому что при мутации *RAS* клетки используют скорее *CRAF* (*Raf-1*), чем *BRAF*, для активации пути *MEK*–*ERK* [50]. Поэтому *CRAF* может быть терапевтической мишенью в опухолях, в которых *RAS* является «драйвером».

Экспрессия мутантного *BRAF* недостаточна для трансформации иммортализованных меланоцитов человека [51], и поэтому мутантный V600E *BRAF* считается более слабым онкогеном, чем *NRAS* с мутацией в кодоне 61 [17]. Экспрессия мутантного *BRAF* в меланоцитах при экспрессии нормального p16^{INK4a} не ведет к пролиферации до тех пор, пока инактивация *CDKN2A* не нарушит регуляцию клеточного цикла [52]. Причем клетки с мутантным *BRAF* нуждаются в инактивации p16^{INK4a} в большей степени, чем клетки с мутантным *NRAS*.

Варианты меланомы с мутациями *BRAF* и *NRAS* отличаются по клиническому и патологическому поведению. Мутации *BRAF* ассоциированы с более ранней постановкой диагноза, чем *NRAS*. Пациенты с меланомой и мутациями *BRAF* значительно моложе (49,8 года), чем с мутациями *NRAS* (55,7 года) или диким типом (59,5 года), и это отличие статистически достоверно [40, 53]. Наличие мутаций гена *BRAF* ассоциировано с более частыми изъязвлениями, а также более частым развитием местных рецидивов и поражением регионарных лимфатических узлов, частота *BRAF*-мутаций выше у пациентов с выживаемостью менее 5 лет.

Меланома с мутацией *NRAS* отличается большей толщиной, чем опухоли с мутацией *BRAF* или диким

типом, что, по-видимому, связано с вертикальной фазой роста меланомы. Трансфекция *RAS* в клеточные линии меланомы с эпителиоидноклеточной морфологией усиливает продукцию протеазы и клеточную подвижность, черты, характерные для фазы вертикального роста меланомы [45]. Меланома с мутацией *NRAS* чаще имеет больший размер и более высокий митотический индекс и связана с низкой общей выживаемостью. Показано, что мутации *NRAS* являются независимым признаком более короткого периода выживания у пациентов с меланомой IV стадии [53].

Активация сигнального пути *PI3K*–*AKT*–*mTOR* является важнейшим генетическим событием в меланоме, причем уровень активности *AKT3* повышается с увеличением стадийности заболевания [54]. Активация серин-треониновой протеинкиназы *AKT3* отмечена в 60 % случаев спорадической меланомы, в 35 % случаев за счет амплификации гена *AKT3*, а в 5 % – за счет мутации гена *PI3KCA* [55]. Мутация *AKT3* E17K встречается в культурах клеток и первичной меланоме [56].

В 40–60 % случаев меланомы инактивирована фосфатаза *PTEN*, которая негативно регулирует *PI3K*–*AKT*-сигналинг [54]. *PTEN* почти всегда экспрессируется в цитоплазме доброкачественных и диспластических невусов [57], но отсутствует в большинстве образцов меланомы [58]. Утрата экспрессии *PTEN* происходит в результате мутации, потери гетерозиготности или утраты хромосомы, либо в результате эпигенетических нарушений транскрипции за счет метилирования или микроРНК-регуляции [59]. Утрата *PTEN* вследствие мутации наблюдается в 37 % случаев меланомы, причем не характерна для опухолей с мутацией *NRAS* [54].

Малигнизация невусов. Мутации *BRAF* и *NRAS* являются ранним событием и выявляются в доброкачественных меланоцитарных образованиях – невусах. Онкогенные мутации *BRAF* распространены в диспластических, конгенитальных, обычных и особенно в растущих невусах. Так, в 81 % конгенитальных меланоцитарных невусов находят мутации *NRAS* Q61K/R, а в 82 % приобретенных невусов выявляют мутацию *BRAF* V600E [60]. Мутации *NRAS* обнаруживают в 94,7 % случаев врожденных меланоцитарных невусов, которые характеризуются повышенным риском трансформации в меланому.

При использовании лазерной микродиссекции и антител к мутантному белку *BRAF* V600E мутации выявлены иммуногистохимически в 63 % случаев меланомы, в 65 % ассоциированных невусов и в 50 % контрольных невусов [61]. Считают, что диспластический, или атипический, невус является недостающим звеном между доброкачественным и злокачественным меланоцитарным поражением. С другой стороны, диспластические невусы десятилетиями остаются без изменений, и, по-видимому, для их малигнизации нужны дополнительные генетические нарушения [61].

Усиленная экспрессия онкогенных *NRAS* или *BRAF* в нормальных меланоцитах запускает фенотип сенесценции/апоптоза и арест пролиферации и недостаточна для трансформации меланоцитов.

Для прогрессирования невуса в меланому важна активация пути *PI3K*–*АКТ* [62]. Так, недостаток *PTEN* и/или усиление активации протеинкиназы *АКТ* снижает сенесценцию, вызываемую мутацией *BRAF* V600E в фибробластах и меланоцитах. Усиление активности *АКТ* наблюдается в 17 % доброкачественных невусов, в 43 % диспластических невусов, в 49 % образцов первичной меланомы и в 77 % – метастатической меланомы [63]. Мутации *NRAS* и пути *PI3K*–*АКТ* одновременно присутствуют в 9 % случаев меланомы, а мутации *BRAF* и *PTEN* – в 17 % [6]. Совместная кооперация *АКТ3* и *BRAF* V600E выявлена при трансформации мышинных меланоцитов *in vitro*, при этом *АКТ3* фосфорилирует *BRAF* V600E [62]. С другой стороны, белок *BRAF* с мутацией V600E является негативным регулятором *АКТ*-пути: присутствие мутации V600E снижает фосфорилирование *АКТ* и дальнейшую активацию передачи сигнала, подавляемую ингибиторами *MEK* или *mTOR* [62].

Ген *KIT*. Среди генов, которые активированы в меланоме, – ген *KIT*, частота мутаций которого колеблется от 2 до 45 %. Тирозинкиназный рецептор *KIT* фактора роста стволовых клеток (*SCF*) активирует несколько сигнальных путей, в том числе каскады *RAS*–*MAPK* и *PI3K*–*АКТ*, влияя на клеточный рост, пролиферацию, инвазию, метастазирование и ингибируя апоптоз. Рецептор *KIT* и его лиганд *SCF* играют ключевую роль в эмбриогенезе меланоцитов, их дифференцировке и пролиферации [1].

Рецептор *KIT* экспрессируется на ранних стадиях более чем в половине случаев меланомы [63]. Однако по мере прогрессирования меланомы, перехода в инвазивные стадии и метастазирование, экспрессия *KIT* утрачивается, что предполагает наличие у него неких супрессорных функций [64]. Действительно, трансфекция гена *KIT* в высокометастатическую линию меланомы A375SM ведет к уменьшению роста опухоли и метастазов при введении этих клеток мышам. Введение лиганда *SCF* приводит к высокому уровню апоптоза в *KIT*-позитивной линии клеток меланомы. Другие работы показали, что потеря экспрессии *KIT* коррелирует со злокачественной трансформацией меланоцитов, инвазией и метастазированием. В небольшом проценте образцов меланомы кожи с диким типом *BRAF* и *NRAS* выявлены опухоли с гиперэкспрессией *KIT* и *CDK4* [65].

Мутации *KIT* наиболее часто выявляют в меланоме участков кожи, подверженных хроническому УФ-облучению. Мутации *KIT* не встречаются одновременно с мутациями *NRAS* и *BRAF*. Активация *KIT* за счет мутации имеет место только в 2–6 % случаев поверхностной меланомы кожи, но мутации и амплификацию *KIT* выявляют с частотой 23–36 % при ак-

ральной, 15–39 % – при мукозальной и 28 % – при вызванной инсоляцией меланоме [66, 67]. Мутации гена *KIT* являются специфичными для мукозальной и акральной меланом, которые наиболее распространены в азиатской популяции [68]. Мутации *KIT* чаще встречаются в мукозальной меланоме гениталий и аноректальной области [66, 69], тогда как в синоназальной меланоме преобладают мутации *NRAS* [48, 49].

Большинство мутаций *KIT* представлено точечными заменами в экзоне 11, кодирующем регуляторный подмембранный домен рецептора: K558R, T574A, L576P и V559A. Такие мутации обеспечивают чувствительность опухолевых клеток к ингибитору тирозинкиназ иматинибу. Реже встречаются замены в 17-м (N822K) и 13-м (N655K) экзонах, при которых опухоли устойчивы к иматинибу [68, 70]. Имеются данные, что в меланоме встречаются также мутации в 9-м и 18-м экзонах *KIT* [16], в частности, в акральной меланоме выявлена новая мутация N505I в 9-м экзоне, повышающая чувствительность к иматинибу [71].

Нами проведен анализ мутаций генов *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *PDGFRA* в 116 образцах меланомы, в том числе в 99 случаях – локализованной на поверхности кожи, в 8 – акральной и в 9 – мукозальной [72, 73]. Мутации *BRAF* выявлены в 56 % случаев меланомы поверхности кожи, помимо мутации V600E *BRAF* (93 %) обнаружены замены V600K (5 %), K601E и I592M. Мутации гена *NRAS* (Q61R/K) выявлены в 9,5 % случаев меланомы поверхности кожи. Мутации *BRAF* и *NRAS* обнаружены в 2 из 8 случаев акральной меланомы (по 25 % каждая) и в 1 из 9 случаев мукозальной меланомы (по 11 % каждая). Средний возраст пациентов с мутацией *BRAF* был достоверно ниже (51,6 года), чем с мутацией *NRAS* (64,6 года). Активирующие мутации *KIT* выявлены в 1 % меланомы кожи и 33 % случаев мукозальной меланомы. Все мутации представляли собой точечные замены в 11-м экзоне: L576P, V599A, Q556H. В акральной меланоме мутации *KIT* не обнаружены, что необычно и, возможно, связано с малой выборкой. В 2 случаях эпителиоидной беспигментной акральной и мукозальной меланомы впервые обнаружена silent-мутация гена *PDGFRA* V824V [72, 73].

Появились данные, что редкие SNIP гена *KIT*, в частности rs2237028, могут предрасполагать к развитию меланомы. Авторы предполагают, что 6 вариантов замен в гене *KIT* могут быть ответственны за развитие невуса и меланомы [74].

Ген *p53*. Анализ гена *p53* в меланоме выявил низкую частоту мутаций (0–10 %) или потери гетерозиготности, причем значительная часть мутаций *p53* возникает в результате УФ-облучения. Анализ экспрессии белка *p53* показал, что интенсивность окрашивания и число позитивных клеток в опухоли увеличиваются с прогрессией заболевания. Позитивными по *p53* являются 33 % невусов, 35 % случаев первичной меланомы и 70 % – метастатической меланомы [75]. Стабильный уровень белка *p53* дикого типа связан с длительным

безрецидивным периодом и более высокой выживаемостью.

Другие генетические нарушения. Использование полноэкзомного секвенирования меланомы позволило помимо «драйверных» генов: *BRAF*, *NRAS*, *PTEN*, *TP53*, *CDKN2A/p16^{INK4a}* и *MAP2K1* обнаружить новые гены, нарушения в которых связаны с повреждающим действием УФ и являются статистически значимыми: *PPP6C*, *RAC1*, *SNX31*, *TACC1* и *STK19* [31, 76, 77]. Большинство генов вовлечено в RAS- и PI3K-сигнальные пути.

Мутации гена *RAC1*, кодирующего RAS-родственный белок Rho — суперсемейства ГТФаз выявлены при меланоме в 5–9,2 % случаев. Считают, что мутация *RAC1* занимает 3-е место по частоте встречаемости после *BRAF* и *NRAS*. Чаще других обнаруживается мутация P29S, которая поддерживает *RAC1* в активном ГТФ-связанном состоянии. Эти данные позволяют рассматривать *RAC1* как мишень для таргетной терапии меланомы [76].

В 7 % случаев меланомы обнаружены мутации гена *TACC1*, гиперэкспрессия которого вызывает трансформацию *in vitro*. Ген *TACC1* кодирует белок, который взаимодействует с киназой *AurA* и стимулирует RAS- и PI3K-сигнальные пути [31].

В 5 % случаев выявлены мутации гена *STK19* (D89N, P90L) [31], кодирующего киназу, свойства которой пока изучены недостаточно.

Высокая частота мутаций отмечена в генах фосфатаз *PPP6C*, *PTPRK*, *PTPRD*, которые не связаны с сигнальными путями MAPK и АКТ. Серин-треониновая фосфатаза *PPP6C* имеет функции супрессора и выполняет важную роль в регуляции клеточного цикла и митоза: негативно регулирует уровень циклина D1 и дефосфорилирует киназу *AurA*. Мутации *PPP6C* (R264C, S270L, P259S) обнаружены в 9–12 % случаев меланомы, подверженной инсоляции и имеющих мутации *BRAF* и *NRAS* [31]. Высокая частота мутаций обнаружена и в генах, кодирующих фосфатазы *PTPRK*, *PTPRD*. Так, мутации в гене *PTPRK* нарушают супрессивное действие TGF-β [76].

Мутационный статус генов *RAC1*, *PPP6C* и *STK19* позволяет рассматривать их как потенциальные мишени для таргетной терапии меланомы [31].

Молекулярные мишени таргетной терапии метастатической меланомы

Своевременная диагностика на ранних стадиях заболевания и удаление очага в полном объеме — определяющие факторы, которые позволяют сделать лечение меланомы максимально успешным. Меланома может быть излечена хирургическим путем при 0/I стадии, и при этом 5-летняя выживаемость составляет 90–100 % [1]. Однако прогноз ухудшается при поражении более глубоких слоев кожи, что связано с инвазией и метастазированием: 5-летняя выживаемость на III стадии с метастазами в регионарных лимфоуз-

лах — 20–70 %, на IV стадии — менее 10 %. Общая 5-летняя выживаемость пациентов с метастатической болезнью составляет 10 %, а 10-летняя — 2–5 % [4].

Меланома — чрезвычайно агрессивное заболевание с высокой устойчивостью к цитотоксическим агентам. Химиотерапевтические препараты остаются стандартом терапии метастатической и неоперабельной меланомы. Лечение метастатических форм и заболевания на III–IV стадии включает системную терапию препаратами дакарбазин и темодал, производными нитрозомочевины (ломустин, фотемустин), препаратами платины (цисплатин и карбоплатин), таксанами (паклитаксел) или их комбинациями. Высокодозная терапия интерлейкином-2 дает длительные полные ремиссии у небольшого числа больных с легочными метастазами, но ее применение ограничено из-за высокой токсичности [78].

Успехи в изучении молекулярных механизмов возникновения и прогрессии меланомы инициировали попытки ингибирования сигнального пути MAPK [16, 79]. Идентификация мутаций *BRAF* привела к использованию ингибитора протеинкиназ — сорафениба для лечения меланомы, но оказалось, что он неэффективен у больных с активирующей мутацией V600E. Предполагают, что эффект может иметь комбинация препаратов сорафениба и лонафарниба — ингибитора фарнезилирования и «заякоривания» RAS на мембране клетки [5].

С 2011 г. альтернативой химиотерапии для пациентов с метастатической меланомой кожи с мутациями *BRAF* V600E является препарат вемурафениб (зелбораф). В основе его действия лежит ингибирование димеризации *BRAF*, поскольку при мутации V600E происходит усиление сигналинга ERK в результате димеризации мутантной киназы [79]. В I фазе испытаний ответ на вемурафениб был получен у 81 % больных меланомой с мутацией V600E (уменьшение в диаметре всех опухолевых узлов на 30 %) [80]. В III фазе испытаний общая выживаемость в течение 6 мес отмечена у 84 % пациентов с метастатической меланомой, выживаемость без прогрессирования составила 5–7 мес [32]. Однако у 20–30 % пациентов, получающих вемурафениб, наблюдаются побочные эффекты: малигнизация доброкачественных поражений и появление плоскоклеточного рака кожи, что связывают с активацией пути MAPK через мутации RAS при подавлении RAF. У некоторых пациентов при лечении возникают новые очаги меланомы с диким типом *BRAF* [5].

В январе 2014 г. зарегистрирован новый таргетный препарат дабрафениб для лечения меланомы с мутацией в 600-м кодоне *BRAF* [81]. В отличие от вемурафениба дабрафениб действует не только при замене V600E, но и при мутации V600K. Оба ингибитора *BRAF* были первыми препаратами, которые имели эффект у пациентов с метастазами в мозг [82].

К сожалению, практически у всех пациентов, ответивших на вемурафениб, с течением времени появ-

ляется устойчивостью к терапии. Вторичная резистентность связана с развитием сложной компенсаторной активации многочисленных компонентов MAPK-пути. Ингибиторы BRAF вызывают парадоксальную активацию MEK, появляются мутации NRAS и MEK (MEK1) [83, 84], нарушается регуляция рецепторных тирозинкиназ PDGFR- β и IGFR, что усиливает фосфорилирование ERK1/2 [5].

Резистентность к ингибиторам BRAF может быть также связана с образованием мутантного гена *BRAF* с делецией 4–8 экзонов, который кодирует белок в 61 кДа, утративший RAS-связывающий домен. Показана усиленная димеризация белка p61 BRAF V600E в культурах клеток меланомы с низким уровнем активации RAS по сравнению с клетками с цельным белком BRAF V600E, что приводит к устойчивости к ингибиторам BRAF. Мутации, элиминирующие димеризацию p61 BRAF, восстанавливают чувствительность к ингибиторам BRAF. Сплайс-варианты BRAF, утратившие RAS-связывающий домен, идентифицированы в опухолях 6 (33 %) из 19 пациентов с приобретенной устойчивостью к ингибиторам BRAF [85].

Поиск и создание новых препаратов показали, что монотерапия ингибиторами MEK неэффективна при меланоме с мутацией BRAF V600E [86], однако результаты использования ингибиторов MEK в сочетании с другими таргетными агентами обнадеживают. Проводятся испытания комбинаций ингибиторов BRAF и/или MEK с ипилимумабом, а также ингибитора BRAF вемурафениба с различными ингибиторами PI3K и ингибитора MEK селуметиниба с ингибиторами АКТ [87].

Ингибиторы MEK траметиниб и селуметиниб улучшают общее выживание пациентов с мутациями V600E/K

в комбинации с ингибиторами BRAF. При применении дабрафениба и траметиниба не только повышается выживаемость, но и уменьшается частота вторичных карцином кожи, а также улучшается переносимость лечения [80]. К ингибитору MEK траметинибу чувствительны некоторые мутации BRAF, устойчивые к вемурафенибу, например L597R и K601E [88, 89].

Предложено использовать ингибиторы MEK в комбинациях для лечения меланомы с мутацией *NRAS* и получены предварительные положительные результаты [90].

Тирозинкиназный ингибитор иматиниба мезилат эффективен при лечении акральной, мукозальной и УФ-сенситивизированной меланомы кожи с чувствительными к нему мутациями в 11-м или 13-м экзонах *KIT* [5].

Заключение

За последнее десятилетие, начиная с 2002 г., когда была открыта мутация BRAF V600E [39], достигнут значительный прогресс в изучении молекулярных механизмов канцерогенеза меланомы. Это привело к созданию принципиально новых лекарственных веществ, молекулярно-направленных (таргетных) препаратов, которые в последние годы стали применять для лечения больных меланомой. Однако проблема не решена, и успех в этом направлении может быть связан с дальнейшим изучением молекулярно-генетических процессов малигнизации. Не менее важны для лечения ранняя диагностика заболевания и его профилактика, связанная с ограничением УФ-облучения молодежи и населения в целом.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica* 2013;2013:635203.
- Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. М., 2014. 226 с. [Statistics of malignant neoplasms in Russia and the CIS countries in 2012. M.I. Davydov, E.M. Axel (eds.). Moscow, 2014. 226 p. (In Russ.)]
- MacKie R.M., Hauschild A., Eggermont A.M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 2009;20 Suppl 6:vi1–7.
- Trotter S.C., Sroa N., Winkelmann R.R. et al. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013;6(9):18–26.
- Chakraborty R., Wieland C.N., Comfere N.I. Molecular targeted therapies in metastatic melanoma. *Pharmgenomics Pers Med* 2013;6:49–56.
- Curtin J.A., Fridlyand J., Kageshita T. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353(20):2135–47.
- Гребенникова О.П., Прилепо В.Н. Меланома. Онкология для практикующих врачей. Под ред. С.С. Чистякова. М., 2009. С. 548–63. [Grebennikova O.P., Prilepo V.N., Melanoma. Oncology for practicing clinicians. S.S. Chistyakov (ed.). Moscow, 2009. Pp. 548–63. (In Russ.)]
- Mihajlovic M., Vlajkovic S., Jovanovic P., Stefanovic V. Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5(8):739–53.
- van den Bosch T., Kilic E., Paridaens D., de Klein A. Genetics of uveal melanoma and cutaneous melanoma: two of a kind? *Dermatol Res Pract* 2010;2010:360136. doi: 10.1155/2010/360136.
- Goldstein A.M., Tucker M.A. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma. *Arch Dermatol* 2001;137(11):1493–6.
- Hansson J. Familial cutaneous melanoma. *Adv Exp Med Biol* 2010;685:134–45.
- Bradford P.T., Freedman D.M., Goldstein A.M., Tucker M.A. Increased risk of second primary cancers after a diagnosis of melanoma. *Arch Dermatol* 2010;146(3):265–72.
- Sekulic A., Haluska P.Jr., Miller A.J. et al.; Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc* 2008;83(7):825–46.
- Hayward N.K. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 2003;22(20):3053–62.
- Bennett D.C. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21(1):27–38.
- Bello D.M., Ariyan C.E., Carvajal R.D. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer Control* 2013;20(4):261–81.

17. Platz A., Egyhazi S., Ringborg U., Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* 2008;1(4):395–405.
18. Helgadottir H., Höiom V., Jönsson G. et al. High risk of tobacco-related cancers in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Med Genet* 2014;51(8):545–52.
19. Bressac-de-Paillerets B., Avril M.F., Chompret A., Demeais F. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie* 2002;84(1):67–74.
20. Fargnoli M.C., Gandini S., Peris K. et al. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2010;46(8):1413–20.
21. Kennedy C., ter Huurne J., Berkhout M. 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.
22. Palmer J.S., Duffy D.L., Box N.F. et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 2000;66(1):176–86.
23. Williams P.F., Olsen C.M., Hayward N.K., Whiteman D.C. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. *Int J Cancer* 2011;129(7):1730–40.
24. Yokoyama S., Woods S.L., Boyle G.M. et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 2011;480(7375):99–103.
25. Vachtenheim J., Borovanský J. Microphthalmia transcription factor: a specific marker for malignant melanoma. *Prague Med Rep* 2004;105(3):318–24.
26. Bertolotto C., Lesueur F., Giuliano S. et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 2011;480(7375):94–8.
27. Guo R., Franco-Palacios M., Russell M. et al. Microphthalmia transcription factor (MITF) as a diagnostic marker for metastatic melanomas negative for other melanoma markers. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(8):1658–64.
28. Shen J., Lei Q., Chen X. et al. Diagnostic performance of microphthalmia transcription factor for melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18(6):798–805.
29. Berger M., Hodis E., Heffernan T. et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012;485(7399):502–6.
30. Pleasance E.D., Cheetham R.K., Stephens P.J. et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 2010;463(7278):191–6.
31. Hodis E., Watson I.R., Kryukov G.V. et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012;150(2):251–63.
32. Chapman P.B., Hauschild A., Robert C. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364(26):2507–16.
33. Lázár V., Ecsedi S., Vízkeleti L. et al. Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization. *Melanoma Res* 2012;22(3):202–14.
34. Smalley K.S., Sondak V.K., Weber J.S. C-KIT signaling as the driving oncogenic event in sub-groups of melanomas. *Histol Histopathol* 2009;24(5):643–50.
35. Miller A.J., Mihm M.C. Melanoma. *N Engl J Med* 2006;355(1):51–65.
36. Berger M.F., Garraway L.A. Applications of genomics in melanoma oncogene discovery. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(3):397–414.
37. Long G.V., Menzies A.M., Nargali A.M. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1239–46.
38. Rajakulendran T., Sahmi M., Lefrançois M. et al. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* 2009;461(7263):542–5.
39. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54.
40. Lovly C.M., Dahlman K.B., Fobn L.E. et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype – driven therapeutic trials. *PLoS One* 2012;7(4):e35309.
41. Lin K., Baritaki S., Militello L. et al. The role of B-RAF mutations in melanoma and the induction of EMT via dysregulation of the NF-KB/Snail/RKIP/PTEN circuit. *Genes Cancer* 2010;1(5):409–20.
42. Wan P.T., Garnett M.J., Roe S.M. et al. Mechanism of activation of the RAF–ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116(6):855–67.
43. Davies M.A., Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 2010;29(41):5545–55.
44. Hutchinson K.E., Lipson D., Stephens P.J. et al. BRAF fusions define a distinct molecular subset of melanomas with potential sensitivity to MEK inhibition. *Clin Cancer Res* 2013;19(24):6696–702.
45. Fedorenko I.V., Gibney G.T., Keiran S.M. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene* 2013;32(25):3009–18.
46. Kelleher F.C., McArthur G.A. Targeting NRAS in melanoma. *Cancer J* 2012;18(2):132–6.
47. Ross A.L., Sanchez M.I., Grichnik J.M. Molecular nevogenesis. *Dermatol Res Pract* 2011;2011:463184. doi: 10.1155/2011/463184.
48. Chraybi M., Alsamad I.A., Copie-Bergman C. et al. Oncogene abnormalities in a series of primary melanomas of the sinonasal tract: NRAS mutations and cyclin D1 amplification are more frequent than KIT or BRAF mutations. *Hum Pathol* 2013;44(9):1902–11.
49. Zebary A., Jangard M., Omholt K. et al. KIT, NRAS and BRAF mutations in sinonasal mucosal melanoma: a study of 56 cases. *Br J Cancer* 2013;109(3):559–64.
50. Dumaz N. Mechanism of RAF isoform switching induced by oncogenic RAS in melanoma. *Small GTPases* 2011;2(5):289–92.
51. Chudnovsky Y., Adams A.E., Robbins P.B. et al. Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat Genet* 2005;37(7):745–9.
52. Michaloglou C., Vredeveld L.C., Soengas M.S. et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436(7051):720–4.
53. Jakob J.A., Bassett R.L. Jr., Ng C.S. et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 2012;118(16):4014–23.
54. Stahl J.M., Sharma A., Cheung M. et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 2004;64(19):7002–10.
55. Stahl J.M., Cheung M., Sharma A. et al. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res* 2003;63(11):2881–90.
56. Davies M.A., Stemke-Hale K., Tellez C. et al. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer* 2008;99(8):1265–8.
57. Tsao H., Mihm M.C. Jr., Sheehan C. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2003;49(5):865–72.
58. Wu H., Goel V., Haluska F.G. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003;22(20):3113–22.
59. Dadrás S.S. Molecular diagnostics in melanoma: current status and perspectives. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(7):860–9.
60. Tschandi P., Berghoff A.S., Preusser M. et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma-associated nevi and uninvolved nevi. *PLoS One* 2013;8(7):e69639.
61. Vredeveld L.C., Possik P.A., Smit M.A. et al. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev* 2012;26(10):1055–69.
62. Dai D.L., Martinka M., Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: A clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* 2005;23(7):1473–82.
63. Janku F., Novotny J., Julis I. et al. KIT receptor is expressed in more than 50 % of early-stage malignant melanoma: a retrospective study of 261 patients. *Melanoma Res* 2005;15(4):251–6.
64. Mobley A.K., Brauer R.R., Kamiya T. et al. Driving transcriptional regulators in

- melanoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31(3–4):621–32.
65. Willmore-Payne C., Holden J.A., Hirschowitz S., Layfield L.J. BRAF and c-kit gene copy number in mutation positive malignant melanoma. *Hum Pathol* 2006;37(5):520–7.
66. 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.
67. Beadling C., Jacobson-Dunlop E., Hodi F.S. et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* 2008;14(21):6821–8.
68. Dai B., Cai X., Kong Y.Y. et al. Analysis of KIT expression and gene mutation in human acral melanoma: with a comparison between primary tumors and corresponding metastases/recurrences. *Hum Pathol* 2013;44(8):1472–8.
69. Antonescu C.R., Busam K.J., Francone T.D. et al. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int J Cancer* 2007;121(2):257–64.
70. Yun J., Lee J., Jang J. et al. KIT amplification and gene mutations in acral/mucosal melanoma in Korea. *APMIS* 2011;119(6):330–5.
71. Allegra M., Giaccherio D., Segalen C., Dumaz N. A new KIT mutation (N505I) in acral melanoma confers constitutive signaling, favors tumorigenic properties, and is sensitive to imatinib. *J Invest Dermatol* 2014;134(5):1473–6.
72. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Герасимова Н.П. и др. Гетерогенность мишеней таргетной терапии различных субтипов меланомы. *Евразийский онкологический журнал* 2013;3(03):106. [Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Gerasimova N.P. et al. Heterogeneity of targeted therapy targets of different subtypes of melanoma. *Evraziyskiy onkol-ogicheskiy zhurnal = Eurasian Oncology Journal* 2013;3(03):106. (In Russ.)]
73. Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Lushnikova A.A. et al. Spectrum of driver mutations in melanoma subtypes. *Drug Metabol Drug Interact* 2014;29(3):75.
74. Bourillon A., Hu H.H., Hetet G. et al. Genetic variation at KIT locus may predispose to melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013;26(1):88–96.
75. Sparrow L.E., Soong R., Dawkins H.J. et al. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995;5(2):93–100.
76. Krauthammer M., Kong Y., Ha B.H. et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012;44(9):1006–14.
77. Xia J., Jia P., Hutchinson K.E. et al. A meta-analysis of somatic mutations from next generation sequencing of 241 melanomas: a road map for the study of genes with potential clinical relevance. *Mol Cancer Ther* 2014;13(7):1918–28.
78. Демидов Л.В., Утяшев И.А., Харкевич Г.Ю. Роль вемурафениба в лечении диссеминированной меланомы кожи. *Современная онкология* 2013;15(2):58–61. [Demidov L.V., Utyashev I.A., Kharkevich G.Yu. Role of vemurafenib in therapy of disseminated melanoma. *Sovremennaya onkologiya = Modern Oncology* 2013;15(2):58–61. (In Russ.)]
79. Wellbrock C., Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol* 2010;80(5):561–7.
80. Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(9):809–19.
81. Hauschild A., Grob J.J., Demidov L.V. et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380(9839):358–65.
82. Kirkwood J.M., Long G.V., Trefzer U. et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012;13(11):1087–95.
83. Trunzer K., Pavlick A.C., Schuchter L. et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2013;31(14):1767–74.
84. Van Allen E.M., Wagle N., Sucker A. et al.; Dermatologic Cooperative Oncology Group of Germany (DeCOG). The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* 2014;4(1):94–109.
85. Poulikakos P.I., Persaud Y., Janakiraman M. et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 2011;480(7377):387–90.
86. Akinleye A., Furqan M., Mukhi N. et al. MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* 2013;6:27. doi: 10.1186/1756-8722-6-27.
87. Voskoboynik M., Arkenau H.T. Combination therapies for the treatment of advanced melanoma: a review of current evidence. *Biochem Res Int* 2014;2014:307059. doi: 10.1155/2014/307059.
88. Dahlman K.B., Xia J., Hutchinson K. et al. BRAF (L597) mutations in melanoma are associated with sensitivity to MEK inhibitors. *Cancer Discov* 2012;2(9):791–7.
89. Bowyer S.E., Rao A.D., Lyle M. et al. Activity of trametinib in K601E and L597Q BRAF mutation-positive metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2014;24(5):504–8.
90. Johnson D.B., Flaherty K.T., Weber J.S. et al. Combined BRAF (Dabrafenib) and MEK Inhibition (Trametinib) in patients with BRAF V600-mutant melanoma experiencing progression with single-agent BRAF inhibitor. *J Clin Oncol* 2014. pii: JCO.2014.57.3535.

Молекулярные особенности почечно-клеточного рака: ранняя диагностика и перспективы терапии

О.В. Ковалева¹, О.Р. Назарова², В.Б. Матвеев², А.Н. Грачев¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²НИИ клинической онкологии ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ольга Владимировна Ковалева ovkovaleva@gmail.com

Рак почки по праву считается одной из основных проблем современной онкоурологии. В структуре онкологической заболеваемости в России доля злокачественных новообразований почки составляет 4,3 %. В последние годы отмечается тенденция к увеличению абсолютного числа данной категории больных. В общей структуре заболеваемости злокачественные новообразования почки составляют 3,6 %, что соответствует 10-му ранговому месту. Для некоторых новообразований, например опухолей простаты и яичников, существуют диагностические маркеры, что позволило в последние годы выявлять данные заболевания на значительно более ранних стадиях, нежели раньше. Рак почки по-прежнему остается достаточно сложным в диагностическом и терапевтическом плане заболеванием, которое симптоматически проявляет себя уже на поздних стадиях. В России на момент установления диагноза локализованный и местно-распространенный рак почки выявляется у 75,4 % заболевших. Несмотря на наличие на фармацевтическом рынке различных таргетных препаратов, направленных на лечение данного заболевания, терапия почечно-клеточного рака на данный момент не достигла значительных успехов. Большинство современных таргетных терапевтических агентов, направленных на лечение рака почки, включает в себя ингибиторы различных компонентов одного сигнального пути, берущего свое начало от опухолевого супрессора VHL1, потеря экспрессии которого наблюдается в большинстве случаев почечно-клеточных карцином. Очевидно, что существующие на фармацевтическом рынке препараты не обладают достаточной терапевтической эффективностью. Именно поэтому возникает необходимость поиска новых сигнальных путей, регулирующих важнейшие клеточные процессы, такие как пролиферация, миграция и апоптоз. Существующие на сегодняшний день маркеры прогноза и мишени терапии почечно-клеточного рака малочисленны и низкоспецифичны. В связи с этим поиск и валидация новых маркеров, а в особенности новых специфических мишеней для лечения онкопатологий почки представляются чрезвычайно актуальными.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, диагностические и прогностические маркеры, таргетная терапия, HIF-1α, VHL, VEGF, TGF-α, PDGF, Bcl-2, ангиогенез

Molecular features of renal cell carcinoma: early diagnostics and perspectives for therapy

O. V. Kovaleva¹, O. R. Nazarova², V. B. Matveev², A. N. Gratchev¹

¹Scientific Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24;

²Scientific Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24

Kidney cancer (renal cell carcinoma) is one of the major problems of modern urological oncology. In Russia renal cell carcinoma accounts for 4.3 % of all cancers. The global incidence of renal cell carcinoma has increased over the past two decades. Worldwide renal cell carcinoma accounts for 3.6 % of all cancers and is 10th frequent malignancy. For some malignancies, for instance tumours of prostate, there are markers known that allowed improved early diagnostics. Kidney cancer, however, remains to be hard to diagnose and to treat, since the symptoms can be detected on advanced stages of the disease. In Russia 75.4 % of renal cell carcinoma cases detected at the stage of local and locally advanced disease. Though there are various target drugs on the market aimed to treat this disease, the results of renal cell carcinoma treatment did not reach any substantial success. Most of existing target drugs for kidney cancer treatment include inhibitors of a single signaling pathway regulated by VHL1, which expression is lost in the vast majority of renal-cell carcinomas. Till now existing drugs did not reach sufficient efficacy. Therefore, it is highly important to search for new signaling pathways, regulating such cellular processes as proliferation, migration and apoptosis. Further, prognostic markers and therapy targets identified so far are not sufficient and poorly specific. Therefore identification and validation of new markers, and especially new specific targets for the treatment of kidney oncopathologies is highly important and timely task.

Key words: renal cell carcinoma, diagnostic and prognostic markers, target therapy, HIF-1α, VHL, VEGF, TGF-α, PDGF, Bcl-2, angiogenesis

Введение

В последние два десятилетия наблюдается неуклонный рост заболеваемости почечно-клеточным раком (ПКР) по всему миру. Рак почки в России занимает 10-е место по уровню заболеваемости среди злокачественных новообразований, а по уровню при-

роста уступает только раку предстательной железы [1, 2]. Максимум заболеваемости приходится на возрастную категорию 55–60 лет; у мужчин ПКР встречается в 2 раза чаще, чем у женщин [3]. Высокий метастатический потенциал приводит к тому, что метастазы обнаруживаются у 25 % пациентов на момент установления диа-

гноза [1, 4]. Прогноз течения заболевания при развитии метастатического процесса у больных ПКР крайне неблагоприятный: при отсутствии специфического лечения период до прогрессирования составляет 2–4 мес, а средняя продолжительность жизни после выявления метастазов — не более 10–13 мес [5].

Эпидемиология

Несмотря на большое количество исследований, проводимых в последние годы, этиология ПКР до сих пор остается невыясненной. Однако существуют некоторые факторы риска, способствующие развитию данного новообразования.

На сегодняшний день доказано, что курение табака является одним из наиболее значимых факторов риска развития различных злокачественных новообразований. Риск появления опухоли почки у курильщиков обеих половых групп возрастает на 30 % по сравнению с некурящим населением. Также подтверждено неблагоприятное влияние чрезмерной массы тела на вероятность развития рака почки. Ожирение приводит к увеличению частоты заболеваемости ПКР на 20 %. Некоторые авторы связывают возникновение ПКР с использованием диуретических препаратов и сахарным диабетом. Стоит отметить, что ПКР не является профессиональным заболеванием, и достоверного влияния различных продуктов питания на заболеваемость данным типом опухоли не выявлено [6–11].

Классификация

Первое упоминание о возможном случае рака почки было сделано Даниэлем Сеннертом в 1613 г. [12], однако однозначно подтвержденный случай ПКР был описан только в 1810 г. во Франции [12]. Первая классификация рака почки была представлена в 1826 г. [13], но споры о том, что должно лежать в основе этой классификации, продолжались до конца XX века.

В основе традиционной классификации рака почки лежат особенности морфологии клетки и клеточного ядра. В настоящее время наиболее широкое распространение получило определение ядерного индекса по Фурману. Впервые классификация, основанная на генетических признаках, предложена G. Kovacs в 1989 г. В 1996 г. на практической конференции в Гейдельберге принята новая классификация, выделяющая 4 формы ПКР, для каждой из которых характерны специфические генетические альтерации, обуславливающие различное клиническое течение и разную чувствительность к проводимому лечению. Согласно данной классификации различают непиллярный (светлоклеточный) (75 %), пиллярный (хромофильный) (7–14 %), хромофобный рак (4–10 %), и рак собирательных протоков (1–2 %) [14].

Молекулярные особенности

Самым распространенным типом ПКР является светлоклеточный рак, диагностируемый у 75 % боль-

ных ПКР. Считается, что светлоклеточная почечно-клеточная карцинома возникает из эпителиальных клеток проксимальных отделов почечных канальцев. Большинство светлоклеточных карцином характеризуются инактивацией гена-супрессора *VHL* вследствие мутаций, аллельных делеций и/или метилирования [15, 16]. Ген *VHL* был открыт в 1993 г. при исследовании наследственного ПКР, а годом позже его мутации были описаны и в спорадических случаях [17, 18]. Потеря или нарушение экспрессии *VHL*, по различным данным, наблюдается в 50–80 % случаев светлоклеточного ПКР. При других гистологических вариантах ПКР (папиллярный, хромофобный и рак собирательных трубочек) мутации гена *VHL* не выявлены. Была выдвинута гипотеза, что нарушение активности гена *VHL* и контролируемых им внутриклеточных сигнальных путей при ПКР является одним из ранних и ключевых событий [19–22]. В физиологических условиях *VHL*, являющийся опухолевым супрессором, обеспечивает внутриклеточную регуляцию уровня транскрипционного фактора HIF-1 α (hypoxia-induced factor — индуцируемый гипоксией фактор). Белок *VHL* является составной частью убиквитин-лигазного комплекса, с помощью которого осуществляется деградация HIF-1 α [23]. Перечисленные выше нарушения приводят к блокированию экспрессии *VHL* или синтезу дефектного белкового продукта. В клетке при этом накапливается избыточное количество HIF-1 α , который активирует транскрипцию индуцируемых гипоксией генов (VEGF — vascular endothelial growth factor, PDGF — platelet-derived growth factor, TGF- α — transforming growth factor α и др.), участвующих в положительной регуляции как клеточной пролиферации, так и неоангиогенеза [16, 24], которые позволяют клетке временно адаптироваться к гипоксии. Известно, что VEGF играет центральную роль в ангиогенезе, и гиперэкспрессия данного фактора роста обеспечивает образование новых сосудов. В то же время избыточная продукция PDGF занимает ключевое место в процессе эндотелиальной стабилизации за счет стимуляции перicyтов [25]. TGF- α является важным фактором аутокринной стимуляции роста, а также способен непосредственно взаимодействовать с рецептором эпителиального фактора роста (EGFR), который гиперэкспрессирован в 50–90 % случаев опухолей почки [25]. Активация рецепторов EGFR и VEGF инициирует один из основных митогенных сигнальных каскадов, а именно сигнальный путь Raf/MEK/ERK, способствующий, в частности, усиленной пролиферации опухолевых клеток. Помимо непосредственного влияния на опухолевые клетки, вышеперечисленные ростовые факторы оказывают влияние и на клетки опухолевого микроокружения. Например, эндотелиоциты, фибробласты и перicyты имеют на своей поверхности рецепторы к экспрессируемым опухолевыми клетками факторам роста. VEGF и PDGF, взаимодействуя с рецепторами, способствуют привле-

чению циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток из сосудистого русла, улучшению их выживаемости, последующей пролиферации и формированию сосудистой сети, а также актуального микроокружения внутри самой опухоли. В одном из исследований продемонстрирована четкая корреляция между мутацией *VHL*, гиперэкспрессией HIF-1 α и VEGF в опухолевой ткани у больных почечно-клеточной карциномой [26]. Таким образом, молекулярные нарушения, возникающие на различных этапах *VHL*-зависимого сигнального пути, могут, с одной стороны, объяснять избыточную опухолевую васкуляризацию опухолей данного типа, а с другой — обосновать использование антиангиогенной терапии в лечении данного заболевания.

Молекулярные маркеры

Выявление новых диагностических, прогностических факторов и маркеров чувствительности опухолей к различной терапии является одним из основных направлений современной молекулярной онкоурологии. На сегодняшний день потеря экспрессии гена *VHL* — практически единственное молекулярно-биологическое событие, стабильно наблюдаемое при раке почки. Большинство таргетных терапевтических агентов, направленных на лечение рака почки, включают в себя ингибиторы различных компонентов основного сигнального пути, связанного с инактивацией *VHL*. Именно поэтому возникает необходимость в поиске новых сигнальных путей, регулирующих важнейшие клеточные процессы, такие как пролиферация, миграция, апоптоз и др., компоненты которых могут стать новыми мишенями для создания эффективных таргетных препаратов. Большое внимание уделяется поиску новых тканеспецифичных онкогенов и опухолевых супрессоров.

В 2011 г. M. Li и W.K. Rathmell предложили следующую классификацию маркеров рака почки [27]:

- маркеры ранней диагностики — позволяют осуществлять скрининг пациентов на наличие у них ПКР;
- диагностические маркеры — позволяют подтвердить либо опровергнуть диагноз, а также, возможно, определить гистологический тип опухоли;
- прогностические маркеры — позволяют предположить характер развития и клинического течения заболевания;
- маркеры чувствительности к терапии — позволяют предположить уровень терапевтического ответа на лечение и осуществлять мониторинг эффективности терапии.

На данный момент в литературе описано около 15 молекул, претендующих на роль диагностических и прогностических маркеров опухолей почки. В зависимости от анализируемого материала различают следующие группы потенциальных диагностических маркеров почечно-клеточной карциномы:

- тканевые маркеры (*VHL*, VEGF, HIF-1, сурвивин, mTOR, карбоангидраза 9 (CA9), PTEN, тирозинкиназы Akt и S6K, CCL5 и CXCL9, кавеолин-1 и др.);
- маркеры крови (VEGF, CA9).

Тканевые маркеры в основном используют для подтверждения диагноза после биопсии или оперативного вмешательства. Однако многие из перечисленных выше белков не являются специфичными для данной патологии. Например, сурвивин, белок из семейства ингибиторов апоптоза, может считаться маркером практически всех онкопатологий, потому что в норме его экспрессия отсутствует во всех дифференцированных клетках взрослого организма и сохраняется только в делящихся клетках. Высокая оценка его количественной экспрессии может служить дополнительным фактором плохого прогноза [28]. Инактивация фосфатазы PTEN также характеризует значительную часть различных опухолей — глиом, менингиом, меланом, опухолей почки, печени, матки, молочной и предстательной желез, поэтому не может считаться специфическим маркером. Тирозинкиназы Akt и S6K являются компонентами сигнального пути mTOR, регулирующего инициацию трансляции различных белков в клетке, обеспечивая тем самым ее способность к жизнедеятельности в целом. Литературные данные свидетельствуют, что, исследуя уровни pAkt и pS6K в образцах опухолей у 20 пациентов, которым проводилась терапия темсиrolимусом, можно оценивать эффективность mTOR-направленной терапии [29]. Экспрессия кавеолина-1, одного из основных белков мембранных микродоменов (кавеол) — специальных структур, участвующих в образовании и проведении большинства внутриклеточных сигналов, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом при раке предстательной железы, пищевода, легких, молочной железы, а также ПКР [30]. Одновременное повышение уровней кавеолина и составляющих Akt/mTOR-сигнального пути свидетельствует о неблагоприятном прогнозе рака почки [31]. Также исследована взаимосвязь экспрессии протоонкогена Bcl-2, принимающего участие в негативной регуляции апоптоза, с клинико-морфологическими характеристиками опухолей и прогнозом при ПКР. В серии работ показано, что экспрессия Bcl-2 не влияет на прогноз заболевания [32, 33], однако в другом исследовании при анализе 101 случая почечно-клеточной карциномы обнаружена значимая корреляция экспрессии Bcl-2 в опухолевых клетках с благоприятным прогнозом. Частота экспрессии Bcl-2 в данной выборке оказалась обратно пропорциональна индексу пролиферации и апоптоза. По мнению авторов, экспрессия Bcl-2 может служить фактором благоприятного прогноза при раке почки [34]. Следует отметить, что для ПКР нет однозначных данных о прогностическом значении одного из маркеров пролиферативной активности опухоли — индекса пролиферации Ki-67, широко используемого в клинической практике. Считается, что антиген Ki-67 экспрессиру-

ется практически во всех фазах митотического цикла, и его высокая экспрессия, по многочисленным наблюдениям, прямо коррелирует со степенью ядерной градации по Фурману, стадией опухоли и риском метастазирования и связана со снижением выживаемости больных [35, 36].

Особое внимание стоит уделить ферменту СА9. В физиологических условиях данный фермент отвечает за поддержание кислотно-щелочного баланса (рН) во внеклеточном матриксе посредством связывания ионов H^+ с гидрокарбонатом натрия. В нормальной ткани при иммуногистохимическом исследовании экспрессия СА9 обнаруживается только в эпителии слизистой желудка, тонкой кишки, яичников, желчного пузыря и в мезотелии. СА9 экспрессируется также опухолевыми клетками при немелкоклеточном раке легкого, раке шейки матки, толстой кишки и яичников, что является негативным фактором прогноза [37]. Предполагается, что с помощью СА9 опухолевые клетки могут временно адаптироваться к ацидозному «стрессу» при гипоксическом состоянии, который возникает в процессе активного неконтролируемого деления. Как следствие, опухоль приобретает еще более агрессивный фенотип [38–41]. При ПКР экспрессию СА9 выявляют в основном при светлоклеточном подтипе с частотой 87–97 %. При других гистологических вариантах ПКР — папиллярном или хромофобном — частота экспрессии данного белка в опухолевых клетках не превышает 20 и 4 % соответственно. Парадоксально, но в отличие от других заболеваний при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме гиперэкспрессия СА9 может являться благоприятным прогностическим фактором [42].

Маркеры любого онкологического заболевания, которые возможно идентифицировать в крови, представляют собой особую ценность ввиду их биологической доступности. Например, уровень VEGF в плазме крови напрямую коррелирует с уровнями экспрессии VEGF в тканях ($p = 0,01$). Уровень VEGF в сыворотке крови коррелирует с клинической стадией почечно-клеточной карциномы, сосудистой инвазией ($p = 0,03$), размерами опухоли ($p = 0,01$) и выживаемостью [43]. В других исследованиях повышенный уровень VEGF в крови пациентов коррелировал с более коротким безрецидивным периодом, а также в целом со снижением уровня выживаемости данных пациентов. Также VEGF зарекомендовал себя и как маркер чувствительности к различным видам терапии [44].

Изучение микроРНК (miR) при различных онкологических заболеваниях открыло новые перспективы использования их в качестве диагностических и прогностических маркеров и при раке почки. В первой работе по исследованию профиля miR в светлоклеточных почечных карциномах, опубликованной сотрудниками Университета Томаса Джефферсона, идентифицирован сет из 4 miR (miR-28, miR-185, miR-27 и let-7f-2), не обнаруживаемый в ткани нормальной

почки [45]. За прошедший с этого момента период в PubMed нами найдено около 200 работ, посвященных данной теме, причем более 60 опубликованы в 2014 г. Определены специфические панели miR для различных морфологических субтипов ПКР [46], исследовано влияние некоторых miR (miR-21, miR-183) на сигнальные пути, ассоциированные с развитием рака почки [47–49], выявлены miR, которые уже используются в качестве маркеров как быстрой прогрессии (miR-21, miR-125b, miR-630 и др.), так и благоприятного течения светлоклеточного ПКР (miR-30c, кластер miR-23b/27b) [50–53], разрабатываются подходы к использованию отдельных miR (miR-200c) как триггеров чувствительности к терапии сорафенибом и иматинибом [54]. MiR — активно исследуемый, очень перспективный класс биомаркеров, и в рамках данного обзора оценивать в полной мере их клиническое значение при ПКР несколько преждевременно.

Лечебная тактика

Почечно-клеточные опухоли практически не чувствительны к системной химиотерапии, гормонотерапии и стандартным методам лучевого лечения. Частота объективного ответа при назначении цитостатиков и высоких доз антиэстрогенов, как правило, не превышает 5 %. Биологическим основанием этому служит гиперэкспрессия гена множественной лекарственной устойчивости *MDR-1*, обеспечивающего выведение цитотоксических агентов и их метаболитов из опухолевой клетки. Единственно эффективным при лечении рака почки остается хирургический подход. Роль хирургии за последние годы значительно изменилась, как по отношению к локализованным, так и по отношению к диссеминированным опухолям. С одной стороны, значительно возросли показания к резекции почки на начальных стадиях. С другой стороны, в связи с появлением схем адъювантной иммунотерапии увеличилась роль хирургии в лечении больных с метастазами и местно-распространенными формами.

Возможность возникновения спонтанных регрессий (< 1 %) и длительных стабилизаций (до 20 % больных), не связанных с лечением основного заболевания, на долгие годы предопределила развитие иммунотерапевтического направления в качестве основного лечебного подхода у больных метастатическим ПКР.

Выделяют следующие иммунотерапевтические подходы:

- 1) неспецифическая иммунотерапия с использованием цитокинов (интерфероны, интерлейкины) и других модификаторов биологических реакций;

- 2) адаптивная клеточная иммунотерапия с применением аутолимфоцитов, лимфокин-активированных киллеров (лимфоциты, активированные интерлейкином-2 (ИЛ-2)), лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль;

3) специфическая иммунотерапия (вакцинолечение, терапия моноклональными антителами).

До недавнего времени неспецифические иммуно-терапевтические методы с включением интерферона- α (ИФН- α) или ИЛ-2 являлись единственными для больных ПКР. Тем не менее частота объективных эффектов в общей популяции больных ПКР оставалась невысокой — всего 10–15 %, а медиана продолжительности жизни и 5-летняя выживаемость не превышали 12 и 5 мес соответственно [55]. Всевозможные попытки улучшить результаты лечения за счет комбинации двух цитокинов (ИЛ-2 и ИФН- α), а также их сочетания с химио- или гормонотерапией не привели к существенному повышению эффективности лечения и улучшению выживаемости больных.

Идентификация молекулярных нарушений, ассоциированных с развитием ПКР, а также понимание биологических механизмов, лежащих в основе опухолевой прогрессии, привели к созданию препаратов с таргетным механизмом действия. Условно все таргетные агенты, направленные на терапию ПКР, относятся к двум фармакологическим группам. В первую группу лекарственных средств входят антиангиогенные препараты (сунитиниб, сорафениб, пазопаниб, бевацизумаб, акситиниб), влияющие на различные внутриклеточные мишени, относящиеся к патогенетическому пути, связанному с инактивацией *VHL* (например, на VEGF, VEGFR, PDGFR и др.), в то время как вторая группа препаратов (эверолимус, темси-ролимус) оказывает влияние на mTOR-ассоциированные сигнальные пути.

Согласно существующим на сегодняшний день рекомендациям, большинство больных распространенным светлоклеточным ПКР в 1-й линии терапии получают антиангиогенные препараты. Одним из таких препаратов является сорафениб — пероральный мультитаргетный ингибитор, угнетающий активность серин/треониновой киназы B-Raf, рецепторов VEGF (VEGFR-1, -2 и -3) и PDGF (PDGFR), FMS-подобной тирозинкиназы-3 (FLT-3) и c-KIT, играющих ключевую роль в процессах регуляции ангиогенеза и апоптоза. В одном из исследований проведено сравнение эффективности применения сорафениба и плацебо после прогрессирования заболевания, отмеченного на фоне проведения системной иммунотерапии (или у пациентов, которым невозможно проводить иммунотерапию). По результатам исследования установлено, что выживаемость без прогрессирования в случае применения сорафениба увеличилась на 3 мес [56]. Также наблюдалось увеличение выживаемости пациентов, получавших сначала плацебо, а затем сорафениб [57].

Сунитиниб — другой мультитаргетный ингибитор различных тирозинкиназ. Данный препарат селективно подавляет PDGFR, VEGFR, c-KIT и FLT-3 и обладает противоопухолевой и антиангиогенной активностью. Во II фазе клинических испытаний отмечена

высокая частота ответов на данный препарат, достигающая 40 %, и увеличение выживаемости без признаков прогрессирования в группе пациентов, невосприимчивых к терапии цитокинами [58]. Недавно проведенное исследование показало, что время до прогрессирования заболевания при монотерапии сунитинибом в 1-й линии было выше, чем при монотерапии ИФН- α (11 мес против 5 мес соответственно, $p < 0,000001$). Результаты показали, что монотерапия ИФН- α при метастатическом ПКР уступает терапии сунитинибом в группах низкого и промежуточного риска. Общая выживаемость составила 26,4 и 21,8 мес в группах сунитиниба и ИФН- α соответственно ($p = 0,05$) [59]. Еще один таргетный препарат — бевацизумаб — представляет собой моноклональные антитела, связывающие изоформы VEGF-A и блокирующие их активность, тем самым способствуя ослаблению васкуляризации опухоли. Применение бевацизумаба в режиме 10 мг/кг каждые 2 нед у больных, нечувствительных к иммунотерапии, способствовало увеличению общего числа ответов (10 %) на лечение и показателей беспрогрессивной выживаемости [60].

Одной из мишеней для противоопухолевой терапии у больных ПКР является серин/треонинкиназа mTOR (mammalian target of rapamycin), которая играет важную роль в регуляции клеточного роста и пролиферации, а также увеличивает экспрессию гена *HIF-1 α* и, как следствие, стимулирует ангиогенез. К ингибиторам mTOR относятся темси-ролимус и эверолимус.

Темси-ролимус — ингибитор киназы mTOR [61], действующий одновременно на процесс пролиферации опухолевых клеток и на ангиогенез [62]. В одном из проведенных исследований пациенты с метастатическим ПКР высокой категории риска быстрой прогрессии были разделены на 3 группы в зависимости от получаемого препарата: темси-ролимус, ИФН- α или их комбинация. В группе больных, получавших темси-ролимус, общая выживаемость составила 10,9 мес по сравнению с 7,3 мес в группе ИФН- α ($p < 0,0069$). Тем не менее у пациентов, получавших темси-ролимус в сочетании с ИФН- α , существенного увеличения общей выживаемости не зарегистрировано [26]. На фармацевтическом рынке представлен еще один пероральный ингибитор киназы mTOR — эверолимус. В одном из исследований проведено сравнение результатов применения эверолимуса и плацебо у пациентов, для которых отмечено прогрессирование заболевания при проведении анти-VEGFR-терапии. Медиана выживаемости без прогрессирования заболевания при применении эверолимуса составила 4 мес в группе пациентов, получавших терапию, и 1,9 мес в группе плацебо ($p < 0,001$) [63, 64].

В настоящее время существует несколько подходов к назначению таргетных препаратов. Помимо их последовательного применения активно изучается эффективность использования комбинации антиангиогенных препаратов с целью увеличения показате-

лей выживаемости и качества жизни больных. Существует несколько возможных вариантов комбинированной терапии. К одному из них относят сочетание препаратов, блокирующих HIF-1 α –VEGF-сигнальный путь на нескольких уровнях (вертикальная блокада), например препараты, ингибирующие VEGF и его рецепторы. Другой вариант подразумевает параллельное блокирование нескольких сигнальных путей, например препараты, блокирующие факторы VEGF, PDGF, EGF и их рецепторы и mTOR-ассоциированные сигнальные пути (горизонтальная блокада). Еще один рациональный подход включает комбинацию двух препаратов, один из которых может модулировать действие второго, тем самым увеличивая его эффективность [65–67].

Таким образом, появление принципиально новой группы таргетных лекарственных препаратов привело к коренному пересмотру стандартов лечения распространенного ПКР. В настоящее время больным групп хорошего и промежуточного прогноза по классификации Мемориального онкологического центра Слоун-Кеттеринг (MSKCC), не получавшим лечения, рекомендуется назначение антиангиогенных препаратов (сунитиниб, пазопаниб или бевацизумаб в комбинации с ИФН- α), пациентам группы плохого прогноза – блокатора мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) темсиролимуса. Широко применявшаяся ранее тера-

пия ИФН- α используется только для больных группы хорошего прогноза по классификации MSKCC [68].

Заключение

Подводя итог, можно сказать, что рак почки по-прежнему остается достаточно сложным заболеванием как в диагностическом, так и в терапевтическом плане. Существующие на сегодняшний день молекулярные маркеры рака почки малочисленны, низкоспецифичны и не всегда релевантны. Однако активный поиск новых универсальных диагностических и/или прогностических маркеров почечно-клеточной карциномы продолжается, и в ближайшем будущем, несомненно, будут достигнуты новые успехи в диагностике и лечении данной патологии. Особенно перспективными как в точном стадировании и определении прогноза при ПКР, так и в коррекции схем противоопухолевого лечения представляются исследования miR [69]. Также продолжается активный поиск новых таргетных препаратов, мишенями которых могут стать, например, mTOR, PI3K или Akt-киназа [70], и составляются новые схемы применения уже существующих и активно используемых лекарственных средств.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00396).

ЛИТЕРАТУРА

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина, 2014. [Statistics of malignant neoplasms in Russia and the CIS countries in 2012. M.I. Davydov, E.M. Axel (eds.). Moscow, 2014. 226 p. (In Russ.)]
2. Злокачественные новообразования в России в 2008 г. Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2010. [Malignant neoplasms in Russia in 2008. V.I. Chissov, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova (eds.). Moscow, 2010. (In Russ.)]
3. Chow W.H., Devesa S.S. Contemporary epidemiology of renal cell cancer. *Cancer J* 2008;14(5):288–301.
4. Gupta K., Miller J.D., Li J.Z. et al. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treat Rev* 2008;34(3):193–205.
5. Motzer R.J., Bacik J., Murphy B.A. et al. Interferon-alpha as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20(8):289–95.
6. Chow W.H., Dong L.M., Devesa S.S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 2010;7(5):245–57.
7. Lipworth L., Tarone R.E., McLaughlin J.K. The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol* 2006;176(6 Pt 1):2353–8.
8. Hunt J.D., van der Hel O.L., McMillan G. P. et al. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* 2005;114(1):101–8.
9. Renehan A.G., Tyson M., Egger M. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371(9612):569–78.
10. Pischon T., Lahmann P.H., Boeing H. et al. Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2006;118(3):728–38.
11. Weikert S., Boeing H., Pischon T. et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol* 2008;167(4):438–46.
12. Delahunt B., Thornton A. Renal cell carcinoma. A historical perspective. *J Urol Pathol* 1996;4:31–49.
13. Carson W.J. Solitary cysts of the kidney. *Ann Surg* 1928;87(2):250–6.
14. Клиническая онкоурология. Под ред. проф. Б.П. Матвеева. М., 2011. С. 31–41. [Clinical oncology. B.P. Matveyev (ed.). Moscow, 2011. Pp. 31–41. (In Russ.)]
15. Bodmer D., Hurk W., Groningen J. et al. Understanding familial and non-familial renal cell cancer. *Hum Mol Genet* 2002;11(20):2489–98.
16. Banks R.E., Tirukonda P., Taylor C. et al. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel–Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* 2006;66(4):2000–11.
17. Delahunt B., Eble J.N. History of the development of the classification of renal cell neoplasia. *Clin Lab Med* 2005;25(2):231–46.
18. Storkel S., Eble J.N., Adlakha K. et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997;80(5):987–9.
19. Foster K., Prowse A., van den Berg A. et al. Somatic mutations of the von Hippel–Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* 1994;3(12):2169–73.

20. Gnarr J.R., Tory K., Weng Y. et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994;7(1):85–90.
21. Shuin T., Kondo K., Torigoe S. et al. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel–Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1994;54(11):2852–5.
22. Nickerson M.L., Jaeger E., Shi Y. et al. Improved identification of von Hippel–Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4726–34.
23. Maynard M.A., Ohh M. Von Hippel–Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am J Nephrol* 2004;24(1):1–13.
24. Linehan W.M., Walther M.M., Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 2003;170(6 Pt 1):2163–72.
25. de Paulsen N., Brychzy A., Fournier M.C. et al. Role of transforming growth factor- α in von Hippel–Lindau (VHL) (–/–) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(4):1387–92.
26. Hudes G., Carducci M., Tomczak P. et al. Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356(22):2271–81.
27. Li M., Rathmell W.K. The current status of biomarkers for renal cell carcinoma. 2011. Pp. 153–7.
28. Zamparese R., Pannone G., Santoro A. et al. Survivin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 2008;26(9):929–35.
29. Cho D., Signoretti S., Dabora S. et al. Potential histologic and molecular predictors of response to temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2007;5(6):379–85.
30. Hehlhans S., Cordes N. Caveolin-1: an essential modulator of cancer cell radio- and chemoresistance. *Am J Cancer Res* 2011;1(4):521–30.
31. Campbell L., Jasani B., Edwards K. et al. Combined expression of caveolin-1 and an activated AKT/mTOR pathway predicts reduced disease-free survival in clinically confined renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2008;98(5):931–40.
32. Vasavada S.P., Novick A.C., Williams B.R. P53, bcl-2, and Bax expression in renal cell carcinoma. *Urology* 1998;51(6):1057–61.
33. Uchida T., Gao J.P., Wang G. et al. Clinical significance of p53, mdm2, and bcl-2 proteins in renal cell carcinoma. *Urology* 2002;59(4):615–20.
34. Itoi T., Yamana K., Bilim V. et al. Impact of frequent Bcl-2 expression on prognosis in renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer* 2004;90(1):200–5.
35. Rioux-Leclercq N., Turlin B., Bansard J. et al. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology* 2000;55(4):501–5.
36. Papadopoulos I., Weichert-Jacobsen K., Wacker H.H., Sprenger E. Correlation between DNA ploidy, proliferation marker Ki-67 and early tumor progression in renal cell carcinoma. A prospective study. *Eur Urol* 1997;31(1):49–53.
37. Ivanov S., Liao S.Y., Ivanova A. et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001;158(3):905–19.
38. Dorai T., Sawczuk I., Pastorek J. et al. Role of carbonic anhydrases in the progression of renal cell carcinoma subtypes: proposal of a unified hypothesis. *Cancer Invest* 2006;24(8):754–79.
39. Swinson D.E., Jones J.L., Richardson D. et al. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(3):473–82.
40. Maseide K., Kandel R.A., Bell R.S. et al. Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(13):4464–71.
41. Span P.N., Bussink J., Manders P. et al. Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. *Br J Cancer* 2003;89(2):271–6.
42. Leibovich B., Sheinin Y., Lohse C. et al. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25(30):4757–64.
43. Rioux-Leclercq N., Fergelot P., Zerrouki S. et al. Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Hum Pathol* 2007;38(10):1489–95.
44. Deprimo S.E., Bello C.L., Smeraglia J. et al. Circulating protein biomarkers of pharmacodynamic activity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: Modulation of VEGF and VEGF-related proteins. *J Transl Med* 2007;5:32.
45. Gottardo F., Liu C.G., Ferracin M. et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007;25(5):387–92.
46. Munari E., Marchionni L., Chitre A. et al. Clear cell papillary renal cell carcinoma: micro-RNA expression profiling and comparison with clear cell renal cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2014;45(6):1130–8.
47. Bera A., Das F., Ghosh-Choudhury N. et al. MicroRNA-21-induced dissociation of PDCD4 from rictor contributes to Akt-IKK β -mTORC1 axis to regulate renal cancer cell invasion. *Exp Cell Res* 2014;328(1):99–117.
48. Qiu M., Liu L., Chen L. et al. MicroRNA-183 plays as oncogenes by increasing cell proliferation, migration and invasion via targeting protein phosphatase 2A in renal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452(1):163–9.
49. Li X., Xin S., He Z. et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and promotes cell transformation, proliferation, and metastasis in renal cell carcinoma. *Cell Physiol Biochem* 2014;33(6):1631–42.
50. Heinzelmann J., Unrein A., Wickmann U. et al. MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: a comparison of primary tumors and distant metastases. *Ann Surg Oncol* 2014;21(3):1046–54.
51. Fu Q., Liu Z., Pan D., Zhang W. et al. Tumor miR-125b predicts recurrence and survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma after surgical resection. *Cancer Sci* 2014. doi: 10.1111/cas.12507.
52. Zhao J.J., Chen P.J., Duan R. et al. Up-regulation of miR-630 in clear cell renal cell carcinoma is associated with lower overall survival. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(6):3318–23.
53. Ishihara T., Seki N., Inoguchi S. et al. Expression of the tumor suppressive miRNA-23b/27b cluster is a good prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2014. pii: S0022–5347(14)03935–4. doi: 10.1016/j.juro.2014.07.001.
54. Gao C., Peng F.H., Peng L.K. MiR-200c sensitizes clear-cell renal cell carcinoma cells to sorafenib and imatinib by targeting heme oxygenase-1. *Neoplasia* 2014. doi: 10.4149/neo_2014_083.
55. McDermott D.F., Regan M.M., Clark J.I. et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell. *J Clin Oncol* 2005;23(1):133–41.
56. Escudier B., Eisen T., Stadler W.M. et al.; TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356(2):125–34.
57. Bellmunt J., Négrier S., Escudier B. et al. Metastatic renal cell cancer in the elderly: position paper of a SIOG Taskforce. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;69(1):64–72.
58. Bellmunt J., Négrier S., Escudier B. et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(1):16–24.
59. Figlin R.A., Hutson T.E., Tomczak P. et al. Overall survival with sunitinib versus interferon alfa as first-line treatment in metastatic renal-cell carcinoma. *ASCO Annual Meeting Proceedings* 2008. *J Clin Oncol* 2008;26(Suppl): 5024.
60. Sternberg C.N., Davis I.D., Mardiak J. et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2010;28(6):1061–8.

61. Larkin J.M., Eisen T. Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;60(3):216–26.
62. Keane T., Gilatt D., Evans C.P. et al. Current and future trends in the treatment of renal cancer. *Eur Urol Suppl* 2007;6: 374–84.
- Patel P.H., Chadalavada R.S., Chaganti R.S., Motzer R.J. Targeting von Hippel–Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(24):7215–20.
63. Motzer R.J., Escudier B., Oudard S. et al.; RECORD-1 Study Group. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebocontrolled phase III trial. *Lancet* 2008;372(9637):449–56.
64. Sosman J., Puzanov I. Combination targeted therapy in advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2009;115(10):2368–75.
65. Sternberg C.N., Bellmunt J., Grunwald V. et al. Advances in the management of metastatic renal cell cancer. *Eur Urol Suppl* 2009;8:758–61.
66. Алексеев Б.Я., Калпинский А.С. Применение таргетных препаратов в лечении метастатического рака почки: последовательное назначение или комбинация. *Онкоурология* 2010;(4):16–23. [Alexeyev B.Ya., Kalpinskiy A.S. Application of target drugs in therapy of metastatic kidney cancer: sequential prescription or combination. *Onkourologiya = Oncourology* 2010; (4):16–23. (In Russ.)]
67. NCCN clinical practice guidelines in oncology: kidney cancer. National Comprehensive Cancer Network Web site. URL: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
68. Gowrishankar B., Ibragimova I., Zhou Y. et al. MicroRNA expression signatures of stage, grade, and progression in clear cell RCC. *Cancer Biol Ther* 2014;15(3):329–41.
69. Cho D. Novel targeting of phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin in renal cell carcinoma. *Cancer J* 2013;19(4):311–5.

Гипоксия и гликолиз как возможные объекты противоопухолевого воздействия

В.А. Кобляков

НИИ канцерогенеза ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Валерий Александрович Кобляков kobliakov@rambler.ru

Обзор посвящен роли гипоксии и гликолиза в развитии опухолевого процесса. Экспериментальные данные показывают, что функция гликолиза в опухолевых клетках не ограничивается только обеспечением энергии. При гликолизе происходит активация транскрипционного фактора HIF-1α. HIF-1α в комплексе с белком ARNT стимулирует экспрессию многочисленных генов. К ним относятся гены, кодирующие белки гликолиза, теломеразы, множественной лекарственной устойчивости, антиапоптотические белки семейства Bcl-2, ингибитор пируватдегидрогеназы — киназу пируватдегидрогеназы и др. Ингибирование дыхательной цепи митохондрий при ингибировании пируватдегидрогеназы вызывает накопление в клетке пирувата. Лактатдегидрогеназа превращает пируват в лактат. Накопление лактата в клетках опухоли стимулирует активность монокарбоксилат-транспортера. Происходит транспорт лактата и протонов в межклеточное пространство. Наблюдается падение уровня pH в ткани опухоли. Низкий уровень pH в опухолевой ткани стимулирует активность металлопротеаз, которые разрушают межклеточный матрикс. В участках опухоли с низким pH происходит усиление инвазии. Восстановление нормального уровня pH в ткани опухоли ингибирует инвазию и метастазирование. Таким образом, метаболиты гликолиза участвуют в инвазии и метастазировании. Можно заключить, что гипоксия — это особое физиологическое состояние клетки, поддерживающее и развивающее опухолевый процесс. Имеются данные о противоопухолевом действии ингибиторов различных стадий гликолиза. Ингибиторы гексокиназы — 2-дезоксиглюкоза и лонидамин — ингибируют образование аденозинтрифосфата. Подавляется активность P-гликопротеина. Для некоторых типов опухолей эти соединения обладают токсическим эффектом. Ингибирование P-гликопротеина усиливает противоопухолевую активность цитостатиков, используемых в химиотерапии, при совместном их действии. Дихлорацетат ингибирует активность киназы пируватдегидрогеназы. Включение функционирования дыхательной цепи в условиях недостатка кислорода вызывает образование активных форм кислорода, которые способны вызвать апоптоз. Показано, что для некоторых форм опухолей дихлорацетат является сильным токсическим агентом. Обсуждается возможность использования ингибиторов различных стадий гликолиза в качестве противоопухолевых соединений — как в монотерапии, так и в комплексе с известными цитостатиками.

Ключевые слова: гликолиз, гипоксия, HIF-1α, ингибиторы гликолиза, гексокиназа II, 2-дезоксиглюкоза, лактат, лонидамин, дихлорацетат, монокарбоксилат-транспортер, инвазия, метастазирование

Hypoxic state and glycolysis as a possible anticancer therapeutic target

V.A. Koblyakov

Scientific Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24

In this review the role of hypoxia and glycolysis in tumor expansion is described. Experimental results demonstrate that glycolysis functions in tumor cells are not restrict only energy supply. Glycolysis stimulates the activity of transcription factor HIF-1α. Assembly of HIF1α and protein ARNT stimulates expression of numerous genes. Among others there are genes coding glycolysis proteins, telomerase, P-glycoproteins, antiapoptotic proteins belonging to Bcl-2 family, inhibitor of pyruvate dehydrogenase — pyruvate dehydrogenase kinase and others. The inhibition of mitochondria respiratory chain by inhibition of pyruvate dehydrogenase stimulates accumulation in cell pyruvate. Lactate dehydrogenase transforms pyruvate in lactate. Accumulation of lactate in tumour cells activates monocarboxylate transporter. Lactate and proton transport into intercellular region. Due to it is observed pH drop in tumour tissue. The low level of pH in tumour tissue stimulates metalloprotease activity. Metalloprotease activity disrupt the intercellular matrix. In tumour region with low pH level the enhancement of invasion is observed. The restoration of normal pH level in tumor tissue inhibits invasion and metastasis. It is possible to conclude that hypoxia is a physiological tumour state that support and promote tumor process. It is some informaton about antitumour effects of inhibitors of different stages of glycolysis. Inhibitors of hexokinase — 2-deoxy-D-glucose and lonidamine inhibit adenosine triphosphate formation as well as P-glycoprotein activity. For some tumour types these compounds are toxic. The inhibition of P-glycoprotein activity stimulates antineoplastic activity of cytostatics. Dichloroacetate inhibits pyruvate dehydrogenase kinase activity. Inclusion of respiratory chain in situation when oxygen level is low stimulates reactive oxygen species formation. Reactive oxygen species are able stimulate apoptosis. It is shown that dichloroacetate is very toxic for some forms of tumour. It is discussed the possibility to use the different inhibitors of the different glycolytic stages as anticancer compounds

Key words: glycolysis, hypoxia, HIF-1α, glycolysis inhibitors, hexokinase II, 2-deoxyglucose, lactate, lonidamine, dichloroacetate, monocarboxylate transporter, invasion, metastasis

В середине XX века Отто Варбургом было показано, что в опухолевых клетках повышен уровень гликолиза даже в условиях достаточного количества кислорода (так называемый эффект Варбурга) [1]. Его теория, согласно которой опухоль образуется в результате хронического нарушения митохондриальных функций, пользовалась большой популярностью до 70-х годов прошлого века. Несмотря на то, что нарушения функций митохондрий как причина возникновения опухолей в настоящее время не рассматриваются, изменения в обеспечении опухолевых клеток энергией по сравнению с нормальными клетками широко исследуются. Это одно из немногих функциональных различий нормы и опухоли, которое можно использовать в лечении злокачественных новообразований.

Механизм переключения функционирования клеток с тканевого дыхания на гликолиз при гипоксии достаточно хорошо изучен. Независимо от того, происходит переключение клетки на гликолиз в результате нехватки O_2 или при псевдогипоксии (эффект Варбурга), механизм включения гликолиза и других эффектов, характеризующих гипоксию, одинаков. Основным фактором гипоксии является транскрипционный фактор HIF-1 α , содержание которого регулируется на уровне белка: при достаточном количестве кислорода сенсором O_2 является фермент пролилксидаза, который окисляет HIF-1 α по пролинам. Окисленный по пролинам HIF-1 α взаимодействует с белком VHL, являющимся убиквитинлигазой [2, 3], и разрушается в протеасомах. При недостаточном уровне кислорода пролилксидаза не окисляет HIF-1 α , белок VHL не взаимодействует с ним, и количество HIF-1 α

увеличивается (рис. 1). При гипоксии HIF-1 α накапливается и взаимодействует с белком ARNT (HIF-1 β), количество которого в клетке постоянно. Образовавшийся комплекс HIF-1 α –ARNT является транскрипционным фактором, вызывающим активацию более 200 генов, определяющих гипоксическое состояние клетки.

Если раньше считалось, что основной эффект гипоксии — это вынужденное переключение клетки на менее выгодное энергообеспечение ввиду невозможности использования более выгодного источника энергии — митохондриального окисления, то сейчас ясно, что гипоксия — это другое физиологическое состояние клетки, поддерживающее и развивающее опухолевый процесс. Клетки, подвергнутые гипоксии, показывают усиленную пролиферацию [4, 5], остановку в дифференцировке [6, 7], активируя дедифференцировочные гены *Okt4*, *Notch*, повышенную способность к миграции и инвазии [8, 9], устойчивость к апоптозу [10, 11] благодаря активации антиапоптотических генов семейства *Bcl-2* и стимуляции множественной лекарственной устойчивости [12]. Происходит резкое увеличение синтеза ферментов гликолиза: лактатдегидрогеназы, транспортера глюкозы и других, в том числе гексокиназы II [13] (рис. 2).

Важным элементом гипоксии является «отключение» дыхательной цепи митохондрий на уровне образования ацетилкоэнзима А из пирувата. Происходит активация гена киназы пируватдегидрогеназы, продукт которого фосфорилирует пируватдегидрогеназу, делая этот белок неактивным [14, 15].

Однако в ситуации гипоксии клетка, видимо, не чувствует нехватки энергии, поскольку повышенная

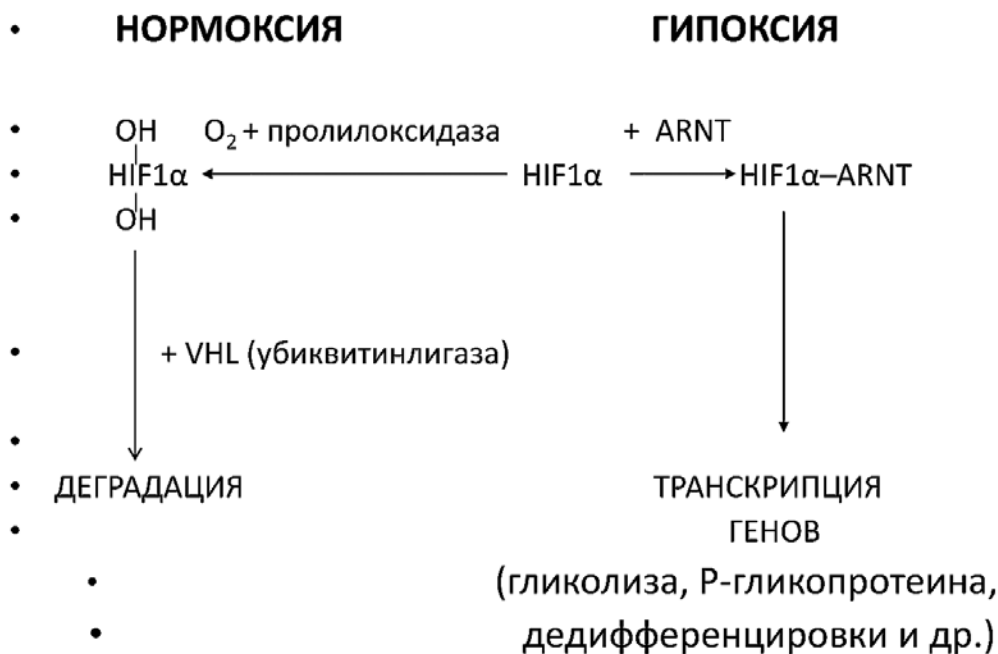


Рис. 1. Регуляция белка HIF-1 α . При нормоксии HIF-1 α окисляется по пролинам ферментом пролилксидазой, являющимся сенсором кислорода в клетке. При гипоксии HIF-1 α накапливается в клетке, взаимодействует с белком ARNT, образуя транскрипционный комплекс, и вызывает синтез более 200 белков



Рис. 2. Эффекты, вызываемые HIF-1α в опухолевых клетках

экспрессия всех ферментов гликолиза вызывает усиление окисления глюкозы, и этим восполняется нехватка образования аденозинтрифосфата (АТФ). Помимо этого, при гликолизе АТФ синтезируется намного быстрее и более доступен, поскольку процесс происходит в цитоплазме, а не в митохондриях.

Окисление глюкозы приводит не только к синтезу АТФ, но и к образованию продуктов, необходимых для

пролиферации. Глюкозо-6-фосфат направляется как для окисления до пирувата и далее для функционирования дыхательной цепи митохондрий, так и в пентозный цикл, где синтезируется рибоза, необходимая для выработки нуклеотидов (рис. 3); из глицеральдегид-3-фосфата образуется глицерол, который участвует в синтезе липидов. Считается, что в антиапоптотической защите опухолевых клеток принимает участие

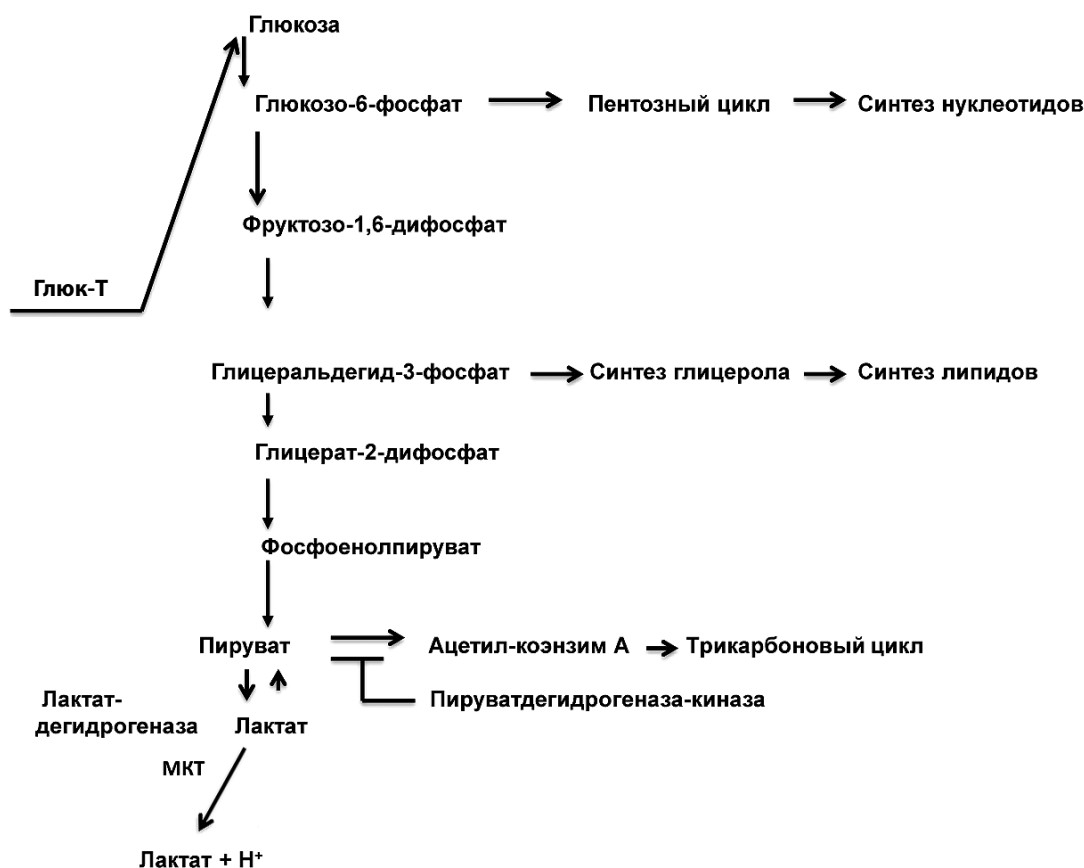


Рис. 3. Схема гликолиза. Глюкоза переносится через клеточную мембрану транспортером глюкозы (Глюк-Т). Лактат транспортируется через клеточную мембрану в межклеточное пространство посредством монокарбоксилат-транспортера (МКТ)

гексокиназа II, синтезирующаяся преимущественно в них. Этот фермент располагается на поверхности митохондрий, где находятся межмембранные каналы VDAC [16], через которые в цитоплазму из митохондрий при апоптозе транспортируется цитохром С. Такое расположение гексокиназы II препятствует выходу цитохрома С из митохондрий в цитоплазму.

В результате «отключения» дыхательной цепи митохондрий благодаря усиленному окислению глюкозы происходит накопление пирувата. Фермент лактатдегидрогеназа способен в зависимости от концентрации продуктов реакции образовывать как лактат из пирувата, так и пируват из лактата. При гипоксии, в отсутствие O_2 , реакция смещена в сторону образования лактата.

Накопление в клетке лактата сопровождается активацией МКТ, который транспортирует лактат и H^+ в межклеточное пространство. Лактат посредством МКТ поступает в клетки стромы, эндотелия и другие клеточные структуры, где превращается в пируват под действием лактатдегидрогеназы и становится источником энергии для этих клеток. Подкисление межклеточного пространства в опухоли является важным фактором опухолевой прогрессии. Кислая среда (рН 6,5–7,0) вызывает активацию металлопротеаз, которые разрушают белки матрикса, что способствует инвазии и метастазированию. Таким образом, гликолиз является не только поставщиком энергии, но и участвует в развитии опухолевого процесса. Исходя из этого, можно сделать предположение, что аэробный гликолиз в опухолевых клетках (эффект Варбурга) является не результатом поломки системы регуляции белка HIF-1 α , а регуляторным механизмом, поддерживающим процесс развития опухоли.

Одним из возможных подходов к терапии опухолей может быть ингибирование гипоксического состояния опухолевой ткани путем блокирования функции белка HIF-1 α . На модели культур опухолевых клеток показано, что введение siРНК против HIF-1 α нормализует такие клетки по многим параметрам. Однако попытки создать специфический и эффективный ингибитор HIF-1 α успеха пока не принесли. Гликолиз при гипоксии является, по-видимому, основным источником АТФ в клетке, и блокирование гликолиза должно вызывать «обезэнергичивание» клеток и, как следствие, ингибирование их роста или гибель. Поэтому в настоящее время исследуется действие ингибиторов гликолиза и их противоопухолевый эффект.

Широко изучается действие 2-дезоксиглюкозы (2-ДГ). Это соединение — аналог глюкозы. Оно фосфорилируется каталазой, образуя 2-ДГ-фосфат, соединение, которое не может далее метаболизироваться и накапливается в клетке, блокируя активность каталазы. В результате действия 2-ДГ происходит падение уровня образующегося АТФ. Это вызывает изменение соотношения аденозинмонофосфат (АМФ)/АТФ в пользу АМФ [17]. В результате активируется серин/трео-

ниновая АМФ-киназа, что приводит к ингибированию активности киназы mTOR. Одной из важных функций mTOR является активация белка трансляции S6-киназы. Ингибирование mTOR вызывает ингибирование пролиферации. Исследование действия 2-ДГ на опухолевые клетки показало, что это соединение способно как ингибировать рост клеток, так и вызывать в некоторых линиях опухолевых клеток апоптоз. Блокирование пролиферации, по-видимому, связано с перечисленными выше эффектами 2-ДГ. Механизм проапоптотического действия 2-ДГ не совсем понятен. С одной стороны, это действие, возможно, связано с тем, что 2-ДГ способствует отщеплению гексокиназы II от поверхности митохондрий и освобождению VDAC. С другой стороны, показано, что 2-ДГ вызывает падение уровня антиапоптотического белка семейства Bcl-2 — Mcl-1 [17, 18]. Применение 2-ДГ в некоторых случаях увеличивает эффект противоопухолевой терапии. Так, показано, что 2-ДГ усиливает противоопухолевое действие облучения в опытах *in vitro* и *in vivo* [19], 5-фторурацила [20], таксола [21], соединений группы АВТ-ингибиторов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [22].

Другой ингибитор гексокиназы II — лонидамин, производное имидазол-3-карбоксилловой кислоты, взаимодействующее с гексокиназой, — также уменьшает уровень АТФ [23] в клетке и потенцирует противоопухолевое действие цитостатиков: усиливает эффект облучения, как и 2-ДГ [24], и действие доксорубина [23]. Усиление противоопухолевого эффекта цитостатиков при действии ингибиторов ферментов гликолиза связано также с тем, что в результате уменьшения количества АТФ в клетке снижается активность белков множественной лекарственной устойчивости [23, 25], что приводит к накоплению в опухолевых клетках цитостатика.

Необходимым условием перехода клеток на гликолиз является «отключение» дыхательной цепи митохондрий. При гипоксии синтезируется киназа пируватдегидрогеназы, которая ингибирует активность пируваткиназы, образующей из пирувата ацетилкоэнзим А, источника окислительных субстратов для дыхательной цепи митохондрий. Ее «отключение» в условиях нехватки кислорода связано, по-видимому, с тем, что в дыхательной цепи в этих условиях образуются активные формы кислорода в количестве, способном вызвать токсический эффект в клетке. Таким образом, ингибирование киназы пируватдегидрогеназы может вызвать гибель клеток, находящихся в состоянии гипоксии. В качестве ингибитора киназы пируватдегидрогеназы используется дихлорацетат (ДХА). На опухолевые клетки он действует по нескольким механизмам. Показано, что при действии ДХА в клетках опухоли образуются активные формы кислорода [26], вызывающие апоптоз. Уменьшается уровень лактата и увеличивается рН опухолевой ткани [27]. Также вероятно, что «включение» дыхательной цепи в усло-

виях недостатка кислорода вызывает нарушение функционирования других клеточных систем, потребляющих кислород: синтеза стеролов, функций оксидаз, гидролаз и др. Показано, что многие опухоли чувствительны к действию ДХА. Так, он вызывает апоптоз и уменьшает скорость роста клеток глиомы С6 в опытах *in vivo* и *in vitro* [26], аденокарциномы молочной железы крыс 13762 МАТ [28]. В культуре клеток опухоли кишечника ДХА снижал скорость роста клеток и стимулировал апоптоз, не влияя при этом на функции нормальных клеток [29]. Продемонстрировано, что ДХА уменьшает метастазирование [28]. Как и ингибиторы гексокиназы, он усиливает противоопухолевый эффект цитостатиков и радиации. Так, сочетание ДХА + омепразол оказывало более эффективное тормозящее действие, чем один ДХА или один омепразол, на пролиферацию клеток фибросаркомы НТ1080 и опухоли кишечника RKO, но не действовало на пролиферацию фибробластов человека WI-38 [30]. Комбинация цисплатина и ДХА при действии на клетки HeLa приводит к значительному синергетическому эффекту благодаря различию в механизмах их действия, вызывающих апоптоз. *In vivo* ксенографт этой опухоли также чувствителен к совместному действию цисплатина и ДХА [31]. ДХА увеличивает чувствительность клеток опухоли желудка с высоким уровнем экспрессии киназы пируватдегидрогеназы, который ассоциируется с плохим прогнозом, к действию 5-фторурацила [32]. Токсическое действие на опухолевые клетки A549 и SCC25 при совместном введении ДХА с противоопухолевым соединением сулиндак (sulindac), чей эффект обусловлен образованием активных форм кислорода, резко усиливается [33].

Заключение

Таким образом, гипоксия является важным фактором опухолевого процесса. Гликолиз, сопровождающий гипоксию, не толькоставляет энергию взамен «отключенной» дыхательной цепи, но и, благодаря образованию лактата и вызываемому им подкислению ткани опухоли, способствует метастазированию и инвазии. Это подтверждают следующие факторы. Во-первых, наибольшая степень инвазии наблюдается в областях опухоли с минимальным рН, а в областях опухоли с нормальным рН инвазия отсутствует [34]. Во-вторых, соединения, увеличивающие буферную емкость крови и этим препятствующие падению рН в ткани опухоли, такие как бикарбонат натрия, уменьшают спонтанное метастазирование [35, 36]. Из этого следует, что возможным подходом к химиотерапии с воздействием на гликолиз является ингибирование протонных помп, «выбрасывающих» протоны в межклеточную среду и поддерживающих таким образом нужный рН в опухолевых клетках. Блокирование этих каналов вызывает понижение рН внутри клеток, что способно привести к их гибели. Помимо этого, появляется возможность разработки препаратов (например, алкилирующих агентов, разобщителей дыхания и фосфорилирования), эффект которых зависит от уровня рН. Использование ингибиторов протонных помп показало эффективность этих соединений на экспериментальных опухолях *in vitro* и *in vivo* [37, 38].

Препараты, ингибирующие различные стадии гликолиза, могут являться важными компонентами противоопухолевого воздействия, усиливая действие цитостатиков и не влияя на функционирование нормальных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123(3191):309–14.
- Lee K.A., Roth R.A., LaPres J.J. Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacol Ther* 2007;13(2):229–463.
- Kobliakov V.A. Mechanisms of tumor promotion by reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 2010;75(6):675–85.
- Zhao T., Zhang C.P., Liu Z.H. et al. Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells-role of hypoxia-inducible transcription factor-1alpha. *FEBS J* 2008;275(8):1824–34.
- Lee S.H., Lee M.Y., Han H.J. Short-period hypoxia increases mouse embryonic stem cell proliferation through cooperation of arachidonic acid and PI3K/Akt signalling pathways. *Cell Prolif* 2008;41(2):230–47.
- Lin Q., Lee Y.J., Yun Z. Differentiation arrest by hypoxia. *J Biol Chem* 2006;281(41):30678–83.
- Di Carlo A., De Mori R., Martelli F. et al. Hypoxia inhibits myogenic differentiation through accelerated MyoD degradation. *J Biol Chem* 2004;279(16):16332–8.
- Robertson S.E., Weaver V.M., Simon M.C. Hypoxia-inducible factor regulates alphavbeta3 integrin cell surface expression. *Mol Biol Cell* 2005;16(4):1901–12.
- Krishnamachary B., Berg-Dixon S., Kelly B. et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res* 2003;63(5):1138–43.
- Piret J.P., Minet E., Cosse J.P. et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280(10):9336–44.
- Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007;581(19):3582–91.
- Comerford K.M., Wallace T.J., Karhausen J. et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002;62(12):3387–94.
- Gwak G.Y., Yoon J.H., Kim K.M. et al. Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. *J Hepatol* 2005;42(3):358–64.
- Lu C.W., Lin S.C., Chen K.F. et al. Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J Biol Chem* 2008;283(42):28106–14.
- Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L. et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3(3):177–85.

16. Kim J.W., Dang C.V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 2005;30(3):142–50.
17. Pradelli L.A., Bénéteau M., Chauvin C. et al. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. *Oncogene* 2010;29(11):1641–52.
18. Meyne O., Zunino B., Haplo L. et al. Caloric restriction modulates mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice. *Blood* 2013;122(14):2402–11.
19. Farooque A., Afrin F., Adhikari J.S. et al. Protection of normal cells and tissues during radio- and chemosensitization of tumors by 2-deoxy-D-glucose. *J Cancer Res Ther* 2009; Suppl 1:S32–5.
20. Cheng Y., Diao D., Zhang H. et al. High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-D-glucose. *Biomed Rep* 2014;2(2):188–92.
21. Zhang Q., Gan H., Cheng Z. et al. 2-Deoxy-D-glucose combined with Taxol inhibits VEGF expression and induces apoptosis in orthotopically transplanted breast cancer in C3H mice. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2014;34(2):193–6.
22. Yamaguchi R., Perkins G. Finding a Panacea among combination cancer therapies. *Cancer Res* 2012;72(1):18–23.
23. Fanciulli M., Bruno T., Giovannelli A. et al. Energy metabolism of human LoVo colon carcinoma cells: correlation to drug resistance and influence of lonidamine. *Clin Cancer Res* 2000;6(4):1590–7.
24. Kalia V.K., Prabhakara S., Narayanan V. Modulation of cellular radiation responses by 2-deoxy-D-glucose and other glycolytic inhibitors: implications for cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 2009;5Suppl 1:S57–60.
25. Floridi A., Bruno T., Miccadei S. et al. Enhancement of doxorubicin content by the antitumor drug lonidamine in resistant Ehrlich ascites tumor cells through modulation of energy metabolism. *Biochem Pharmacol* 1998;56(7):841–9.
26. Duan Y., Zhao X., Ren W. et al. Antitumor activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Onco Targets Ther* 2013;6:189–98.
27. Kumar A., Kant S., Singh S.M. Antitumor and chemosensitizing action of dichloroacetate implicates modulation of tumor microenvironment: a role of reorganized glucose metabolism, cell survival regulation and macrophage differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;273(1):196–208.
28. Sun R.C., Fadia M., Dahlstrom J.E. et al. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120(1):253–60.
29. Madhok B.M., Yeluri S., Perry S.L. et al. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2010;102(12):1746–52.
30. Ishiguro T., Ishiguro M., Ishiguro R. Cotreatment with dichloroacetate and omeprazole exhibits a synergistic antiproliferative effect on malignant tumors. *Oncol Lett* 2012;3(3):726–8.
31. Xie J., Wang B.S., Yu D.H. et al. Dichloroacetate shifts the metabolism from glycolysis to glucose oxidation and exhibits synergistic growth inhibition with cisplatin in HeLa cells. *Int J Oncol* 2011;38(2):409–17.
32. Hur H., Xuan Y., Kim Y.B. et al. Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. *Int J Oncol* 2013;42(1):44–54.
33. Ayyanathan K., Kesaraju S., Dawson-Scully K. et al. Combination of sulindac and dichloroacetate kills cancer cells via oxidative damage. *PLoS One* 2012;7(7):e39949.
34. Estrella V., Chen T., Lloyd M. et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res* 2013;73(5):1524–35.
35. Robey I.F., Baggett B.K., Kirkpatrick N.D. et al. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res* 2009;69(6):2260–8.
36. Ribeiro M.D., Silva A.S., Bailey K.M. et al. Buffer Therapy for Cancer. *J Nutr Food Sci* 2012;2:6–21.
37. Chiche J., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 2010;14(4):771–94.
38. De Milito A., Canese R., Marino M.L. et al. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer* 2010;127(1):207–19.

Endocytosis of the IFNAR1 chain of Type 1 interferon receptor is regulated by diverse E2 ubiquitin conjugation enzymes

Christopher J. Carbone, Hui Zheng, Serge Y. Fuchs

Department of Animal Biology and Mari Lowe Center for Comparative Oncology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, 380 S. University Avenue, Hill 316, Philadelphia, PA 19104, USA

Contact: Serge Y. Fuchs syfuchs@vet.upenn.edu

Ubiquitination of signaling receptors triggers their endocytosis to restrict the extent of cell signaling. Type 1 interferon (IFN1) eliminates its receptor from cell surface via stimulating the ubiquitination of its IFNAR1 chain. While it was suggested that this ubiquitination aids IFNAR1 internalization via relieving a steric hindrance of a linear motif within IFNAR1 from the endocytic machinery, the mechanisms involved remain poorly understood. Here we describe a specific role for two disparate ubiquitin acceptor sites within this receptor. These sites, Lys501 and Lys525/526, exhibit a preference for polyubiquitination via either Lys63- or Lys48-linked chains (K63-Ub and K48-Ub, respectively). Whereas the SCF^{βTrcp} E3 ubiquitin ligase controls either type of ubiquitination-dependent IFNAR1 endocytosis, the specificity of these processes is determined by two different E2 ubiquitin conjugating enzymes, Ubc13 and Cdc34. These enzymes can be directly used by SCF^{βTrcp} E3 ubiquitin ligase to generate either K63-Ub or K48-Ub *in vitro*. Ubc13 is involved in IFNAR1 endocytosis driven by the K63-Ub modification of Lys501, whereas the K48-Ub-specific Cdc34 affects receptor endocytosis via ubiquitin conjugation that occurs on Lys525/526. Both types of linkages combine to maximize IFNAR1 endocytosis otherwise suppressed by unfavorable conformation dependent on the presence of a conserved Pro470 within the intracellular domain of IFNAR1. We propose a model where alternate utilization of both E2s to assemble diverse polyubiquitin linkages cooperates to achieve IFNAR1 intracellular domain conformations and spatial arrangements that favor a maximal rate of receptor endocytosis.

Key words: IFNAR, interferon, receptor, ubiquitin, endocytosis, E2

Endocytosis of cell surface signaling receptors is a key mechanism that controls the availability of these receptors to interact with the extracellular cognate ligands and, accordingly, restricts the extent and duration of cellular responses to these ligands. Among post-translational modifications that contribute to this regulation is protein ubiquitination. This process of covalent attachment of ubiquitin polypeptides involves the cascade of enzymatic reactions mediated by ubiquitin activating enzymes (E1), ubiquitin conjugating enzymes (E2) and ubiquitin ligases (E3, reviewed in [1]). Ubiquitination of receptors has emerged as a central mechanism that determines the efficacy of receptor endocytosis and downregulation [2–4].

The type of ubiquitination (mono-ubiquitination versus poly-ubiquitination and, in the latter case, the topology of the polyubiquitin chain) and its requirement for internalization and/or post-internalization sorting varies greatly among different receptors. Numerous studies have highlighted the role of polyubiquitination via the Lys63-linked chains in controlling endocytosis of many cell surface proteins, including uracil permease [5], nerve growth factor receptor TrkA [6], MHC class II proteins [7], prolactin receptor [8], chimeric model endocytic proteins [9], the IFNAR1 chain of the Type 1 interferon (IFN1) receptor [10] and others.

Intriguingly, the rate of endocytosis of IFNAR1, a receptor that plays a key role in IFN1 signaling [11–13], was compromised by overexpression of either K63R or K48R ubiquitin mutants suggesting that polyubiquitination via both Lys63 and Lys48 linkage types (K63-Ub and K48-Ub,

respectively) might be required [10]. IFNAR1 is a substrate for the SCF^{βTrcp} E3 ubiquitin ligase, which is recruited to the receptor upon its phosphorylation within a specific phospho-degron [14, 15], and is capable of building both K63-Ub and K48-Ub on IFNAR1 *in vitro* [10]. Although ubiquitination can occur on many Lys residues within the intracellular domain of IFNAR1, a cluster of three lysines (Lys501, Lys525 and Lys526) receives a large share of ubiquitin conjugates [14] and the integrity of this cluster is required for efficient IFNAR1 endocytosis [10]. Ubiquitination of this cluster unmasks an adjacent Tyr466-based linear endocytic motif (otherwise blocked by IFNAR1-associated TYK2 Janus kinase), enabling its interaction with the AP2 adaptin complex and subsequent internalization via the clathrin-dependent pathway [10, 16]. While these studies suggest a model where ubiquitination of IFNAR1 leads to either TYK2 dissociation or conformational changes within the intracellular domain of IFNAR1 (reviewed in [17, 18]), many critical questions remain unanswered.

Mass spectrometry analysis revealed the presence of K63-Ub and K48-Ub on wild type IFNAR1 [10], however it remains unclear whether both types of ubiquitin chains (or mixed chains) need to be assembled on IFNAR1 or on a putative endocytic regulator. Furthermore, the determinants of topology specificity (including specific ubiquitin acceptors within the Lys501, 525, 526 cluster and specific E2 conjugation enzymes utilized by SCF^{βTrcp} E3 ligase) are yet to be determined. Finally, the mechanism by which either type of ubiquitination contributes to the regulation of IFNAR1 endocytosis remains largely unknown.

Here we focused on specific role of diverse E2 conjugating enzymes in mediating either K63-Ub or K48-Ub on different lysine acceptors within IFNAR1 in internalization of this receptor. Our data indicate that a combined effect of both types of linkages maximizes the rate of IFNAR1 internalization and suggest that IFNAR1 ubiquitination may be conducive for the intracellular domain of IFNAR1 to adopt a spatial conformation favorable for IFNAR1 endocytosis.

Experimental procedures

Plasmids and cells

The constructs for expression of HA-tagged wild type, K48R, and K63R ubiquitin [19] were kindly provided by Yossef Yarden (Weitzmann Institute). Construct for expression of IFN-stimulated response element (ISRE) – driven luciferase [20] was a generous gift from Curt Horvath (Northwestern University). Human IFNAR2 expression vector was kindly provided by John Krolewski (UC Irvine). Construct for expression of dominant negative Ubc13C87A mutant was provided by Zhijian J Chen (UT Southwestern). Vectors for the expression of N-terminal FLAG-tagged human IFNAR1 (wild type and K501, 525, 526R mutants) were described previously [10]. These plasmids served as a backbone for generating additional N-FLAG-IFNAR1 constructs for expression of K501R and K525, 526 mutants using the site-directed mutagenesis; the results were verified by DNA sequencing. The shRNA constructs for knocking down bTrcp were described previously [8, 21]. The siRNA oligonucleotides for knocking down Cdc34 and Ubc13 were obtained from Sigma.

Human embryo kidney 293T cells, mouse embryo fibroblasts, and HeLa cells (ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagles's medium containing 10 % heat inactivated fetal bovine serum and Penicillin/Streptomycin. The stable U2OS-derivative cells lines for knock-in of ubiquitin or Ubc13 mutants were kindly provided by Zhijian J Chen. These cells were maintained and used as described previously [22]. Briefly, addition of tetracycline (1 µg/mL for 72 h) to these cells silences expression of either endogenous ubiquitin or endogenous Ubc13 concurrent with induction of expression of exogenous RNAi-resistant ubiquitin (wild type or K63R mutant) or Ubc13 (wild type or C87A catalytically inactive mutant). Cells were transfected with Lipofectamine Plus, Lipofectamine 2000, or Oligofectamin (Invitrogen) depending on the cell type and the experiment. For all transfections, empty vectors were included in the mixtures to maintain an equal amount of transfected DNA.

Chemicals, antibodies, reporter assays, and immunotechniques

Murine IFNβ was expressed in Chinese Hamster Ovary cells, and purified to homogeneity from conditioned culture medium using successive Blue Sepharose, copper chelating Sepharose, lentil lectin Sepharose, and Uno S (Biorad) cationic ion exchange chromatographies. The specific activity of the protein was 2×10^8 units/mg in an *in vitro* antiviral

cytopathic effect assay using murine L929 cells challenged with encephalomyocarditis virus. The purified protein had an endotoxin level of < 0.05 EU/mg. Human IFNα2 (Roferon) was purchased from Roche. Cycloheximide and other chemicals were purchased from Sigma. Antibodies against FLAG (M2; Sigma), ubiquitin (FLys2; BIOMOL), HA (12CA5, Roche Boehringer Mannheim) were purchased. Secondary antibodies were obtained from Invitrogen and Roche Boehringer Mannheim. Immunoprecipitation and immunoblotting procedures were described previously [23–25].

For reporter assays, mouse embryo fibroblasts were co-transfected with plasmids encoding human IFNAR2, ISRE-firefly luciferase (with a vector for constitutive expression of renilla luciferase), and various human IFNAR1 constructs. 24 h post-transfection, cells were treated with human IFNα or mouse IFNβ (at 2000 U/mL) for 30 min. Then the media was removed and cells were incubated for 24 h without IFN, harvested, and luciferase activity was determined using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). Data (normalized to renilla luciferase activity) from three independent experiments (each in five replicates) are presented in arbitrary units as Mean $\pm$ S.E. P values were calculated using the two-tailed Students' t-test.

IFNAR1 ubiquitination assays

In vitro ubiquitin ligation reactions were carried out as described previously [24] using SCF^{βTrcp} purified from 293T cells as outlined elsewhere [26] and recombinant E2s including recombinant Cdc34 ([27], a gift from Zhen-Qiang Pan, Mount Sinai School of Medicine) or 6His-Ubc13/Uve1 ([28, 29], a gift from Ze'ev Ronai, The Burnham Institute). Briefly, 10 µl of packed beads carrying immobilized SCF^{βTrcp}-HA was incubated with E1 (20 pmol), mCdc34 or 6His-Ubc13/Uve1 (1 nmol) in the reaction mixture (total volume 30 µl) that contained 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM NaF, 2 mM ATP, 0.6 mM DTT, and 1 µg ubiquitin. The mixture was incubated at 37 °C for 60 min, boiled in 20 µl of Laemmli loading buffer, separated on SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting.

For assessing *in vivo* ubiquitination of IFNAR1, the FLAG-tagged IFNAR1 species were expressed in 293T cells. Cells were harvested and lysed in 1 % NP40, 50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM NaVO₄, 1 mM PMSF, 2.5 mM EDTA, Protease Inhibitor Cocktail (1:500; Sigma), 1 mM NaF, and 20 mM N-ethyl maleimide. The protein concentration was determined using the Bradford dye-binding assay. Equal amounts of protein lysates were incubated with M2-conjugated beads to immunoprecipitate the FLAG-tagged IFNAR1. The samples were washed three times with 50 mM Tris pH 7.4, 5 % glycerol, 1M NaCl and one time with 50 mM Tris pH 7.4, 5 % glycerol, 150 mM NaCl and after boiling with SDS-containing Laemmli buffer, an aliquot from each sample was analyzed by M2 FLAG immunoblotting to normalize the receptor levels. Based on normalization, amounts of lysates that would yield comparable levels of IFNAR1 were separated

by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using either anti-ubiquitin antibody (Biomol) or the chain-specific anti-polyubiquitin, K63-Ub or K48-Ub antibodies (Millipore).

IFNAR1 internalization assays

Internalization of endogenous or exogenously expressed IFNAR1 was determined using a high throughput fluorescence-based method described in detail elsewhere [10, 16]. Briefly, cells in 60-mm dishes were transfected with the indicated constructs or induced with tetracycline and plated equally on 24 well poly-D-lysine plates (Becton, Dickinson and Company). Cells were starved in serum-free Dulbecco's Modified Eagle's medium and were either treated with IFN α 2a for the indicated time periods, or were kept on ice and not exposed to IFN α 2a (time point 0). At given time points, the cells were washed, blocked, and incubated with the anti-IFNAR1 AA3 antibody [30] or anti-FLAG M2 antibody. The primary antibodies were then removed and the cells were washed extensively before adding a goat anti mouse IgG H + L horse radish peroxidase-conjugated antibody. Following another series of washes, the cells were incubated with AmplexRed Ultra Reagent 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Molecular Probes). Aliquots were transferred to black 96-well plate (NUNC) and fluorescence was measured by reading with Beckman Coulter DTX880 Multimode Detector plate reader using a 530 nm filter for excitation and a 590 nm filter for emission. Results were calculated using the following formula:

$$\% \text{ Internalized} = 100 - [(V_s - V_b) \times t_n / (V_s - V_b) \times t_0] \times 100,$$

where: V_s = Value of samples, V_b = Value of background (mock-transfected or probed with irrelevant antibody), t_n = time point n , t_0 = time point 0.

Results

Given that that SCF ^{β Trcp} E3 ligase was shown to actively utilize Cdc34 E2 ubiquitin conjugating enzyme for K48-Ub of proteasomal substrates such as I κ B α [27], we proposed a role for this E2 in IFNAR1 ubiquitination and endocytosis. Conversely, whereas K63-linkage-specific ubiquitination of proteins *in vitro* can be achieved using a number of E2 enzymes, the ubiquitin-conjugating enzyme 13 (Ubc13, in complex with either Uev1A or Mms2) was shown to play a key role in assembling these linkages *in vivo* and in K63-dependent processes such as DNA recombination [31] and damage repair [32], and activation of signal transduction pathways [33–35].

We used the RNAi approach to determine the role of these E2s in IFNAR1 ubiquitination and internalization. Knockdown of Cdc34 inhibited K48-Ub of IFNAR1 assessed by immunoblot using chain-specific antibody (Figure 1A). Conversely, K63-Ub of IFNAR1 was impaired in cells that received RNAi against Ubc13 (Figure 1A). Given that SCF ^{β Trcp} was capable of utilizing either of these

enzymes for chain-specific ubiquitin ligation *in vitro* (Figure 1B) it is likely that both Cdc34 and Ubc13 may contribute to the regulation of IFNAR1 ubiquitination (via K48-Ub and K63-Ub, respectively) in cells. Accordingly, knockdown of either Cdc34 or Ubc13 noticeably slowed the kinetics of internalization of endogenous IFNAR1 in 293T cells (Figure 1C). In addition, expression of the dominant negative Ubc13 mutant (Ubc13^{C87A}, [22]) inhibited the internalization rate of the N-terminally FLAG-tagged wild type IFNAR1 (Figure 1D). Collectively, these data suggest that function of both Cdc34 and Ubc13 is required for maximal rate of IFNAR1 endocytosis.

We then sought to characterize the cluster of ubiquitin acceptor sites within IFNAR1. While the triple K501R/K525R/K526R (IFNAR1^{3KR}) mutant was shown to be deficient in overall ubiquitination [14], internalization and trafficking to the lysosomes [10], and degradation [14], the role of specific acceptors remained unclear. Our initial focus was on the putative “canonical” site represented by the Lys525/526 doublet located 9–10 amino acid residues proximal to the β Trcp binding site (₅₃₄DSGNYS). This site is reminiscent of the Lys21/22 ubiquitin acceptor site within I κ B α (Figure 2A) and fits the description of preferred ubiquitin acceptors for the SCF ^{β Trcp} E3 ligase (reviewed in [36]). Consistent with previously reported data [10], the internalization of the IFNAR1^{3KR} mutant was markedly inhibited. Intriguingly, mutation of either the canonical (Lys525/526) or the additional (Lys501) site resulted in an intermediate phenotype; these mutants internalized slower than wild type IFNAR1 but faster than the IFNAR1^{3KR} mutant (Figure 2B). This result indicates that both Lys525/526 and Lys501 sites within the ubiquitin acceptor cluster contribute to the maximal rate of IFNAR1 endocytosis.

Based on these results we next aimed to determine whether ubiquitination of IFNAR1 on either canonical or additional site plays a role in regulating IFNAR1 stability and signaling. Proteolytic turnover of FLAG-IFNAR1 was assessed by a cycloheximide chase assay. IFNAR1^{3KR} mutant lacking both canonical and additional sites displayed a longer half-life compared to the wild type protein (Figure 2C). This result is consistent with previously reported data [14]. An intermediate turnover rates were observed for both K501R and K525/526R mutants (Figure 2C) indicating that ubiquitination of both canonical and additional sites contributes to efficient degradation of IFNAR1.

To test whether these mutants were functional, we co-expressed them together with human IFNAR2 in mouse embryo fibroblasts and assessed activation of the ISRE-driven luciferase. Expression of human IFNAR1 proteins did not affect induction of luciferase by murine IFN β that functions through the endogenous murine type 1 IFN receptor (Figure 2D, blue bars) indicating that IFN signaling downstream of receptors is not greatly perturbed by the expression of these human proteins. Whereas expression of wild type human IFNAR1 enabled transactivation

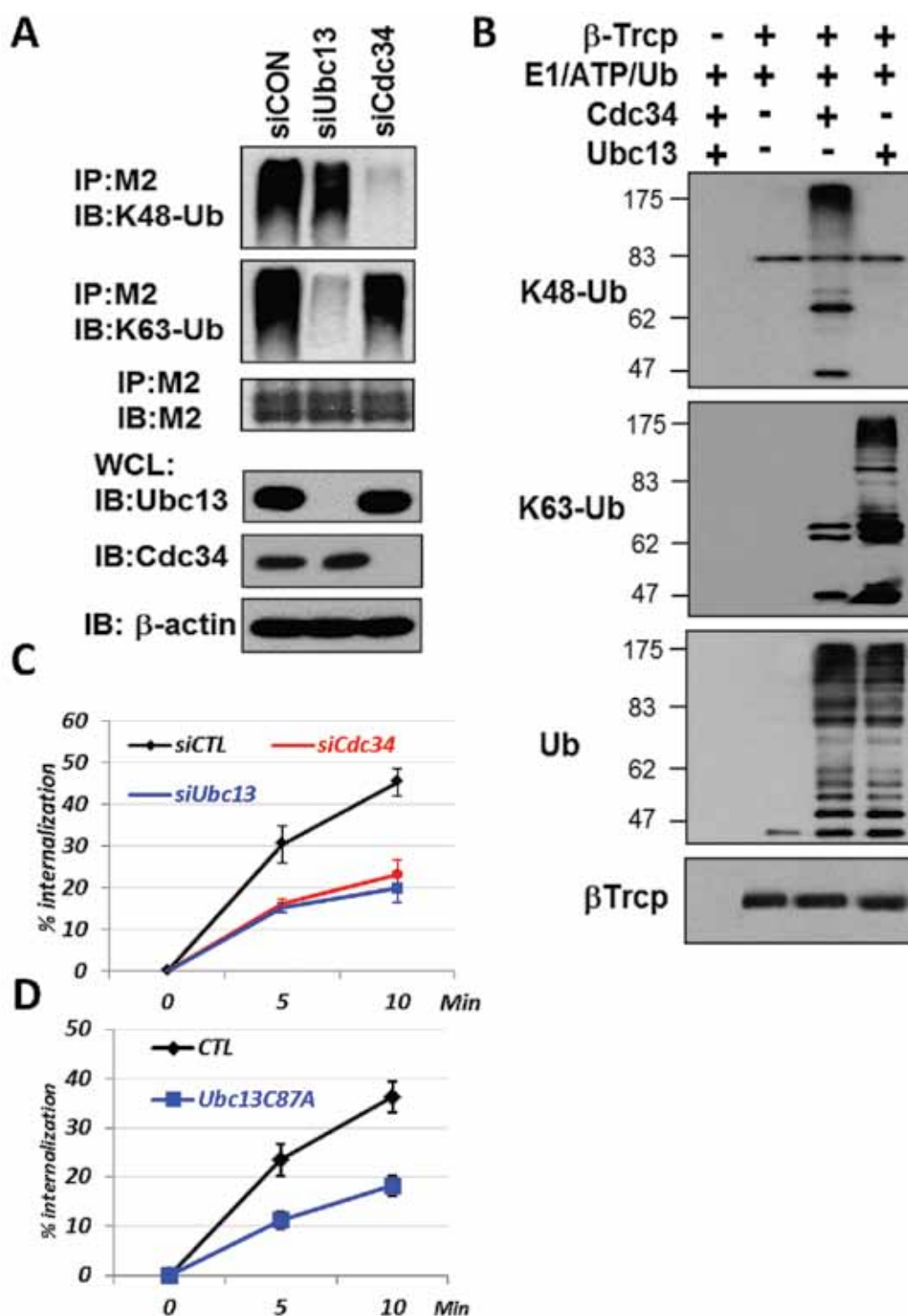


Figure 1. Role of Cdc34 and Ubc13 in IFNAR1 ubiquitination and endocytosis.

(A) Chain-specific polyubiquitination of FLAG-IFNAR1 proteins (purified from IFN α -stimulated 293T by immunoprecipitation) was analyzed by immunoblot using the anti-K63-ubiquitin and anti-K48-ubiquitin antibodies as well as antibody against FLAG (M2). Protein levels of endogenous Ubc13 or Cdc34 in the whole cell lysates (WCL) from these cells were measured by immunoblotting using indicated antibodies. An immunoblot for β -actin is included as a loading control.

(B) In vitro ubiquitin ligation reaction catalyzed by the SCF ^{β Trcp} E3 ubiquitin ligase (omitted as a negative control in the left lane) in the presence of either Cdc34 or complex of Ubc13/Uev1 was analyzed by immunoblot using the anti-ubiquitin Lys63 and anti-ubiquitin Lys48 antibodies as well as non-link-specific anti-ubiquitin antibody (Ub). Levels of β Trcp were also analyzed.

(C) The effect of Cdc34 or Ubc13 knock down on the internalization of endogenous IFNAR1 in 293T cells treated with IFN α (6000 U/mL) for indicated time points was assessed using anti-IFNAR1 AA3 antibody and shown as a percentage of cell surface immunoreactivity loss calculated from three independent experiments (each in five replicates) as average $\pm$ S. E. M.

(D) The internalization kinetics of FLAG-IFNAR1 in 293T cells that received control vector (CTL, pCDNA3) or vector for expression of Ubc13^{C87A} mutant treated with IFN α (6000 U/mL) for indicated time points was assessed using anti-FLAG antibody and shown as a percentage of cell surface immunoreactivity loss calculated from three independent experiments (each in five replicates) as average $\pm$ S. E. M.

of luciferase by a short pulse treatment with human IFN α , the expression of IFNAR1^{3KR} mutant robustly increased sensitivity of mouse cells to human Type 1 IFN. IFNAR1 mutants lacking either the canonical or the additional site modestly yet significantly increased the effects of human IFN α (Figure 2D, black bars). These results suggest that ubiquitination on either canonical or additional sites contributes to attenuating the cellular responses to Type 1 IFN likely through the regulation of IFNAR1 endocytosis and degradation.

Consistent with the previously reported role of β Trcp2 in ubiquitination of endogenous IFNAR1 [10, 15], knockdown of this protein noticeably decreased the level of ubiquitination of FLAG-IFNAR1^{WT} (Figure 3A). Furthermore, endocytosis of wild type IFNAR1 was also impaired in cells that received RNAi against β Trcp2 (Figures 3B). Importantly, ubiquitination and internalization of IFNAR1 mutants lacking either K525/526 or K501 were also suppressed upon knockdown of β Trcp2 (Figures 3A – B). This result suggests that SCF ^{β Trcp} is responsible for ubiquitination of both canonical and additional sites within IFNAR1 and that efficient endocytosis of IFNAR1 relies upon concerted ubiquitination of these sites governed by the same E3 ubiquitin ligase.

Given that mutation of either canonical or additional sites does not dramatically alter overall ubiquitination of IFNAR1 (Figure 3A) yet noticeably affects its internalization (Figures 2B and 3B), degradation (Figure 2C) and signaling (Figure 2D), a qualitative difference between ubiquitination of these sites cannot be ruled out. Indeed, while quantitative mass spectrometry analysis of polyubiquitin linkages revealed that wild type IFNAR1 is decorated with chains of both K63-Ub and K48-Ub types [10], a greater amount of K63-Ub linkages was found on the K525, 526R mutant (65 ± 18 fmole in FLAG-IFNAR1^{K525, 526R} versus 3 ± 0 fmole in FLAG-IFNAR1^{K501R}; C.C. and S.Y.F. unpublished observations). The recent development of chain topology-specific antibodies has enabled us to seek corroboration of these findings. Probing of immunoblots containing immunopurified IFNAR1 proteins with polyubiquitin chain-specific antibodies revealed that both chain types can be present on wild type IFNAR1 (Figures 1A and 3C). Intriguingly, mutation of the canonical site (Lys525, 526) decreased the levels of K48-Ub whereas the IFNAR1 mutant lacking the additional site (Lys501) displayed a deficient K63 linkage-specific signal (Figure 3C). Even considering that some ubiquitination may occur on the four other Lys residues within the

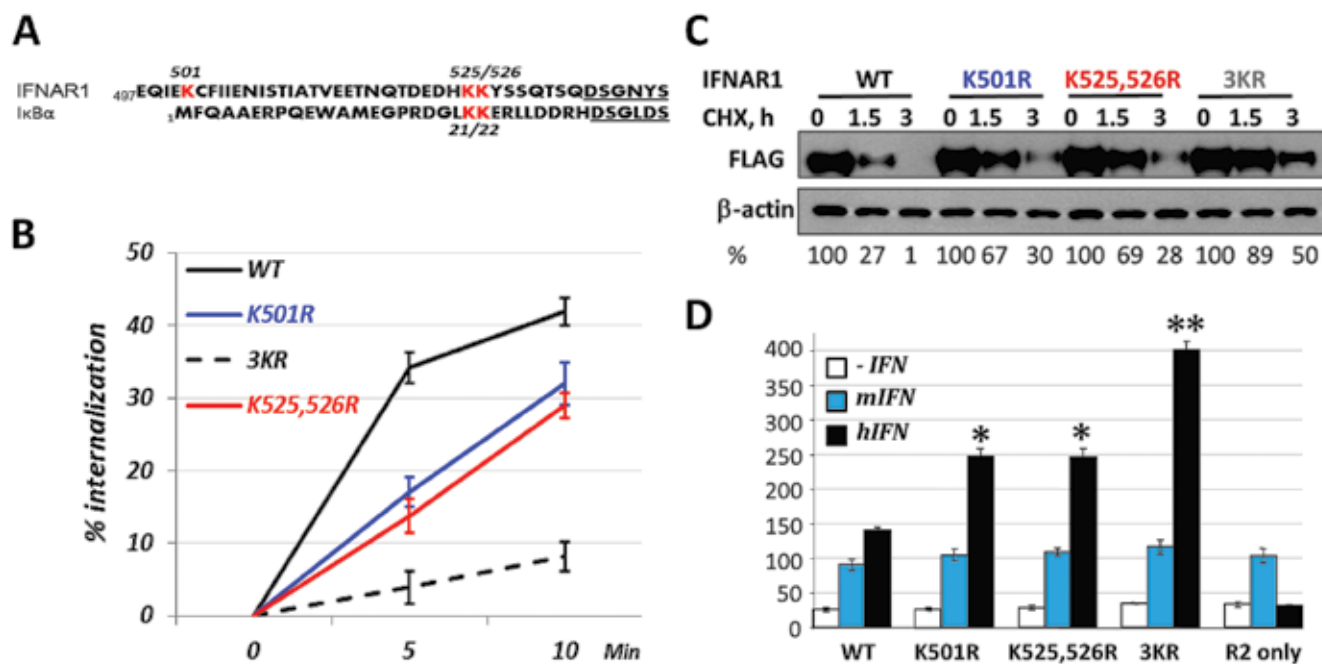


Figure 2. Role of specific ubiquitin acceptor sites in the internalization and degradation of IFNAR1 and IFNAR1-mediated IFN signaling.

(A) Similarities in the primary determinants of β Trcp recruitment site and putative ubiquitin acceptor sites between human IFNAR1 and IkBa.

(B) Internalization rate of indicated FLAG-tagged IFNAR1 proteins expressed in 293T cells treated with IFN α (6000 U/mL) for indicated time points was assessed using anti-FLAG antibody and shown as a percentage of cell surface immunoreactivity loss calculated from three independent experiments (each in five replicates) as average $\pm$ S.E.M.

(C) Turnover rate of indicated FLAG-IFNAR1 proteins was determined in 293T cells treated with IFN α (6000 IU/mL) and cycloheximide (CHX, 20 μ g/mL) for the indicated times. The percentage of IFNAR1 remaining signal (normalized per β -actin signal) relative to time point "0" (assigned a value of 100 %) are depicted below.

(D) Relative activity of ISRE-luciferase reporter expressed in mouse embryo fibroblasts that received human IFNAR2 (R2) and indicated human IFNAR1 expression constructs and that were left untreated (white bars), treated with murine IFN β (blue bars), or human IFN α (black bars). Normalized (per renilla luciferase activity) values from three independent experiments in arbitrary units are presented. Calculated *p* value (< 0.002) was obtained in comparison with WT receptor (single asterisk) or with WT, K501R or K525, 526 mutants (double asterisk)

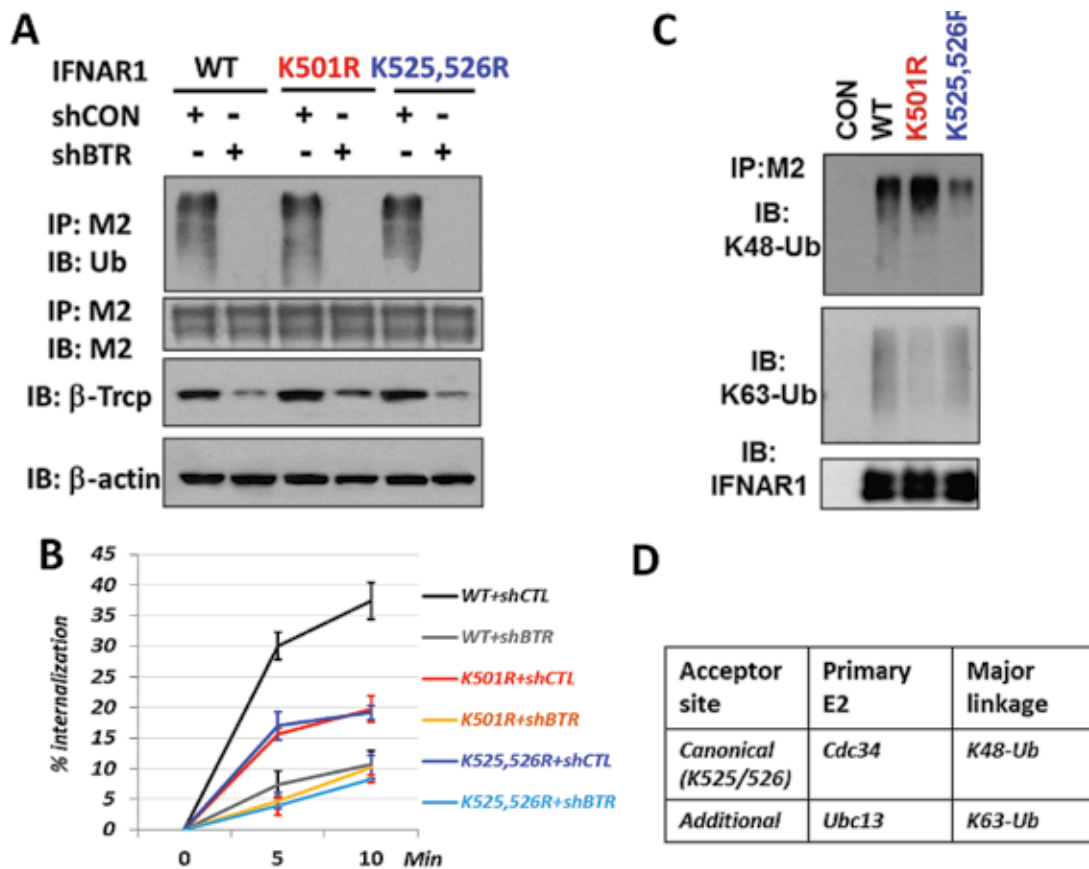


Figure 3. β Trcp-dependent assembly of K63-Ub chains linked to Lys501 and K48-Ub chains conjugated to Lys525, 526 within IFNAR1.

(A) The ubiquitination of indicated FLAG-tagged IFNAR1 proteins in 293T cells that received either a shRNA control (shCON) or shRNA against β Trcp (shBTR) and were treated or not with IFN α (6000 IU/mL, 5 min) was analyzed by denaturing immunoprecipitation using the M2 antibody followed by immunoblotting with the anti-ubiquitin antibody. Inputs for each immunoprecipitated sample were normalized to achieve comparable levels of IFNAR1. Protein levels of endogenous β Trcp and β -actin (included as a loading control) in these cells were also analyzed.

(B) Comparison of internalization rates in cells that received control shRNA against GFP (shCTL) or β Trcp (shBTR) for indicated FLAG-IFNAR1 proteins was performed as in Figure 2B.

(C) K48- and K63-specific polyubiquitination of indicated FLAG-tagged IFNAR1 proteins was analyzed as in panel A. The amount of FLAG tagged IFNAR1 is included as a loading control.

(D) Summary of E2s and types of ubiquitin linkages involved in modification of the canonical and additional acceptor sites within IFNAR1

cytoplasmic domain of IFNAR1 that are outside of the investigated cluster, these data (together with Figure 1A) are suggestive of a scenario where two different ubiquitin acceptor sites may exhibit a preference for diverse types of poly-ubiquitination in a manner dependent on a specific E2 conjugating enzyme (Figure 3D).

We next investigated the importance of these different ubiquitin linkages conjugated to either canonical or additional sites in the regulation of IFNAR1 endocytosis. To this end, we used forced expression of ubiquitin mutants (K63R or K48R) that would prevent elongation of a specific chain in cells. Expression of these specific mutants attenuated the rate of internalization of wild type IFNAR1 receptor by approximately 50 % (reference [10] and data not shown) and noticeably decreased the respective linkage-specific ubiquitination of IFNAR1, protein (Figure 4A). Importantly, the expression of the K48R ubiquitin mutant (but not of K63R) further decreased the efficacy of internalization of IFNAR1^{K501R} (Figure 4B). Conversely, endocytosis of IFNAR1^{K525,526R} was affected by forced

expression of K63R but not of the K48R ubiquitin mutant in 293T cells (Figure 4C).

The latter contribution of K63-linked chains in internalization of IFNAR1 is consistent with the reported role of this modification in the endocytosis of a number of other receptors (for example, TrkA [6]). Most of these studies, including our own work, in mammalian cells relied on forced expression of ubiquitin mutants that terminate elongation of chains of specific linkages. Recent development of isogenic U2OS derivatives in which tetracycline treatment confers knockdown of endogenous ubiquitin along with parallel expression of RNAi-insensitive recombinant ubiquitin (wild type or K63R mutant [22, 37]) enabled us to further determine the role of K63 linkage-specific modifications in IFNAR1 internalization. Consistent with results obtained via forced ubiquitin expression, endocytosis of wild type IFNAR1 was compromised in cells expressing ubiquitin^{K63R} (Figure 4D). Remarkably, these cells displayed a decrease in the internalization rate of the IFNAR1^{K525,526R} mutant but not

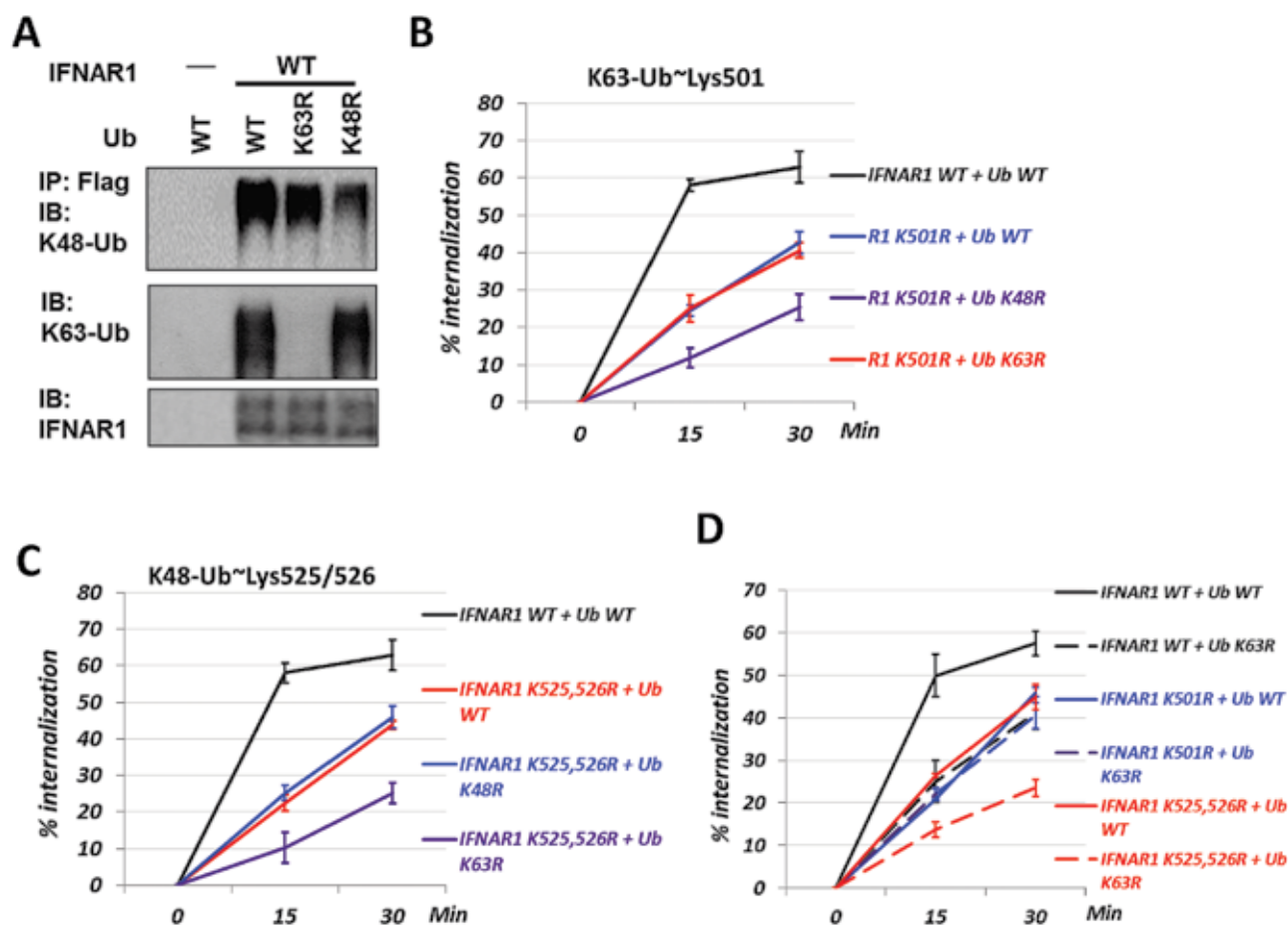


Figure 4. Disparate effect of ubiquitin mutants on the internalization of IFNAR1 proteins that contain either canonical or additional ubiquitin acceptor sites. (A) Chain-specific polyubiquitination of wild type FLAG-IFNAR1 proteins co-expressed with indicated ubiquitin constructs and purified from IFN α -stimulated was analyzed as in panel 3A.

(B) The internalization kinetics of FLAG-IFNAR1^{WT} co-expressed with wild type ubiquitin (WT, black line) was compared with that of FLAG-IFNAR1^{K501R} co-expressed with wild type ubiquitin (blue line), K63R ubiquitin (red line), or K48R ubiquitin (magenta line) in 293T cells. Assays were carried out as in Figure 2B. (C) The internalization kinetics of FLAG-IFNAR1^{WT} co-expressed with wild type ubiquitin (WT, black line) was compared with that of FLAG-IFNAR1^{K525, 526R} co-expressed with wild type ubiquitin (red line), K63R ubiquitin (magenta line), or K48R ubiquitin (blue line) in 293T cells. Assays were carried out as in Figure 2B.

(D) The internalization kinetics of indicated FLAG-IFNAR1 proteins in U2OS cells induced to knock down endogenous ubiquitin and to re-express either wild type ubiquitin (solid lines) or K63R ubiquitin (dashed lines) were carried out as in Figure 2B

of its K501R counterpart (Figure 4D). These results support the presence of the K63-linked chain on the Lys-501 acceptor site. Taken together with protein ubiquitination data, these results indicate that ubiquitination of the canonical K525/526 site via K48-linked chains together with ubiquitination of K501 via the K63-linked chains enables maximal efficacy of IFNAR1 endocytosis.

To further test the hypothesis that diverse E2s may cooperate in contributing to IFNAR1 regulation via diverse site-specific ubiquitination we tested the effects of modulating E2s activities on IFNAR1 internalization. Knockdown of Cdc34 slowed the kinetics of internalization of endogenous IFNAR1 (Figure 1C) and of wild type FLAG-IFNAR1 expressed in 293T cells (Figure 5A). Intriguingly, whereas cells that received RNAi against Cdc34 also retarded internalization of FLAG-IFNAR1^{K501R} mutant, endocytosis of FLAG-IFNAR1^{K525, 526R} protein was not affected (Figure 5A). These data suggest that the role

of K48-Ub in promoting efficient endocytosis of IFNAR1 is facilitated by Cdc34-mediated ubiquitin conjugation to the canonical acceptor site (Lys525/526).

Given that Lys501 of IFNAR1 is ubiquitinated with the K63-Ub that requires Ubc13 (Figures 1A, 3C), we sought to determine whether this E2 was also a regulator of IFNAR1 endocytosis. Knockdown of Ubc13 noticeably inhibited the rate of internalization of wild type IFNAR1 or the IFNAR1^{K525, 526R} mutant but not of the K63-Ub-deficient IFNAR1^{K501R} mutant expressed in 293T cells (Figure 5B). In addition, forced expression of the dominant negative catalytically inactive mutant of Ubc13 (C87A) also decreased the efficacy of internalization of the canonical site-specific mutant and IFNAR1^{WT} but did not alter the endocytosis of IFNAR1^{K501R} (Figure 5C). These results suggest that Ubc13 contributes to the K63-Ub of the additional acceptor site (Lys501) and is important for efficient endocytosis of IFNAR1.

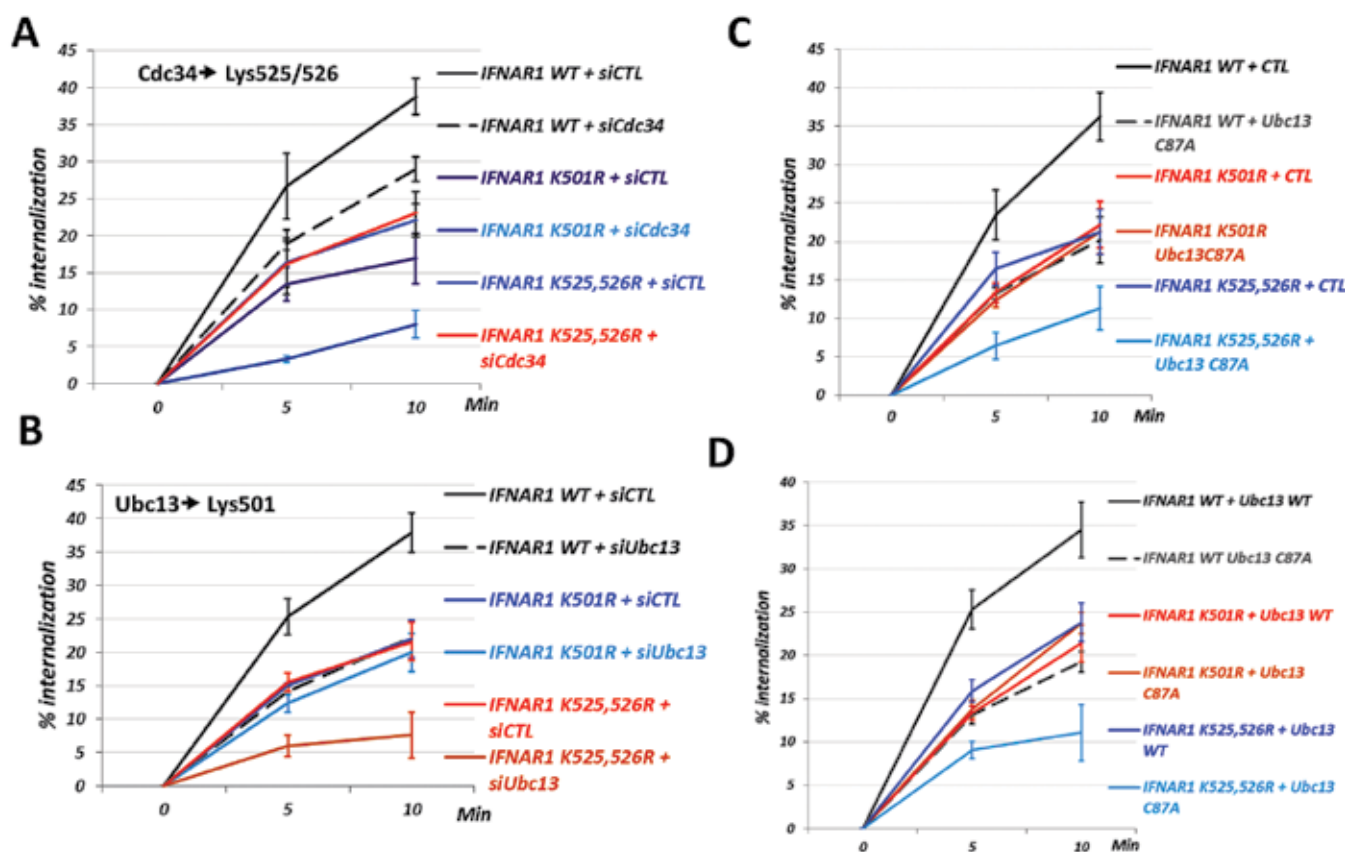


Figure 5. A combined effect of Cdc34-mediated K48-Ub (assembled on Lys525, 526) and of Ubc13-mediated K63-Ub (assembled on Lys501) is required to achieve maximally efficient internalization of IFNAR1.

(A) The internalization kinetics of indicated FLAG-IFNAR1 proteins expressed in 293T cells that received control RNAi (siCTL) or RNAi against Cdc34 was analyzed as in Figure 2B.

(B) The internalization kinetics of indicated FLAG-IFNAR1 proteins expressed in 293T cells that received control RNAi (siCTL) or RNAi against Ubc13 was analyzed as in Figure 2B.

(C) The effect of the catalytically inactive mutant (C87A) of Ubc13 on the internalization of indicated FLAG-IFNAR1 proteins in 293T cells. Transfection of cells with pCDNA3 empty vector was used as a control (CTL). Analyses were carried out as in Figure 2B.

(D) The internalization kinetics of indicated FLAG-IFNAR1 proteins expressed in U2OS cells induced to knock down endogenous Ubc13 and re-express either wild type Ubc13 or the Ubc13^{C87A} mutant. Analyses were carried out as in Figure 2B

We further sought to corroborate these conclusions using the U2OS-based cell lines that enable the inducible replacement of endogenous Ubc13 with recombinant (wild type or C87A mutant) proteins [22]. Internalization of FLAG-IFNAR1^{WT} was clearly impaired in cells that re-express catalytically active mutant of Ubc13 (Figure 5D). A similar result was observed on the K48-Ub-dependent IFNAR1 mutant lacking the additional site (Lys501) but not the K63-Ub dependent mutant (IFNAR1^{K525, 526R}, Figure 5D). Taken together, these results suggest that Ubc13 facilitates an assembly of K63-linked chains on Lys501 of IFNAR1 and this modification cooperates with Cdc34-dependent K48-Ub on Lys525, 526 to contribute to efficient endocytosis of IFNAR1.

It has been previously shown that basal endocytosis of IFNAR1 in naïve human cells is inhibited by its association with TYK2 [38] that serves to shield a specific linear endocytic motif from interacting with the AP2 endocytic machinery complex (Figures 6A – B and Reference [16]). Exposure of cells to Type 1 IFN promotes the recruitment

of βTrcp and ensuing ubiquitination of IFNAR1 [14, 15, 39–41]. Overall, IFN-stimulated site-specific (K501, 525, 526) ubiquitination of IFNAR1 was proposed to stimulate its internalization via unmasking this linear endocytic motif [10] in a manner that remains to be understood.

We next investigated putative mechanisms, through which ubiquitination of IFNAR1 may relieve the linear endocytic motif concealment. Given that association of TYK2 with IFNAR1 was similar for wild type receptor and ubiquitination-deficient IFNAR1^{3KR} mutant (Figure 6C), it seems unlikely that IFNAR1 ubiquitination may facilitate its dissociation from TYK2. Furthermore, while IFNAR1 ubiquitination and internalization is stimulated by IFN [14, 15, 39], it was shown that TYK2 remains associated with IFNAR1 throughout early endocytic events and trafficking stages in subcellular fractions from IFN-treated cells [42]. Thus, we considered an alternative model where IFNAR1 ubiquitination may alter either conformation of its intracellular domain or its spatial arrangement with TYK2 and plasma membrane. A highly conserved proline residue

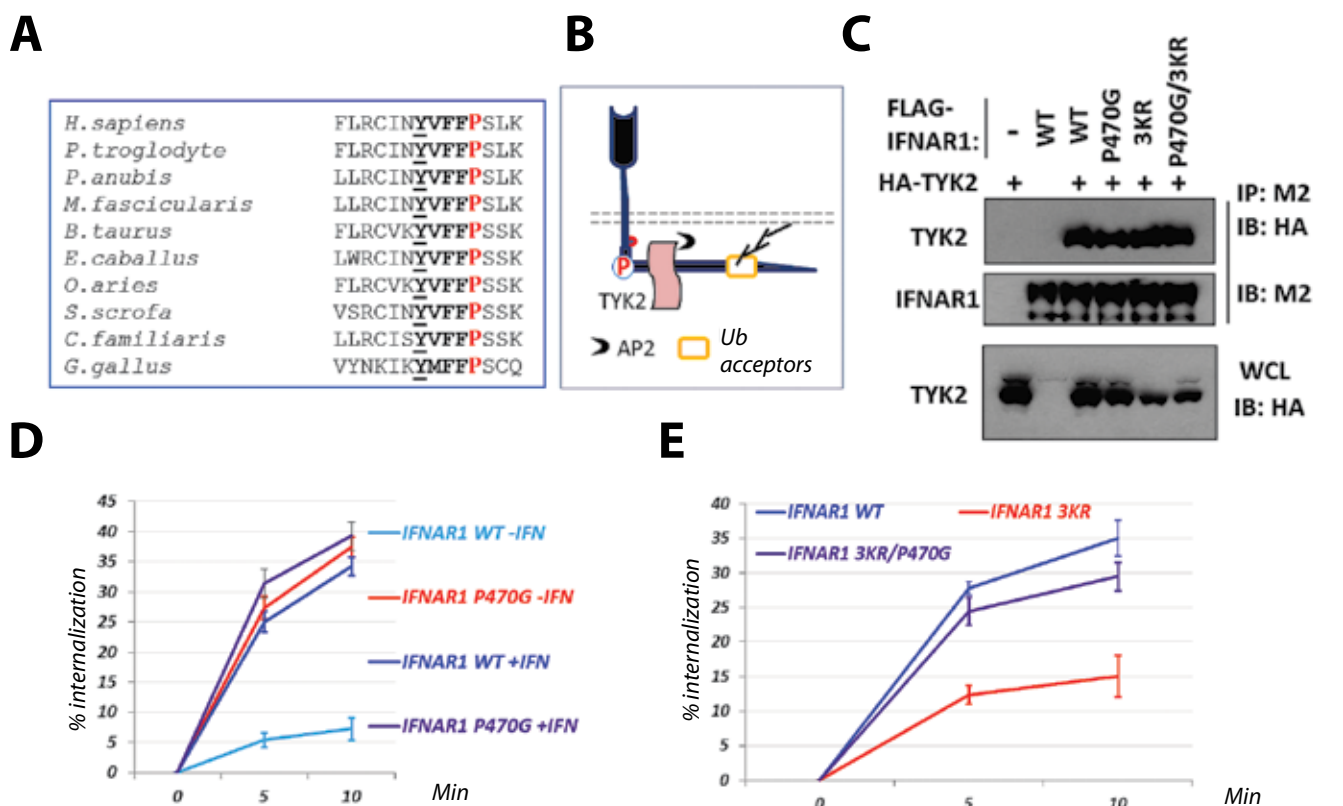


Figure 6. Combined ubiquitination of canonical and additional sites within IFNAR1 acts upstream of IFNAR1 conformational changes regulated by conserved Pro470.

(A) Conservation of a specific Pro residue (P470 in human IFNAR1, red letters) adjacent to the endocytic motif (bold letters, critical Tyr residue that interacts with AP2 is underlined) within IFNAR1 from indicated species.

A hypothetical model that proposes the role of proline-mediated IFNAR1 chain bend along with TYK2 association in masking the endocytic motif (red dot) from AP2 endocytic machinery complex. IFNAR1 ubiquitination is proposed to either dislodge TYK2 or affect spatial arrangements between the endocytic motif, plasma membrane and AP2.

(B) Indicated IFNAR1-FLAG (C-terminal tag) proteins with or without HA-tagged TYK2 were co-expressed in 293T cells. Upon IFN treatment (6000U/ml for 10 min), the cells were harvested and lysed and the proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. After a preliminary immunoblot with anti-FLAG antibody (not shown), different amount of reactions were loaded onto another gel to achieve a comparable level of FLAG-tagged IFNAR1 proteins in each lane. (C) These reactions were analyzed by immunoprecipitation-immunoblotting using the indicated antibodies. Levels of HA-TYK2 in the whole cell lysates (WCL) are also shown.

(D) Internalization rate of indicated FLAG-IFNAR1 expressed in 293T cells was analyzed as described in Figure 2B as well as in the absence of added IFN α (replaced with analogous volumes of PBS).

(E) Internalization rate of indicated FLAG-IFNAR1 expressed in 293T cells was analyzed as described in Figure 2B

distal to the endocytic motif (e. g. Pro470 in human IFNAR1, Figure 6A) may confer a polypeptide chain turn that permits the hindrance of the endocytic motif (Figure 6B). Replacement of this Pro470 with Gly residue to enable chain flexibility generated the IFNAR1^{P470G} protein that efficiently interacted with TYK2 (Figure 6C) yet exhibited a very high rate of internalization even in the absence of IFN treatment (Figure 6D). Strikingly, mutation of this proline residue within the ubiquitination-deficient IFNAR1^{3KR} largely restored the ability of this mutant to undergo efficient internalization (Figure 6E). These results suggest that IFNAR1 ubiquitination functions upstream of conformational/spatial alterations of the intracellular domain of IFNAR1 that ultimately favor efficient endocytosis.

Discussion

Data presented here indicate that the maximal rate of IFNAR1 endocytosis is mediated collectively by the

K48-Ub attached to the Lys525, 526 ubiquitin acceptor sites and by the K63-Ub conjugated to the Lys501 site (Figures 2–5). Although SCF ^{β Trecp} controls the ubiquitin conjugation to the entire Lys cluster important for IFNAR1 endocytosis (Figure 3), these events depend on alternate function of Cdc34 and Ubc13 E2 enzymes for promoting an ubiquitin chain topology-specific internalization (Figure 5).

The Cdc34-dependent conjugation of K48-Ub to the Lys525, 526 sites is consistent with observations reported previously for the proteasomal substrates of bTrecp [36]. Lysines 525 and 526 are located within 9–10 residues proximal from the bTrecp binding site (i. e. degron, 534DSGNYS539) within IFNAR1. In that sense, they represent a canonical acceptor sites for the SCF ^{β Trecp}-mediated ubiquitination similar to Lys21/22 within I κ B α (Reference (14) and Figure 2A). Preference for such location of ubiquitin acceptor sites was indeed reported for bTrecp proteasomal substrate β -catenin [43] and introduc-

tion of double lysine residues at a similar distance from the bTrcp-binding site converted the latent membrane protein 1 of the Epstein-Barr virus from a pseudosubstrate to a bona fide bTrcp substrate [44]. The findings presented here are consistent with above mentioned similarities in acceptor site location between proteasomal substrates of SCF β Trcp and Lys525/526. These data further suggest that multifaceted interactions between SCF β Trcp, Cdc34 as an E2 and either Lys21/22 within I κ B α [27] or Lys525, 526 within IFNAR1 (this study) as a substrate might be conducive for the elongation of the polyubiquitin chain of K48-linked topology.

However, unlike I κ B α which is a cytosolic protein and whose major ubiquitin acceptor sites Lys21/22 are located within a flexible N-terminal region [45], the choice of conjugation sites for IFNAR1 may be affected by the spatial constraints imposed by the anchoring of the transmembrane domain within the plasma membrane. Accordingly, SCF β Trcp may lack flexibility in the selection of either substrate lysine residues within IFNAR1 or the types of chains that can be preferentially built on these residues. Conversely, a different type of chain such as K63-Ub might be built by this E3 ligase on the Lys501 acceptor using an alternative to Cdc34 E2 such as Ubc13. This possibility is consistent with the dependence of the maximal endocytic rate of the IFNAR1^{K525, 526R} mutant on integrity of K63 within ubiquitin and on the levels and catalytic activity of Ubc13 (Figures 4–5). Our results are first to demonstrate that SCF β Trcp can directly utilize Ubc13/Uev1 complex as an E2 enzyme to catalyze elongation of the K63-linked chain in vitro (Figure 1B). Accordingly, a similar mechanism that may occur in vivo would suffice as the simplest explanation for the β Trcp/Ubc13/K63 chain-dependent IFNAR1 endocytosis. However, it remains plausible that requirements for both β Trcp and Ubc13 for K63-linked ubiquitination on Lys501 within IFNAR1 reflect the indirect regulation and may involve additional E2s/E3s.

Possible roles for other E2 enzymes such as the promiscuous members of the UbcH5 family shown to be capable of ubiquitinating IFNAR1 in vitro [10] and demonstrated to play a role in mono-ubiquitination of substrates followed by elongation of either the K48-linked chain (via Cdc34, [27]) or the K63-linked chain (via Ubc13, [46]), are yet to be clarified. Whereas we did not observe a consistent change in the rate of IFNAR1 endocytosis in cells that received RNAi reagents against the

members of UbcH5 family (C.C. and S.Y.F., unpublished data), the role of these E2 species cannot be unequivocally ruled out.

It remains to be determined how these two types of polyubiquitin chains built on two different acceptor substrate lysines with the help of two different E2 enzymes may interact to unmask the linear endocytic motif and to maximize the rate of IFNAR1 internalization. On one hand, it is plausible that the extent of internalization is simply proportional to the overall levels of ubiquitin on the Lys501/525/526 cluster within IFNAR1, and both acceptor sites contribute to the sum by furnishing the type of chain that can be efficiently generated on a given substrate lysine residue because of the constraints of the substrate-ligase-E2 interaction. On the other hand we cannot rule out that these different types of chains may play diverse functions in either recruiting or rearranging the receptor-interacting proteins and that these two functions are complementary in their effects on the IFNAR1 endocytosis rate.

Remarkably, enabling flexibility in the intracellular domain of IFNAR1 via replacing a highly conserved Pro470 with Gly yields a receptor with a very high endocytic rate even in the absence of IFN1 stimulation. Furthermore, introduction of P470G substitution remarkably restored the internalization of a ubiquitination-deficient IFNAR1^{3KR} (Figure 6). This result suggests that ubiquitination of IFNAR1 stimulates its internalization most likely via altering a conformation/spatial arrangement of IFNAR1 intracellular domain. In the context of this model, it is plausible that presence of two types of polyubiquitin chains on IFNAR1 may further promote the adoption of an endocytosis-permissive conformation. Given that the K63-Ub and K48-Ub chains adopt very different conformations [47], interactions between the endocytic motif and endocytic machinery could be augmented and/or stabilized by the presence of both chain types. Future structural studies are warranted to directly investigate this possibility.

Acknowledgments

We thank D.P. Baker, Z.J. Chen, C. Horvath, J. Krolewski, Z. Ronai, Z.Q. Pan and Y. Yarden for the reagents, and J. Peng, B. Varghese and G. Swaminathan for technical help during the early stages of this project. We are grateful to Z.Q. Pan for critical discussion of the manuscript. This work was supported by the NIH grants to S.Y.F.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998;17(24):7151–60.
2. Bonifacino J.S., Weissman A.M. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:19–57.
3. Holler D., Dikic I. Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol* 2004;67(6):1013–7.
4. Huangfu W.C., Fuchs S.Y. Ubiquitination-dependent regulation of signaling receptors in cancer. *Genes Cancer* 2010;1(7):725–34.
5. Galan J.M., Hagenauer-Tsapir R. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination

- of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* 1997;16(19):5847–54.
6. Geetha T., Jiang J., Wooten M.W. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 2005;20(2):301–12.
 7. Duncan L.M., Piper S., Dodd R.B. et al. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J* 2006;25(8):1635–45.
 8. Varghese B., Barriere H., Carbone C.J. et al. Polyubiquitination of prolactin receptor stimulates its internalization, postinternalization sorting, and degradation via the lysosomal pathway. *Mol Cell Biol* 2008;28(17):5275–87.
 9. Barriere H., Nemes C., Lechardeur D. et al. Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in mammalian cells. *Traffic* 2006;7(3):282–97.
 10. Kumar K.G., Barriere H., Carbone C.J. et al. Site-specific ubiquitination exposes a linear motif to promote interferon- α receptor endocytosis. *J Cell Biol* 2007;179(5):935–50.
 11. Constantinescu S.N., Croze E., Wang C. et al. Role of interferon α /beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon α /beta receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(20):9602–6.
 12. Colamonici O.R., Porterfield B., Domanski P. et al. Complementation of the interferon α response in resistant cells by expression of the cloned subunit of the interferon α receptor. A central role of this subunit in interferon α signaling. *J Biol Chem* 1994;269(13):9598–602.
 13. Muller U., Steinhoff U., Reis L.F. et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264(5167):1918–21.
 14. Kumar K.G., Krolewski J.J., Fuchs S.Y. Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *J Biol Chem* 2004;279(45):46614–20.
 15. Kumar K.G., Tang W., Ravindranath A.K. et al. SCF(HOS) ubiquitin ligase mediates the ligand-induced down-regulation of the interferon- α receptor. *EMBO J* 2003;22(20):5480–90.
 16. Kumar K.G., Varghese B., Banerjee A. et al. Basal ubiquitin-independent internalization of interferon α receptor is prevented by Tyk2-mediated masking of a linear endocytic motif. *J Biol Chem* 2008;283(27):18566–72.
 17. Fuchs S.Y. Hope and fear for interferon: the receptor-centric outlook on the future of interferon therapy. *J Interferon Cytokine Res* 2013;33(4):211–25.
 18. Fuchs S.Y. Ubiquitination-mediated regulation of interferon responses. *Growth Factors* 2012;30(3):141–8.
 19. Mosesson Y., Shtiegman K., Katz M. et al. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem* 2003;278(24):21323–6.
 20. Parisien J.P., Lau J.F., Rodriguez J.J. et al. Selective STAT protein degradation induced by paramyxoviruses requires both STAT1 and STAT2 but is independent of α /beta interferon signal transduction. *J Virol* 2002;76(9):4190–8.
 21. Li Y., Kumar K.G., Tang W. et al. Negative regulation of prolactin receptor stability and signaling mediated by SCF (beta-TrCP) E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 2004;24(9):4038–48.
 22. Xu M., Skaug B., Zeng W., Chen Z.J. A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNF α and IL-1 β . *Mol Cell* 2009;36(2):302–14.
 23. Soldatenkov V.A., Dritschilo A., Ronai Z., Fuchs S.Y. Inhibition of homologue of Slimb (HOS) function sensitizes human melanoma cells for apoptosis. *Cancer Res* 1999;59(20):5085–8.
 24. Li Y., Gazdaru S., Pan Z.Q., Fuchs S.Y. Stability of homologue of Slimb F-box protein is regulated by availability of its substrate. *J Biol Chem* 2004;279(12):11074–80.
 25. Liu J., HuangFu W. C., Kumar K.G. et al. Virus-induced unfolded protein response attenuates antiviral defenses via phosphorylation-dependent degradation of the type I interferon receptor. *Cell Host Microbe* 2009;5(1):72–83.
 26. Tan P., Fuchs S.Y., Chen A. et al. Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B α . *Mol Cell* 1999;3(4):527–33.
 27. Wu K., Kovacev J., Pan Z.Q. Priming and extending: a UbcH5/Cdc34 E2 handoff mechanism for polyubiquitination on a SCF substrate. *Mol Cell* 2010;37(6):784–96.
 28. Topisirovic I., Gutierrez G.J., Chen M. et al. Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(31):12676–81.
 29. Laine A., Topisirovic I., Zhai D. et al. Regulation of p53 localization and activity by Ubc13. *Mol Cell Biol* 2006;26(23):8901–13.
 30. Goldman L.A., Zafari M., Cutrone E.C. et al. Characterization of antihuman IFNAR-1 monoclonal antibodies: epitope localization and functional analysis. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19(1):15–26.
 31. Zhao G.Y., Sonoda E., Barber L.J. et al. A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell* 2007;25(5):663–75.
 32. Hofmann R.M., Pickart C.M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 1999;96(5):645–53.
 33. Karin M., Gallagher E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev* 2009;228(1):225–40.
 34. Laine A., Ronai Z. Ubiquitin chains in the ladder of MAPK signaling. *Sci STKE* 2005;2005(281):re5.
 35. Chen Z.J. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):758–65.
 36. Fuchs S.Y., Spiegelman V.S., Kumar K.G. The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* 2004;23(11):2028–36.
 37. Zeng W., Sun L., Jiang X. et al. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* 2010;141(2):315–30.
 38. Ragimbeau J., Dondi E., Alcover A. et al. The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *EMBO J* 2003;22(3):537–47.
 39. Marijanovic Z., Ragimbeau J., Kumar K.G. et al. TYK2 activity promotes ligand-induced IFNAR1 proteolysis. *Biochem J* 2006;397(1):31–8.
 40. Liu J., Plotnikov A., Banerjee A. et al. Ligand-independent pathway that controls stability of interferon α receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367(2):388–93.
 41. Carbone C.J., Zheng H., Bhattacharya S. et al. Protein tyrosine phosphatase 1B is a key regulator of IFNAR1 endocytosis and a target for antiviral therapies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(47):19226–31.
 42. Payelle-Brogard B., Pellegrini S. Biochemical monitoring of the early endocytic traffic of the type I interferon receptor. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30(2):89–98.
 43. Wu G., Xu G., Schulman B.A. et al. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 2003;11(6):1445–56.
 44. Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S. et al. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCF(HOS)/beta-TrCP E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF- κ B activation. *J Biol Chem* 2003;278(49):48942–9.
 45. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621–63.
 46. Windheim M., Peggie M., Cohen P. Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem J* 2008;409(3):723–9.
 47. Tenno T., Fujiwara K., Tochio H. et al. Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes Cells* 2004;9(10):865–75.

Альтернативные убиквитин-конъюгирующие ферменты E2 регулируют эндоцитоз рецептора интерферона-1

Christopher J. Carbone, Hui Zheng, Serge Y. Fuchs

Отдел биологии животных; Центр сравнительной онкологии Мари Лоу, Университет Пенсильвании,
380 S. University Avenue, Hill 316, Philadelphia, PA 19104, USA

Контакты: Serge Y. Fuchs syfuchs@vet.upenn.edu

Автор перевода: Геннадий Альтерович Белицкий

Убиквитинирование сигнальных рецепторов, вызывающее их эндоцитоз, направлено на подавление передачи сигнала. Деградация рецептора интерферона 1-го типа (IFN1) на поверхности клетки осуществляется путем убиквитинирования комплекса лиганда с рецептором (IFNAR1). Принято считать, что убиквитинирование способствует взаимодействию между линейным мотивом комплекса IFNAR1 и соответствующими структурами системы эндоцитоза, однако механизм этого процесса остается неясным. В данной работе изучена роль двух различных акцепторных сайтов убиквитина на этом рецепторе. Предпочтительное полиубикитинирование сайтов Lys501 и Lys525/526 обеспечивается посредством Lys63- или Lys48-связанных цепей (K63-Ub и K48-Ub соответственно). Несмотря на то, что убиквитинлигаза SCF^{FBTrcp} E3 контролирует оба типа убиквитин-зависимого эндоцитоза IFNAR1, специфика этих процессов определяется двумя различными убиквитин-конъюгирующими ферментами E2 – Ubc13 и Cdc34. Эти ферменты могут непосредственно использоваться убиквитинлигазой SCF^{FBTrcp} E3 для создания K63-Ub или K48-Ub *in vitro*. Ubc13 принимает участие в эндоцитозе IFNAR1 путем модификации Lys501 с помощью K63-Ub, в то время как K48-Ub-специфичный Cdc34 изменяет эндоцитоз посредством конъюгации с убиквитином, которая происходит на Lys525/526. Совместный эффект обоих воздействий максимально стимулирует эндоцитоз IFNAR1, который обычно ингибирован конформационным несоответствием, связанным с наличием консервативного Pro470 во внутриклеточном домене IFNAR1.

Мы предлагаем модель, в которой эффекты обоих ферментов E2 объединяют отдельные составляющие системы полиубикитинирования, обеспечивая им взаимодействие с внутриклеточным доменом IFNAR1 при оптимальном пространственном расположении, что дает наибольшую скорость эндоцитоза рецептора.

Ключевые слова: IFNAR, интерферон, рецептор, убиквитин, эндоцитоз, E2

Endocytosis of the IFNAR1 chain of Type 1 interferon receptor is regulated by diverse E2 ubiquitin conjugation enzymes

Christopher J. Carbone, Hui Zheng, Serge Y. Fuchs

Department of Animal Biology and Mari Lowe Center for Comparative Oncology, School of Veterinary Medicine,
University of Pennsylvania, 380 S. University Avenue, Hill 316, Philadelphia, PA 19104, USA

Ubiquitination of signaling receptors triggers their endocytosis to restrict the extent of cell signaling. Type 1 interferon (IFN1) eliminates its receptor from cell surface via stimulating the ubiquitination of its IFNAR1 chain. While it was suggested that this ubiquitination aids IFNAR1 internalization via relieving a steric hindrance of a linear motif within IFNAR1 from the endocytic machinery, the mechanisms involved remain poorly understood. Here we describe a specific role for two disparate ubiquitin acceptor sites within this receptor. These sites, Lys501 and Lys525/526, exhibit a preference for polyubiquitination via either Lys63- or Lys48-linked chains (K63-Ub and K48-Ub, respectively). Whereas the SCF^{FBTrcp} E3 ubiquitin ligase controls either type of ubiquitination-dependent IFNAR1 endocytosis, the specificity of these processes is determined by two different E2 ubiquitin conjugating enzymes, Ubc13 and Cdc34. These enzymes can be directly used by SCF^{FBTrcp} E3 ubiquitin ligase to generate either K63-Ub or K48-Ub *in vitro*. Ubc13 is involved in IFNAR1 endocytosis driven by the K63-Ub modification of Lys501, whereas the K48-Ub-specific Cdc34 affects receptor endocytosis via ubiquitin conjugation that occurs on Lys525/526. Both types of linkages combine to maximize IFNAR1 endocytosis otherwise suppressed by unfavorable conformation dependent on the presence of a conserved Pro470 within the intracellular domain of IFNAR1. We propose a model where alternate utilization of both E2s to assemble diverse polyubiquitin linkages cooperates to achieve IFNAR1 intracellular domain conformations and spatial arrangements that favor a maximal rate of receptor endocytosis.

Key words: IFNAR, interferon, receptor, ubiquitin, endocytosis, E2

Введение

Эндоцитоз сигнальных рецепторов клеточной поверхности является основным механизмом, который контролирует способность этих рецепторов взаимодействовать с аффинными внеклеточными лигандами, ограничивая выраженность и длительность реакции клетки на эти лиганды. Одной из посттрансляционных

модификаций, способствующих этому, является убиквитинирование белка. Процесс ковалентного присоединения к нему полипептидов убиквитина происходит в результате каскада ферментативных реакций, опосредованных убиквитин-активирующими ферментами (E1), убиквитин-конъюгирующими ферментами (E2) и убиквитинлигазой (E3) [1]. Убиквитинирование

рецепторов является центральным механизмом, определяющим эффективность их эндоцитоза и, соответственно, ингибирование функций [2–4].

Тип убиквитинирования (моноубиквитинирование или полиубиквитинирование с топологией полиубиквитиновой цепи) а также вариант интернализации и/или постинтернализационной сортировки определяются в значительной степени типом рецептора. Многочисленные исследования показали, что полиубиквитинирование по Lys63-связанной цепочке играет большую роль в регуляции эндоцитоза многих белков клеточной поверхности, в том числе урацилпермеазы [5], рецептора фактора роста нервов TrkA [6], белков МНС класса II [7], рецепторов пролактина [8], химерных белков эндоцитоза [9], IFNAR1 рецептора интерферона 1-го типа (IFN1) и др. [10].

Интересно, что скорость эндоцитоза IFNAR1, рецептора, который играет ключевую роль в IFN1-сигнализации [11–13], оказалась чувствительной к гиперэкспрессии мутантов убиквитина K63R и K48R. Это вызвало предположение о том, что для полиубиквитинирования необходимы оба лизина, как Lys63, так и Lys48 (K63-Ub и K48-Ub) [10]. IFNAR1 является субстратом для SCF^{βTrcp} убиквитинлигазы E3, которая взаимодействует с рецептором после его фосфорилирования по определенному фосфодегрону [14, 15] и способна присоединить как K63-Ub, так и K48-Ub к IFNAR1 *in vitro* [10]. Убиквитинирование может произойти по многим остаткам Lys внутриклеточного домена IFNAR1, но наибольшее число конъюгатов с убиквитином приходится на кластер из трех лизинов (Lys501, Lys525 и Lys526) [14], наличие которого необходимо для эффективного эндоцитоза IFNAR1 [10]. Убиквитинирование по данной совокупности также обнажает смежный линейный эндоцитозный мотив, связанный с Tyr466, который блокирован IFNAR1-связанной TYK2 Janus-киназой. В результате данный мотив может взаимодействовать с комплексом адаптина AP2 с последующей интернализацией по клатрин-зависимому пути [10, 16]. Хотя эти исследования говорят в пользу схемы, по которой убиквитинирование IFNAR1 приводит к диссоциации TYK2 или конформационным изменениям в пределах внутриклеточного домена IFNAR1 [17, 18], многие важные вопросы остаются без ответа.

Масс-спектрометрический анализ показал присутствие K63-Ub и K48-Ub на диком типе IFNAR1 [10], однако остается неясным, необходима ли сборка обоих типов убиквитиновых цепей (или смешанных цепей) на IFNAR1 или на гипотетическом регуляторе эндоцитоза. Кроме того, предстоит еще выявить факторы, определяющие специфику топологии конкретных убиквитиновых акцепторов в кластерах Lys501, 525, 526 и конкретных конъюгирующих ферментах E2, используемых SCF^{βTrcp} лигазой E3. Таким образом, механизм, с помощью которого каждый тип убиквитинирования вносит свой вклад в регулирование IFNAR1

эндоцитоза, остается в значительной степени неизученным.

Целью данной работы было изучение конкретной роли конъюгирующих ферментов E2, связанных с K63-Ub или K48-Ub на различных акцепторах лизина IFNAR1, в интернализации этого рецептора. Наши данные показывают, что комбинированное воздействие обоих типов связей максимизирует скорость IFNAR1-интернализации, и позволяют предположить, что убиквитинирование IFNAR1 дает возможность внутриклеточному домену этого комплекса принять пространственную конформацию, благоприятную для его эндоцитоза.

Методика эксперимента

Плазмиды и клетки

Конструкции для экспрессии НА-меченного дикого типа, K48R и K63R убиквитина [19] были любезно предоставлены Йосефом Йорденом (Институт им. Вейцмана). Конструкция для экспрессии IFN-стимулированного элемента ответа (ISRE), обусловленного люциферазой [20], любезно предоставлена Куртом Хорватом (Северо-Западный университет). Экспрессионный вектор человеческого IFNAR2 был любезно предоставлен Джоном Кролевски (Калифорнийский университет в Ирвайне). Конструкция для экспрессии доминантно-негативного мутанта Ubc13^{C87A} была предоставлена Чжи Дж. Ченом (Юго-западный медицинский центр Университета Техаса). Векторы для экспрессии N-терминального FLAG-меченного человеческого IFNAR1 (дикого типа и мутантов K501, 525, 526R) были описаны ранее [10]. Эти плазмиды послужили в качестве основы для генерации дополнительных конструкций N-FLAG-IFNAR1 для экспрессии мутантов K501R и K525, 526 с помощью сайт-направленного мутагенеза; результаты были подтверждены секвенированием ДНК. Конструкты shPHK для разрушения βTrcp были описаны ранее [8, 21]. Олигонуклеотиды siPHK для разрушения Cdc34 и Ubc13 были получены от компании Сигма.

Эмбриональные клетки почки человека 293T, эмбриональные фибробласты мыши и клетки линии HeLa (ATCC) растили в модифицированной по Дульбекко среде Игла с 10 % термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки с добавлением пенициллина и стрептомицина. Стабильные U2OS-производные клеточной линии для внесения убиквитина или мутантов Ubc13 были любезно предоставлены Чжи Дж. Ченом. Эти клетки хранили и использовали, как описано ранее [22]. Добавление тетрациклина (1 мкг/мл в течение 72 ч) к этим клеткам подавляет экспрессию эндогенного убиквитина или эндогенного Ubc13 одновременно с индукцией экспрессии экзогенной РНК-интерференции резистентного убиквитина (дикого типа или мутанта K63R) или Ubc13 (дикого типа или каталитически неактивного мутанта C87A). Трансфекцию производили с помощью липофектамина

плюс, липофектамина 2000 или олигофектамина (Инвитроген) в зависимости от типа клеток и эксперимента. Для всех трансфекций пустые векторы были включены в смеси, чтобы поддерживать одинаковое количество трансфицированных ДНК.

Реактивы, антитела, анализ по гену-репортеру и иммунологический метод

Мышиный интерферон- β и человеческий интерферон- α (IFN α 2) (роферон) были приобретены у компаний Рош и ПБЛ. Циклогексимид и другие химические соединения были приобретены у компании Сигма. Также были приобретены антитела против FLAG (M2, Сигма), убиквитин (FLys2, Биомол), HA (12CA5, Рош Берингер Маннхайм). Вторичные антитела были получены от Инвитроген и Рош Берингер Маннхайм. Иммунопреципитация и процедуры иммуноблоттинга были описаны ранее [23–25].

Для анализа репортерных генов эмбриональные фибробласты мыши котрансфицировали с помощью плазмид, кодирующих человеческий IFNAR2, ISRE-люциферазы светляков (с вектором для конститутивной экспрессии люциферазы Renilla), а также различных человеческих IFNAR1-конструкций. Спустя 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали человеческим IFN α или мышиным IFN β (2000 ЕД/мл) в течение 30 мин. Затем среду удаляли, клетки инкубировали в течение 24 ч без интерферона, после чего определяли активность люциферазы с использованием системы двойного анализа репортерного гена люциферазы (Промега). Данные (нормированные до активности люциферазы Renilla) от трех независимых экспериментов (каждый в пяти повторях) представлены в произвольных единицах измерения в виде среднего значения с указанием ошибки среднего ($M \pm SE$). Значения p были рассчитаны с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента.

Анализ убиквитинирования IFNAR1

Реакции лигирования убиквитина *in vitro* проводили, как описано ранее [24], с помощью SCF^{ВТер}, выделенного из клеток 293Т по методике [26], и рекомбинантного E2s, включая рекомбинантный Cdc34 ([27], дар от Чжэнь-Цян Пан, Школа медицины Маунт-Синай) или 6His-Ubc13/Uve1 ([28, 29], дар от Зеев Ронаи, Институт Бернэм). Упакованные сферы (10 мкл), содержащие иммобилизованный SCF^{ВТер}-НА, инкубировали с E1 (20 пмоль), mCdc34 или 6His-Ubc13/Uve1 (1 нмоль) в реакционной смеси (общий объем 30 мкл), содержащей 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 2 mM NaF, 2 mM аденозинтрифосфата, 0,6 mM дитиотреитола и 1 мкг убиквитина. Смесь инкубировали при температуре 37 °C в течение 60 мин, кипятили в 20 мкл загрузочного буфера Лэммли, разделяли на полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и анализировали с помощью иммуноблоттинга.

Для оценки убиквитинирования IFNAR1 *in vivo* образцы IFNAR1, меченные FLAG, были экспресси-

рованы в клетках 293Т. Анализируемые образцы клеток лизировали в смеси 1 % NP40, 50 mM Трис pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 mM NaVO₄, 1 mM фенолметансульфанилфторида, 2,5 mM этилендиаминтетраацетата, содержащей смесь ингибиторов протеаз (1:500; Сигма), 1 mM NaF и 20 mM N-этилмалеимида. Концентрацию белка определяли по связыванию красителя Брэдфорда. Равные количества лизатов белка инкубировали с глобулами, связанными с M2, для образования иммунопреципитата IFNAR1, меченного FLAG. Образцы промывали 3 раза с помощью 50 mM Трис pH 7,4, 5 % глицерина, 1 M NaCl и 1 раз с помощью 50 mM Трис pH 7,4, 5 % глицерина, 150 mM NaCl, и после кипячения в буфере Лэммли, содержащем додецилсульфат натрия, аликвоту от каждой пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга M2 FLAG, чтобы нормализовать уровни рецептора. На основании нормализации количества лизатов, которые дают сопоставимые уровни IFNAR1, были разделены электрофорезом в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия и проанализированы с помощью иммуноблоттинга с использованием антитела антиубиквитина (Биомол) или цепь-специфических антител антиполиубиквитинов K63-Ub или K48-Ub (Миллипор).

Анализ интернализации IFNAR1

Интернализацию эндогенного или экзогенно экспрессированного IFNAR1 определяли, используя способ на основе флуоресцентного метода, ранее подробно описанного [10, 16]. Клетки в 60-мм чашках трансфектировали с помощью указанных конструкций или индусировали с помощью тетрациклина и высевали в одинаковом количестве на 24 луночные поли-D-лизиновые чашки (Бектон Дикинсон). Клетки содержали на бессывороточной среде Игла, модифицированной по Дульбекко, и либо обрабатывали IFN α 2a в течение определенного времени, либо хранили на льду и не подвергали воздействию IFN α 2a (временная точка 0). Спустя различное время клетки промывали, блокировали и инкубировали с помощью анти-IFNAR1 AA3 антител [30] или анти-FLAG M2 антителами. Первичные антитела удаляли и клетки интенсивно промывали перед добавлением козьих антимышиных IgG H + L антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. После следующей промывки клетки инкубировали с помощью AmplexRed Ultra Reagent 10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазина (Molecular Probes). Аликвоты помещали в черную 96-луночную плашку (NUNC) и измеряли флуоресценцию, считывая ее с помощью индикаторной пластинки ридера Beckman Coulter DTX880 Mutimode с использованием фильтров с длиной волны 530 нм для возбуждения и 590 нм для излучения. Результаты рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ интернализации} = 100 - [(V_s - V_b) \times t_n / (V_s - V_b) \times t_0] \times 100,$$

где V_s — показатели образцов; V_b — показатели фона (ложнотрансфицированные или исследованные с помощью нерелевантных антител); t_n — временная точка n ; t_0 — временная точка 0.

Результаты

Поскольку SCF^{βTcr} E3-лигаза активно использует Cdc34 убиквитин-конъюгирующий фермент E2 для K48-Ub протеасомальных субстратов, таких как IκBα [27], мы предположили, что он нужен для убиквитинирования IFNAR1 и эндоцитоза. С другой стороны, специфичное убиквитинирование белков по K63 *in vitro* может быть достигнуто с помощью ряда ферментов E2, при том что убиквитин-конъюгирующий фермент 13 (Ubc13 в комплексе с Uev1A либо MMS2) оказался наиболее активным как при образовании этих связей *in vivo*, так и в K63-зависимых процессах, таких как ДНК-рекомбинация [31], репарация [32] и активация путей передачи сигнала [33–35].

В качестве подхода мы использовали РНК-интерференцию, чтобы определить роль этих E2s в убиквитинировании и интернализации IFNAR1. Нокдаун Cdc34, который ингибировал K48-Ub IFNAR1, оценивали с помощью иммуоблоттинга, используя специфическое антитело (рис. 1а). И наоборот, K63-Ub IFNAR1 инактивировали в клетках РНК-интерференцией против Ubc13 (см. рис. 1а). Поскольку SCF^{βTcr} был способен использовать любой из этих ферментов для цепь-специфического лигирования убиквитина *in vitro* (рис. 1б), можно полагать, что и в клетках как Cdc34, так и Ubc13 могут вносить свой вклад в процесс убиквитинирования IFNAR1 посредством K48-Ub и K63-Ub. Соответственно, нокдаун Cdc34 либо Ubc13 заметно замедлял кинетику интернализации эндогенного IFNAR1 в клетках 293Т (рис. 1в). Кроме того, экспрессия доминантно-негативного мутанта Ubc13 (Ubc13^{C87A} [22]) ингибировала скорость интернализации N-терминального FLAG-меченного дикого типа IFNAR1 (рис. 1г). В совокупности эти данные позволяют предположить, что для максимальной скорости эндоцитоза IFNAR1 необходимы как Cdc34, так и Ubc13.

Далее мы стремились охарактеризовать кластер акцепторов убиквитина в пределах IFNAR1. Хотя было известно, что тройной мутант K501R/K525R/K526R (IFNAR1^{3KR}) обладает низкой способностью к общему убиквитинированию [14], интернализации и направленной миграции к лизосомам [10], а также деградации [14], роль специфичных акцепторов оставалась неясной. Вначале мы исследовали гипотетический канонический участок, представленный дублетом Lys525/526, расположенным на 9–10 аминокислотных остатков ближе к участку связывания βTcr (₅₃₄DSGNYS). Этот участок напоминает акцептор убиквитина Lys21/22 в IκBα (рис. 2а) и подходит под описание предпочтительных акцепторов убиквитина для SCF^{βTcr} E3-лигазы [36]. Ранее был отмечен низкий уровень

интернализации мутанта IFNAR1^{3KR} [10]. Интересно, что мутация канонического (Lys525/526) или дополнительного (Lys501) участка давала промежуточный фенотип; эти мутанты эндоцитировались медленнее, чем дикий IFNAR1, но быстрее, чем мутант IFNAR1^{3KR} (рис. 2б). Это показывает, что на акцепторном кластере убиквитина оба участка — Lys525/526 и Lys501 способствуют максимальной скорости IFNAR1-эндоцитоза.

Основываясь на этих результатах, мы решили узнать, играет ли роль в регуляции стабильности и сигнализации IFNAR1 его убиквитинирование по каноническим или дополнительным сайтам. Протеолиз FLAG-IFNAR1 оценивали с помощью анализа циклогексимида. Мутант IFNAR1^{3KR}, лишенный канонических и дополнительных сайтов, имел более длительный период полураспада по сравнению с белком дикого типа (рис. 2в). Этот результат согласуется с ранее полученными данными [14]. Промежуточная скорость деградации наблюдалась как для мутантов K501R, так и K525/526R (см. рис. 2в), указывая на то, что убиквитинирование канонических и дополнительных сайтов способствует эффективной деградации IFNAR1.

Чтобы проверить функциональную активность этих мутантов, мы коэкспрессировали их вместе с человеческим IFNAR2 в фибробласты эмбриона мыши и оценили активацию стимулированного интерфероном ответа люциферазы. Экспрессия белков человека IFNAR1 не влияла на индукцию люциферазы мышинным IFNβ, который функционирует за счет эндогенного мышинного рецептора IFN1 (рис. 2г, синие полосы). Это свидетельствует о том, что уменьшение активации сигнального пути рецепторов IFN не сильно нарушается экспрессией этих белков человека. В то же время экспрессия дикого типа человеческого IFNAR1 задействует трансактивацию люциферазы с помощью короткого воздействия импульса с человеческим IFNα; экспрессия мутанта IFNAR1^{3KR} значительно увеличивала чувствительность клеток мыши по отношению к человеческому IFN1. IFNAR1-мутанты, дефектные по каноническим или дополнительным сайтам, значительно увеличили влияние человеческого IFNα (см. рис. 2г, черные полосы). Эти результаты показывают, что убиквитинирование на канонических или дополнительных сайтах способствует ослаблению клеточных ответов на IFN1, вероятно, посредством регулирования IFNAR1 эндоцитоза и деградации.

В соответствии с ранее показанной ролью βTcr2 в убиквитинировании эндогенного IFNAR1 [10, 15], нокдаун этого белка заметно снизил уровень убиквитинирования FLAG-IFNAR1^{WT} (рис. 3а). Кроме того, эндоцитоз дикого типа IFNAR1 был также нарушен в клетках с РНК-интерференцией против βTcr2 (рис. 3б). Важно отметить, что убиквитинирование и интернализация мутантов IFNAR1, дефектных по K525/526 или K501, были также подавлены после нокдауна βTcr2 (см. рис. 3а, б). Этот результат позволяет

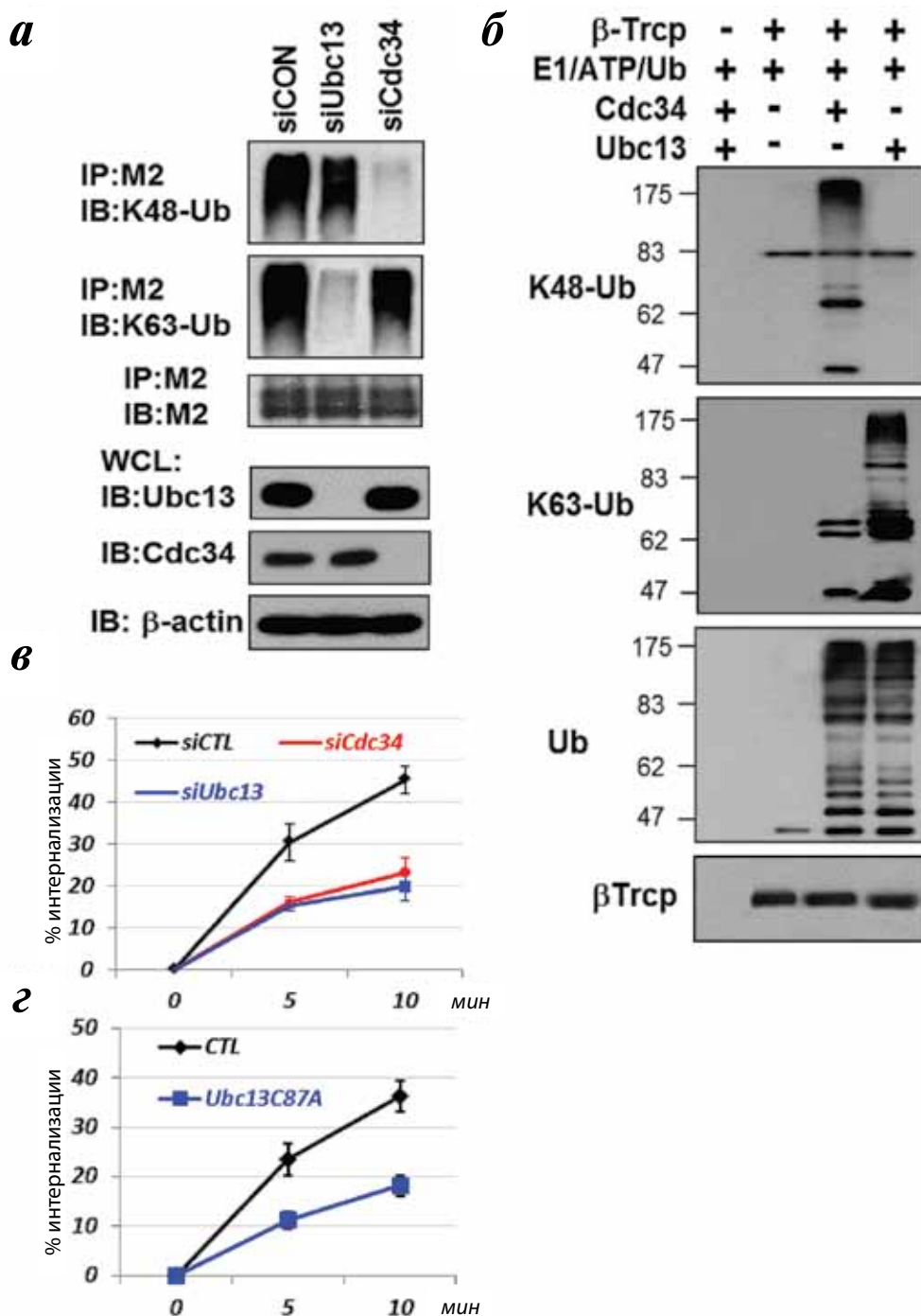


Рис. 1. Роль *Cdc34* и *Ubc13* в убиквитинировании *IFNAR1* и эндоцитозе:

а — специфическое полиубиквитинирование белков FLAG-*IFNAR1* (очищенных от *IFNα*-стимулированного 293Т с помощью иммунопреципитации) анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против K63-Ub и K48-Ub, а также антител против FLAG (M2). Уровни белков эндогенного *Ubc13* или *Cdc34* в лизатах цельных клеток (WCL) были измерены с помощью иммуноблоттинга с использованием указанных антител. Иммуноблот для β-актина включен в качестве контроля;

б — *in vitro* реакцию лигирования убиквитина, катализируемую SCF^{βTrcp} E3-убиквитинлигазой (опущено в качестве отрицательного контроля в левой полосе) в присутствии *Cdc34* или комплекса *Ubc13/UEV1*, анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием антител против убиквитина Lys63 и Lys48, а также антител против неспецифических цепей убиквитина (Ub). Были также проанализированы уровни βTrcp;

в — влияние нокаута *Cdc34* или *Ubc13* на интернализацию эндогенного *IFNAR1* в клетках 293Т, обработанных *IFNα* (6000 ЕД/мл) в течение указанного времени, оценивали с помощью анти-*IFNAR1* AA3 антител и выражали в процентах от потери иммунореактивности клеточной поверхности, рассчитанной из трех независимых экспериментов (каждый в пяти повторениях) в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего;

г — кинетику интернализации FLAG-*IFNAR1* в клетках 293Т, которые получали контрольный вектор (ЦТЛ, pcDNA3) или вектор для экспрессии мутанта *Ubc13*^{C87A}, обработанного *IFNα* (6000 ЕД/мл) в течение указанного времени, оценивали с помощью анти-FLAG-антител и выражали в процентах от потери иммунореактивности клеточной поверхности, рассчитанной из трех независимых экспериментов (каждый в пяти повторениях) в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего

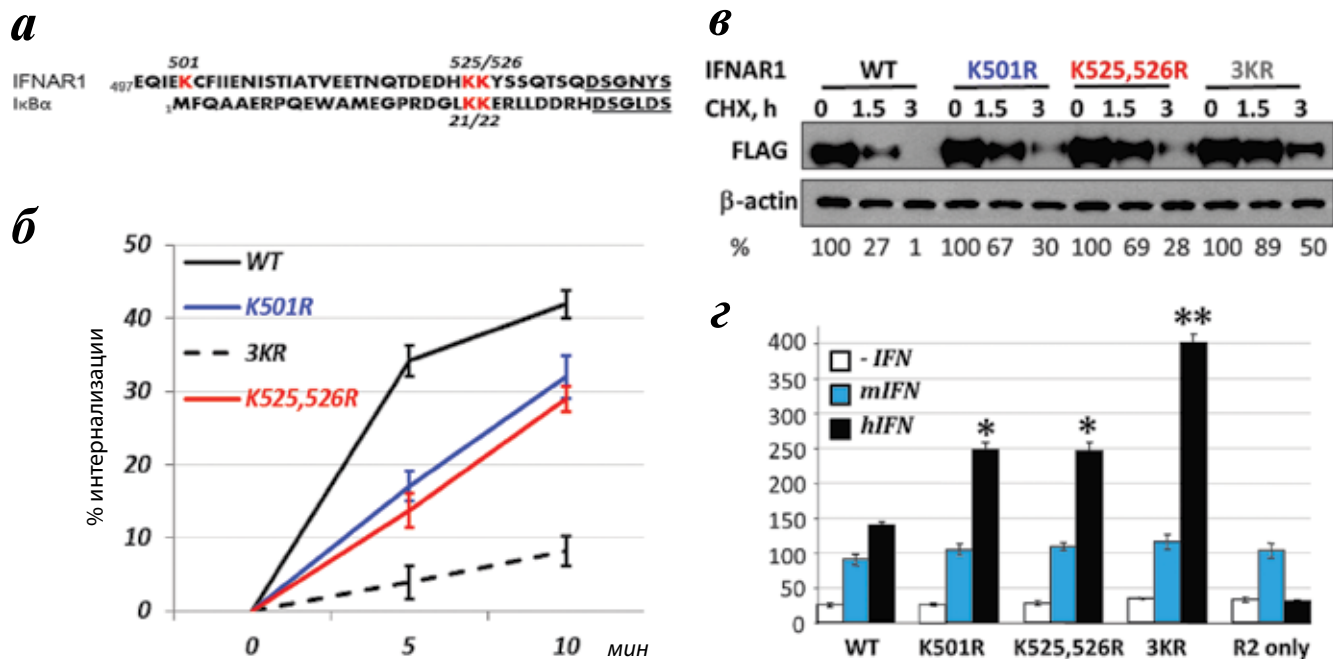


Рис. 2. Роль специфических акцепторных сайтов убиквитина в интернализации и деградации IFNAR1 и IFNAR1-опосредованной сигнальной системы IFN:

а — сходства первичных детерминантов сайта мобилизации β Trcp и предполагаемых акцепторных участков убиквитина IFNAR1 и IκBα человека; **б** — показатели интернализации FLAG-меченных белков IFNAR1, экспрессированных в клетках 293T, после обработки IFNα (6000 ЕД/мл) в течение указанного времени оценивали с помощью анти-FLAG-антител и выражали в процентах от потери иммуореактивности клеточной поверхности, полученных в трех независимых экспериментах (каждый в пяти повторениях) в качестве среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего; **в** — оборот белков FLAG-IFNAR1 определяли в клетках 293T, обработанных IFNα (6000 МЕ/мл) и циклогексимидом (CHX, 20 мкг/мл) в течение указанного времени. Процент оставшегося сигнала IFNAR1 (нормализованный относительно сигнала β -актина) по отношению к временной точке «0» (принятой за 100 %) изображен ниже;

г — относительная активность люциферазного репортера ISRE в мышинных эмбриональных фибробластах, обработанных человеческим IFNAR2 (R2) и экспрессирующим человеческий конструктор IFNAR1, представлена в контроле (пунктир), с добавлением мышинного IFNβ (синие линии) или человеческого IFNα (черные линии). Нормированные (по активности люциферазы Renilla) значения из трех независимых экспериментов представлены в произвольных единицах. Расчетное значение p ($< 0,002$) было получено по сравнению с WT-рецептором (*) либо с WT, K501R или мутантами K525, 526 (**)

предположить, что SCF β Trcp отвечает за убиквитинирование как канонических, так и дополнительных участков IFNAR1 и что эффективный эндоцитоз IFNAR1 зависит от согласованного убиквитинирования этих участков, регулируемых той же E3-убиквитинлигазой.

Поскольку наличие мутаций как в канонических, так и в дополнительных сайтах незначительно изменяло общее убиквитинирование IFNAR1 (см. рис. 3а), но заметно влияло на его интернализацию (см. рис. 2б, 3б), деградацию (см. рис. 2в) и сигнализацию (см. рис. 2г), нельзя исключить качественное различие в последствиях убиквитинирования этих сайтов. В самом деле, количественный масс-спектрометрический анализ связей полиубиквитина показал, что дикий тип IFNAR1 связан с цепями как K63-Ub, так и K48-Ub [10], однако большее количество K63-Ub-связей было найдено на мутанте K525, 526R (65 ± 18 фмоль в FLAG-IFNAR1^{K525, 526R} по сравнению с 3 ± 0 фмоль в FLAG-IFNAR1^{K501R} (Ch.J. Carbone, S.Y. Fuchs, неопубликованные данные). Недавнее создание антител, специфичных к топологии убиквитиновых цепей, дало возможность подтвердить этот вывод. Исследование иммуноблотов, содержащих очищенные иммуносорб-

ционным методом белки IFNAR1 с полиубиквитиновыми цепь-специфическими антителами, позволило обнаружить оба типа цепей на диком типе IFNAR1 (см. рис. 1а, 3в). Интересно, что мутация канонического участка (Lys525, 526) снизила уровни K48-Ub, в то время как мутант IFNAR1, лишенный дополнительного сайта (Lys501), практически не дал специфического сигнала на связывание с K63 (см. рис. 3в). Даже учитывая, что некоторое убиквитинирование может возникнуть в четырех других остатках Lys в пределах цитоплазматического домена IFNAR1, которые находятся за пределами исследуемого кластера, эти данные (вместе с рис. 1а) дают возможность предположить сценарий, где два разных акцепторных участка убиквитина могут быть избирательными для различных типов полиубиквитинирования, зависящих от специфического конъюгирующего фермента E2 (рис. 3е).

Далее мы исследовали роль конъюгирования с каноническими или дополнительными сайтами в регуляции эндоцитоза IFNAR1. Для этого мы использовали усиленную экспрессию мутантов убиквитина (K63R или K48R), которая может предотвратить элонгацию специфической цепи в клетках. Экспрессия этих спе-

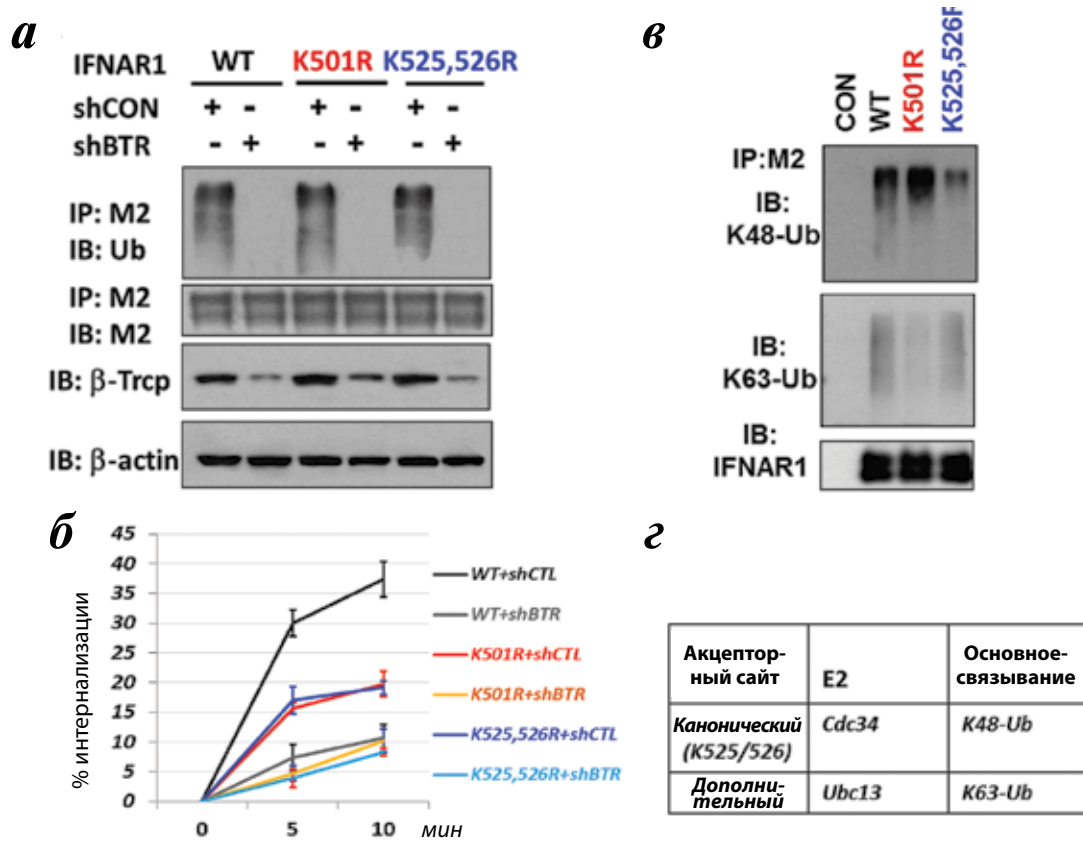


Рис. 3. β Trcp-зависимая сборка цепей K63-Ub, связанных с цепям Lys501 и K48-Ub, конъюгированных в IFNAR1 с Lys525, 526:

а — убиквитинирование белков IFNAR1, меченных FLAG, в клетках 293T, обработанных в контроле shRNA (shCON) или ShRNA против β Trcp (shBTR), а также обработанных или не обработанных IFN α (6000 МЕ/мл, 5 мин), анализировали денатурирующей иммунопреципитацией с помощью антитела M2 с последующим иммуноблоттингом с помощью антитела против убиквитина. Входы для каждого иммунопреципитированного образца были нормализованы, чтобы получить сопоставимые уровни IFNAR1. В качестве контроля проанализированы уровни эндогенных белков β Trcp и β -актина;

б — показатели интернализации в клетках, обработанных в контроле ShRNA против GFP (shCTL) или β Trcp (shBTR) для указанных белков FLAG-IFNAR1 проводили, как указано в подписи к рис. 2б;

в — специфическое полиубиквитинирование K48- и K63-белков IFNAR1, меченных FLAG, анализировали, как в панели а. Количество FLAG-меченого IFNAR1 включено в качестве контроля загрузки;

г — резюме E2s и типов убиквитиновых связей, участвующих в модификации канонических и дополнительных акцепторных участков на IFNAR1

цифических мутантов ослабила скорость интернализации дикого типа рецептора IFNAR1 примерно на 50 % [10] и заметно снизила соответствующее связывание-специфическое убиквитинирование белка IFNAR1 (рис. 4а). Важно отметить, что экспрессия мутанта убиквитина K48R (но не K63R) далее снижала эффективность интернализации IFNAR1^{K501R} (рис. 4б). И наоборот, в клетках 293T на эндоцитоз IFNAR1^{K525, 526R} влияла принудительная экспрессия K63R, но не мутант убиквитина K48R (рис. 4в).

Вклад K63-связанных цепей в интернализацию IFNAR1 сопоставим с известной ролью этой модификации в эндоцитозе ряда других рецепторов, например TrkA [6]. Большинство этих исследований, в том числе наши собственные работы на клетках млекопитающих, проводились с принудительной экспрессией мутантов убиквитина, которые завершают элонгацию цепочек специфических связей. Последние исследования изогенных U2OS-производных, в которых обработка тетрациклином дает нокдаун эндогенного

убиквитина наряду с параллельной экспрессией РНК-интерференции нечувствительного рекомбинантного убиквитина (дикого типа или мутанта K63R [22, 37]), позволили нам дополнительно определить роль связывания-специфических модификаций K63 в интернализации IFNAR1. В соответствии с результатами, полученными с помощью принудительной экспрессии убиквитина, эндоцитоз дикого типа IFNAR1 был ингибирован в клетках, экспрессирующих убиквитин K63R (рис. 4з). Интересно, что эти клетки показали снижение скорости интернализации мутанта IFNAR1^{K525, 526R}, но не его копии K501R (см. рис. 4з). Эти результаты подтверждают присутствие K63-связанной цепи на акцепторном участке Lys501. Взятые вместе с данными убиквитинирования белка, эти результаты показывают, что убиквитинирование канонического участка K525/526 посредством K48-связанных цепей вместе с убиквитинированием K501 посредством K63-связанных цепей максимально стимулирует эндоцитоз IFNAR1.

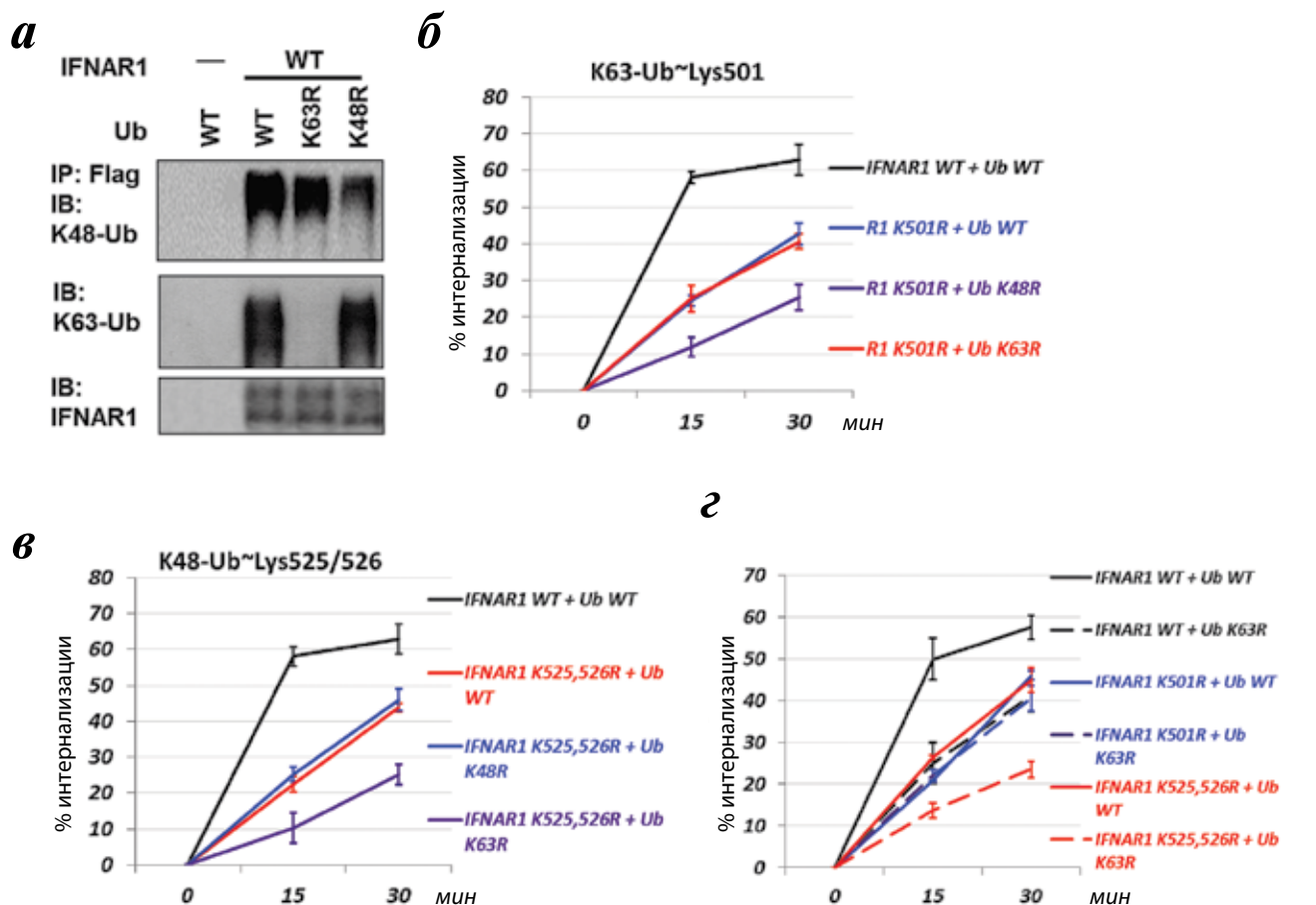


Рис. 4. Несопоставимое действие убиквитиновых мутантов на интернализацию белков IFNAR1 с каноническими или дополнительными акцепторными участками убиквитина:

а — цепь-специфическое полиубиквитинирование дикого типа белков FLAG-IFNAR1, коэкспрессированных с указанными убиквитиновыми конструкциями и очищенных от стимулированного IFN α анализировали, как указано в подписи к рис. 3а;

б — кинетику интернализации FLAG-IFNAR1^{WT}, коэкспрессированного с убиквитином дикого типа (WT, черная линия), сравнивали с кинетикой интернализации FLAG-IFNAR1^{K501R}, коэкспрессированного с помощью убиквитина дикого типа (синяя линия), K63R убиквитина (красная линия) или K48R убиквитина (пурпурная линия) в клетках 293T. Анализы проводили, как указано в подписи к рис. 2б;

в — кинетику интернализации FLAG-IFNAR1^{WT}, коэкспрессированного с убиквитином дикого типа (WT, черная линия) сравнивали с кинетикой интернализации FLAG-IFNAR1^{K525,526R}, коэкспрессированного с помощью убиквитина дикого типа (красная линия), K63R убиквитина (пурпурная линия), или K48R убиквитина (синяя линия) в клетках 293T. Анализы проводили, как указано в подписи к рис. 2б;

г — кинетика интернализации указанных FLAG-IFNAR1 белков в клетках U2OS, индуцированных для нокдауна эндогенного убиквитина и для ре-экспрессии убиквитина дикого типа (сплошные линии) либо убиквитина K63R (пунктирные линии) была проанализирована, как на рис. 2б

Для дальнейшей проверки предположения о том, что взаимодействие E2s разного типа может определять судьбу IFNAR1 через варианты сайт-специфического убиквитинирования, мы изучали влияние модуляции E2s на интернализацию IFNAR1. Нокдаун Cdc34 замедлял кинетику интернализации эндогенного IFNAR1 (см. рис. 1б) и дикого типа FLAG-IFNAR1, экспрессированного в клетках 293T (рис. 5а). Интересно, что в клетках, подвергнутых РНК-интерференции против Cdc34, замедлялась интернализация мутанта FLAG-IFNAR1^{K501R}, но на эндоцитоз белка FLAG-IFNAR1^{K525,526R} это не влияло (см. рис. 5а). Эти данные позволяют предположить, что роль K48-Ub в стимулировании эффективного эндоцитоза IFNAR1 облегчается Cdc34-опосредованной конъюгацией убиквитина с каноническим акцепторным участком (Lys525/526).

Учитывая, что Lys501 IFNAR1 убиквитинируется K63-Ub, который требует активности Ubc13 (см. рис. 1а, 3б), мы стремились определить, являлся ли этот E2 также регулятором эндоцитоза IFNAR1. Нокдаун Ubc13 заметно ингибировал скорость интернализации дикого типа IFNAR1 или мутанта IFNAR1^{K525,526R}, но не K63-Ub-дефектного мутанта IFNAR1^{K501R}, экспрессированного в клетках 293T (рис. 5б). Кроме того, принудительная экспрессия доминантно-негативного каталитически неактивного мутанта Ubc13 (C87A) также снизила эффективность интернализации канонического сайт-специфического мутанта и IFNAR1^{WT}, но не изменила эндоцитоз IFNAR1^{K501R} (рис. 5б). Эти результаты показывают, что Ubc13 способствует K63-Ub в убиквитинировании дополнительного акцепторного участка (Lys501) и играет существенную роль в эффективности эндоцитоза IFNAR1.

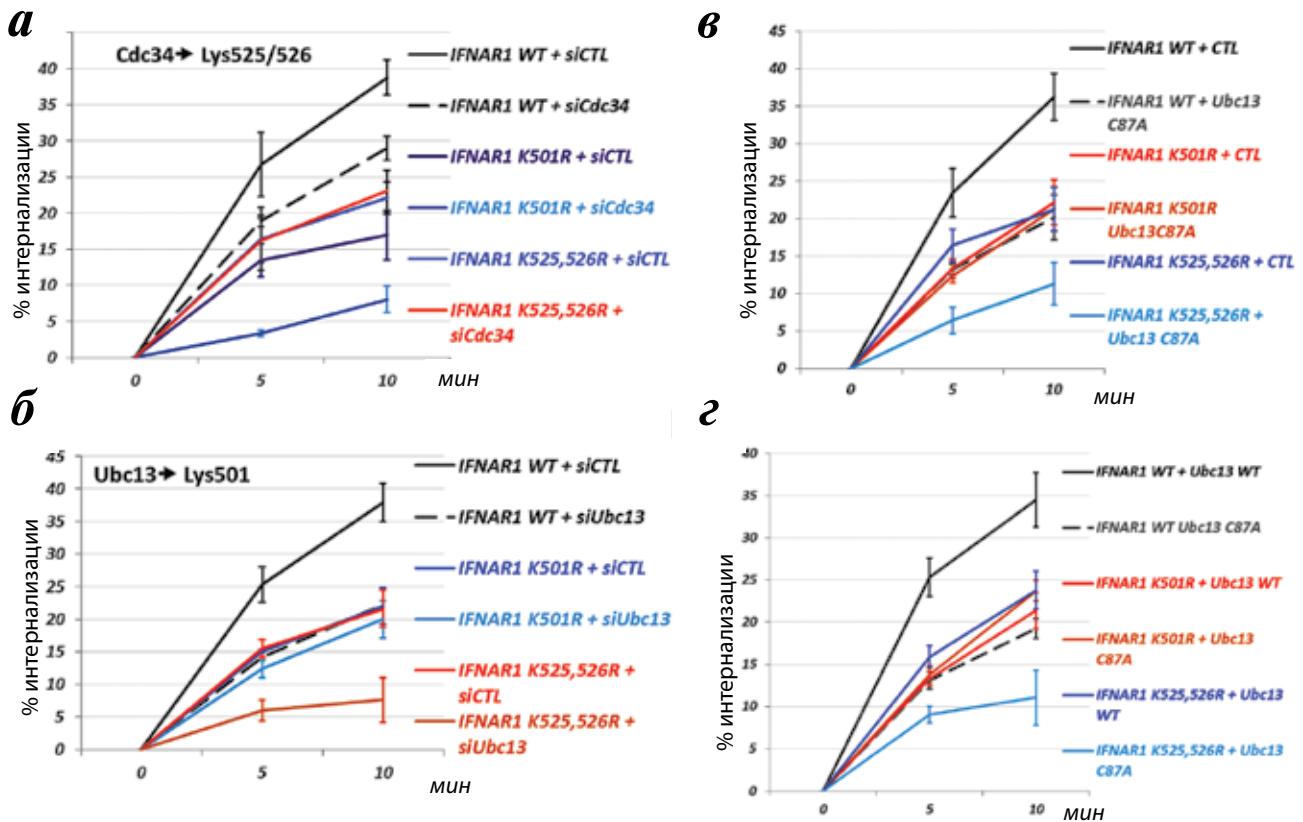


Рис. 5. Для достижения максимально эффективной интернализации *IFNAR1* требуется комбинированное действие *Cdc34*-зависимого *K48-Ub* (собранный на *Lys525, 526*) и *Ubc13*-зависимого *K63-Ub* (собранный на *Lys501*). Анализы проводили, как указано на рис. 2б: а — кинетика интернализации белков *FLAG-IFNAR1*, экспрессированных в клетках 293Т, обработанных контрольным *RNAi* (*siCTL*) или *RNAi* против *Cdc34*; б — кинетика интернализации белков *FLAG-IFNAR1*, экспрессированных в клетках 293Т, обработанных контрольным *RNAi* (*siCTL*) или *RNAi* против *Ubc13*; в — действие каталитически неактивного мутанта (*C87A*) *Ubc13* на интернализацию белков *FLAG-IFNAR1* в клетках 293Т. Трансфекцию клеток пустым вектором *pCDNA3* использовали в качестве контроля (*CTL*); г — кинетика интернализации белков *FLAG-IFNAR1*, экспрессированных в клетках *U2OS*, взятых для нокдауна эндогенного *Ubc13* и реэкспрессии, либо дикого типа *Ubc13* или мутанта *Ubc13^{C87A}*

Далее мы стремились подтвердить эти выводы, используя варианты клеточной линии *U2OS*, которые позволяют заменять эндогенный *Ubc13* рекомбинантными белками дикого типа или мутанта *C87A* [22]. Интернализация *FLAG-IFNAR1^{WT}* явно нарушалась в клетках, которые экспрессировали каталитически активный мутантный белок *Ubc13* (рис. 5г). Аналогичный результат наблюдался в случае *K48-Ub*-зависимого мутанта *IFNAR1*, лишённого дополнительного сайта (*Lys501*), но не на *K63-Ub*-зависимом мутанте (*IFNAR1^{K525, 526R}*, см. рис. 5г). В совокупности эти результаты показывают, что *Ubc13* участвует в сборке *K63*-связанных цепей на *Lys501* *IFNAR1* и эта система взаимодействует с *Cdc34*-зависимой *K48-Ub* на *Lys525, 526*, способствуя эффективному эндоцитозу *IFNAR1*.

Ранее было показано, что базальный уровень эндоцитоза *IFNAR1* в интактных клетках человека ингибируется *TYK2* [38], который предотвращает взаимодействие специфического линейного эндоцитозного мотива с *AP2*-системой эндоцитоза механическим комплексом (рис. 6а, б) [16]. Воздействие на

клетки *IFN1* способствует привлечению комплекса β Tcrp и последующему убиквитинированию *IFNAR1* [14, 15, 39–41]. В целом предполагается, что вызванное *IFN* сайт-специфическое (*K501, 525, 526*) убиквитинирование *IFNAR1* стимулирует его интернализацию путем раскрытия этого линейного эндоцитозного мотива [10] по механизму, который еще предстоит понять.

Далее мы исследовали гипотетические механизмы, с помощью которых убиквитинирование *IFNAR1* способствует раскрытию линейного эндоцитозного мотива. Учитывая, что связывание *TYK2* с *IFNAR1* было одинаковым в случае рецептора дикого типа и дефектного по убиквитинированию мутанта *IFNAR1^{3KR}* (рис. 6в), кажется маловероятным, что убиквитинирование *IFNAR1* диссоциирует *TYK2* от его рецептора. Кроме того, после обработки клеток *IFN* на ранних стадиях эндоцитоза и направленной миграции в субклеточных фракциях *TYK2* остается связанным с *IFNAR1* [42], несмотря на то что убиквитинирование *IFNAR1* и интернализация стимулируются *IFN* [14,

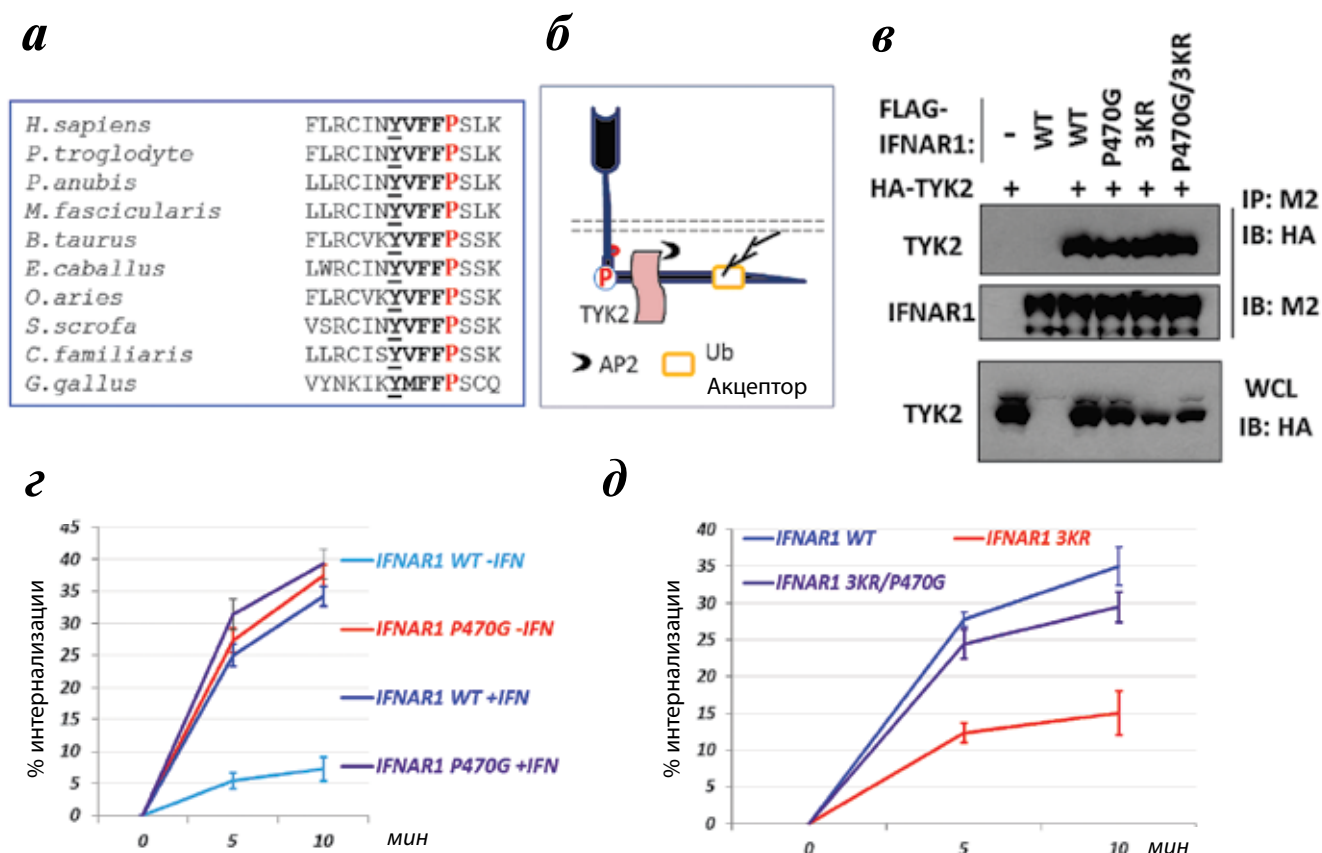


Рис. 6. Комбинированное убиквитинирование канонических и дополнительных сайтов в IFNAR1 происходит выше места изменений конформации IFNAR1, регулируемых консервативным Pro470:

а — консервативность специфического Pro-остатка (P470 в IFNAR1 человека, (красный шрифт), прилегающего к эндоцитозному мотиву (жирный шрифт), критического остатка Тир, который взаимодействует с AP2 (подчеркнуто) на IFNAR1 указанных видов;

б — гипотетическая модель, которая предполагает роль пролин-опосредованного изгиба цепи IFNAR1, обусловленного связыванием с TYK2, в маскировке эндоцитозного мотива (красная точка) от эндоцитозного системного комплекса AP2. Убиквитинирование IFNAR1 предполагает вытеснение TYK2 или изменение взаимного пространственного расположения эндоцитозного мотива, цитоплазматической мембраны и AP2;

в — указанные белки IFNAR1-FLAG (маркер на COOH-конце) с HA-меченным TYK2 или без него были коэкспрессированы в клетках 293T. После обработки IFN (6000 ЕД/мл в течение 10 мин) клетки снимали, лизировали и белки подвергали иммунопреципитации с анти-FLAG-антителом. После предварительного иммуноблоттинга с анти-FLAG-антителом (не показано) различное количество реакционной смеси наносили на другой гель, чтобы получить сопоставимый уровень FLAG-меченных белков IFNAR1 в каждой полосе. Эти реакции анализировали с помощью иммунопреципитации-иммуноблоттинга с использованием указанных антител. Показано также содержание HA-TYK2 в лизатах цельных клеток (WCL);

г — скорость интернализации FLAG-IFNAR1, экспрессированного в клетках 293T, была проанализирована, как описано на рис. 2б, как в отсутствие добавленного IFNα, замещенного аналогичными объемами PBS;

д — скорость интернализации FLAG-IFNAR1, экспрессированного в клетках 293T, была проанализирована, как описано на рис. 2б

15, 39]. Таким образом, мы рассмотрели альтернативную модель, где убиквитинирование IFNAR1 может изменять конформацию его внутриклеточного домена или его пространственное расположение по отношению к TYK2 и плазматической мембране. Высококонсервативный остаток пролина, расположенный дистально по отношению к эндоцитозному мотиву (например, Pro470 в человеческом IFNAR1, см. рис. 6а), может генерировать полипептидную цепочку, которая задерживает активацию эндоцитозного мотива (см. рис. 6б). Замена Pro470 на Gly, повышающий гибкость цепи, дает белок IFNAR1^{P470G}, который эффективно взаимодействовал с TYK2 (см. рис. 6в), проявляя при этом очень высокий уровень эндоцитоза даже без обработки IFN (рис. 6г). Поразительно, что мутация этого остат-

ка пролина в убиквитин-дефицитном IFNAR1^{3KR} в значительной степени восстановила способность этого мутанта к эффективной интернализации (рис. 6д). Эти результаты показывают, что убиквитинирование IFNAR1, предшествующее пространственным изменениям внутриклеточного домена IFNAR1, определяет эффективность эндоцитоза.

Обсуждение

Представленные данные показывают, что максимальная скорость эндоцитоза IFNAR1 является совместной функцией K48-Ub, связанного с акцепторными сайтами убиквитина Lys525, 526, и K63-Ub, конъюгированного с сайтом Lys501 (см. рис. 2–5). Хотя SCF^{ВТер} контролирует конъюгацию убиквитина со

всем кластером Lys, важным для эндоцитоза IFNAR1 (см. рис. 3), эти события зависят от альтернативной работы ферментов Cdc34 и Ubc13 E2, стимулирующих тополого-специфическую интернализацию цепочки убиквитина (см. рис. 5).

Cdc34-зависимая конъюгация K48-Ub с сайтами Lys525, 526 сопоставима с ранее опубликованными результатами на материале протеасомальных субстратов bTcrp [36]. Лизины 525 и 526 расположены на сайтах 9–10 IFNAR1 вблизи от сайта связывания bTcrp (например, дегрон₅₃₄ DSGNYS₅₃₉). В этом смысле они представляют собой канонические акцепторные участки для убиквитинирования, опосредованного SCF^{bTcrp}, аналогично Lys21/22 на IkBa (см. рис. 2a) [14]. Преимущество такого расположения акцепторных участков убиквитина действительно сообщалось для bTcrp протеасомального субстрата β -катенина [43], и введение удвоенного остатка лизина на таком же расстоянии от сайта связывания bTcrp преобразовало латентный мембранный белок 1 вируса Эпштейна–Барр из псевдосубстрата в подлинный субстрат bTcrp [44]. Представленные здесь результаты соответствуют данным литературы о сходстве в расположении акцепторного участка протеасомальных субстратов SCF^{bTcrp} и Lys525/526. Эти данные позволяют предположить, что многосторонние взаимодействия между SCF^{bTcrp}, Cdc34 как E2 и Lys21/22 в случае IkBa [27] или Lys525, 526 в случае IFNAR1 (в этом исследовании) в качестве субстратов может быть благоприятным для элонгации полиубиквитиновой цепи K48-связанной топологии.

Однако в отличие от IkBa, который является цитозольным белком и чьи основные акцепторные участки убиквитина Lys21/22 расположены в гибкой N-концевой области [45], выбор участков конъюгации для IFNAR1 может быть зависим от пространственных ограничений, введенных фиксацией трансмембранного домена плазматической мембраны. Соответственно, SCF^{bTcrp} может иметь узкий спектр выбора субстрата среди остатков лизина IFNAR1 или среди цепей, преимущественно построенных на этих остатках. И наоборот, другой тип цепи, такой как K63-Ub, может быть построен этой E3-лигазой на акцепторе Lys501 с использованием альтернативы Cdc34 E2, например Ubc13. Эта возможность соответствует зависимости максимальной скорости эндоцитоза мутанта IFNAR1^{K525, 526R} от наличия K63 на убиквитине и каталитической активности Ubc13 (см. рис. 4, 5). Наши результаты впервые продемонстрировали, что SCF^{bTcrp} может напрямую использовать комплекс Ubc13/UEV1 в качестве E2-фермента, чтобы катализировать элонгацию K63-связанной цепи *in vitro* (см. рис. 1б). Соответственно, подобный механизм, который может работать и *in vivo*, мог бы послужить в качестве самого простого объяснения для β Tcrp/Ubc13/K63 цепь-зависимого эндоцитоза IFNAR1. Тем не менее остается вероятность, что необходимость и β Tcrp, и Ubc13 для K63-связанного убиквитинирования IFNAR1

по Lys501 отражает не прямое регулирование, которое может включать в себя дополнительные E2s/E3s.

Возможные значения для других ферментов E2, таких как разнородные члены семейства UbcH5, показали способность убиквитинирования IFNAR1 *in vitro* [10], а также продемонстрировали роль в моноубиквитинировании субстратов с последующей элонгацией K48-связанной цепи (посредством Cdc34 [27]) или K63-связанной цепи (посредством Ubc13 [46]), которые еще предстоит уточнить. Хотя мы не наблюдали последовательного изменения скорости IFNAR1-эндоцитоза в клетках, которые получили реагенты против членов семейства UbcH5 (Ch.J. Carbone, S.Y. Fuchs, неопубликованные данные), роль этих видов E2 не может быть однозначно исключена.

Предстоит выяснить, как эти два типа полиубиквитиновых цепей, построенные на двух разных лизинах акцепторного субстрата с помощью двух различных ферментов E2 могут взаимодействовать для раскрытия линейного эндоцитозного мотива и для увеличения скорости интернализации IFNAR1. С одной стороны, есть основания полагать, что степень интернализации просто пропорциональна общему уровню убиквитина на кластере Lys501/525/526 IFNAR1, и оба акцепторных участка вносят свой вклад, формируя те цепи, которые могут быть эффективно созданы на данном остатке лизина субстрата в рамках возможной субстрат-лигазы E2. С другой стороны, мы не можем исключить, что эти различные типы цепей могут играть разную роль в мобилизации или перегруппировке белков, взаимодействующих с рецептором, и что эти две функции взаимно дополняют друг друга в механизме стимуляции эндоцитоза IFNAR1.

Примечательно, что придание пластичности внутриклеточному домену IFNAR1 посредством замены высококонсервативного Pro470 на глицин создает рецептор с очень высокой скоростью эндоцитоза даже при отсутствии стимуляции IFN1. Кроме того, введение замещения P470G значительно восстановило интернализацию IFNAR1^{3KR} с дефектом убиквитинирования (см. рис. 6). Этот результат позволяет предположить, что убиквитинирование IFNAR1 стимулирует его интернализацию, скорее всего через изменение конформации/пространственного расположения IFNAR1-внутриклеточного домена. В рамках этой модели вполне вероятно, что наличие двух типов полиубиквитиновых цепей на IFNAR1 может дополнительно стимулировать принятие конформации, при которой возможен эндоцитоз. Учитывая, что цепочки K63-Ub и K48-Ub имеют очень различные конформации [47], взаимодействия между эндоцитозным мотивом и эндоцитозным механизмом могут быть усилены и/или стабилизированы присутствием обоих типов цепей. Дальнейшие структурные исследования дадут возможность непосредственно исследовать этот механизм.

Приносим благодарность D.P. Baker, Z.J. Chen, C. Horvath, J. Krolewski, Z. Ronai, Z.Q. Pan и Y. Yarden за реактивы; J. Peng, B. Varghese и G. Swaminathan за техническую помощь на ранних стадиях этого проек-

та. Мы благодарны также Z.Q. Pan за критическое обсуждение рукописи. Этот проект был поддержан грантами Национального института здравоохранения на S.Y.F.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998;17(24):7151–60.
2. Bonifacino J.S., Weissman A.M. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:19–57.
3. Holler D., Dikic I. Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol* 2004;67(6):1013–7.
4. Huangfu W.C., Fuchs S.Y. Ubiquitination-dependent regulation of signaling receptors in cancer. *Genes Cancer* 2010;1(7):725–34.
5. Galan J.M., Haguenaer-Tsapis R. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* 1997;16(19):5847–54.
6. Geetha T., Jiang J., Wooten M.W. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 2005;20(2):301–12.
7. Duncan L.M., Piper S., Dodd R.B. et al. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J* 2006;25(8):1635–45.
8. Varghese B., Barriere H., Carbone C.J. et al. Polyubiquitination of prolactin receptor stimulates its internalization, postinternalization sorting, and degradation via the lysosomal pathway. *Mol Cell Biol* 2008;28(17):5275–87.
9. Barriere H., Nemes C., Lechardeur D. et al. Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in Mammalian cells. *Traffic* 2006;7(3):282–97.
10. Kumar K.G., Barriere H., Carbone C.J. et al. Site-specific ubiquitination exposes a linear motif to promote interferon-alpha receptor endocytosis. *J Cell Biol* 2007;179(5):935–50.
11. Constantinescu S.N., Croze E., Wang C. et al. Role of interferon alpha/beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon alpha/beta receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(20):9602–6.
12. Colamonici O.R., Porterfield B., Domanski P. et al. Complementation of the interferon alpha response in resistant cells by expression of the cloned subunit of the interferon alpha receptor. A central role of this subunit in interferon alpha signaling. *J Biol Chem* 1994;269(13):9598–602.
13. Muller U., Steinhoff U., Reis L.F. et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264(5167):1918–21.
14. Kumar K.G., Krolewski J.J., Fuchs S.Y. Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *J Biol Chem* 2004;279(45):46614–20.
15. Kumar K.G., Tang W., Ravindranath A.K. et al. SCF(HOS) ubiquitin ligase mediates the ligand-induced down-regulation of the interferon-alpha receptor. *EMBO J* 2003;22(20):5480–90.
16. Kumar K.G., Varghese B., Banerjee A. et al. Basal ubiquitin-independent internalization of interferon alpha receptor is prevented by Tyk2-mediated masking of a linear endocytic motif. *J Biol Chem* 2008;283(27):18566–72.
17. Fuchs S.Y. Hope and fear for interferon: the receptor-centric outlook on the future of interferon therapy. *J Interferon Cytokine Res* 2013;33(4):211–25.
18. Fuchs S.Y. Ubiquitination-mediated regulation of interferon responses. *Growth Factors* 2012;30(3):141–8.
19. Mosesson Y., Shtiegman K., Katz M. et al. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem* 2003;278(24):21323–6.
20. Parisien J.P., Lau J.F., Rodriguez J.J. et al. Selective STAT protein degradation induced by paramyxoviruses requires both STAT1 and STAT2 but is independent of alpha/beta interferon signal transduction. *J Virol* 2002;76(9):4190–8.
21. Li Y., Kumar K.G., Tang W. et al. Negative regulation of prolactin receptor stability and signaling mediated by SCF(beta-TrCP) E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 2004;24(9):4038–48.
22. Xu M., Skaug B., Zeng W., Chen Z.J. A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNFalpha and IL-1beta. *Mol Cell* 2009;36(2):302–14.
23. Soldatenkov V.A., Dritschilo A., Ronai Z., Fuchs S.Y. Inhibition of homologue of Slimb(HOS) function sensitizes human melanoma cells for apoptosis. *Cancer Res* 1999;59(20):5085–8.
24. Li Y., Gazdoui S., Pan Z.Q., Fuchs S.Y. Stability of homologue of Slimb F-box protein is regulated by availability of its substrate. *J Biol Chem* 2004;279(12):11074–80.
25. Liu J., Huangfu W.C., Kumar K.G. et al. Virus-induced unfolded protein response attenuates antiviral defenses via phosphorylation-dependent degradation of the type I interferon receptor. *Cell Host Microbe* 2009;5(1):72–83.
26. Tan P., Fuchs S.Y., Chen A. et al. Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Mol Cell* 1999;3(4):527–33.
27. Wu K., Kovacev J., Pan Z.Q. Priming and extending: a UbcH5/Cdc34 E2 handoff mechanism for polyubiquitination on a SCF substrate. *Mol Cell* 2010;37(6):784–96.
28. Topisirovic I., Gutierrez G.J., Chen M. et al. Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(31):12676–81.
29. Laine A., Topisirovic I., Zhai D. et al. Regulation of p53 localization and activity by Ubc13. *Mol Cell Biol* 2006;26(23):8901–13.
30. Goldman L.A., Zafari M., Cutrone E.C. et al. Characterization of antihuman IFNAR-1 monoclonal antibodies: epitope localization and functional analysis. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19(1):15–26.
31. Zhao G.Y., Sonoda E., Barber L.J. et al. A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell* 2007;25(5):663–75.
32. Hofmann R.M., Pickart C.M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 1999;96(5):645–53.
33. Karin M., Gallagher E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev* 2009;228(1):225–40.
34. Laine A., Ronai Z. Ubiquitin chains in the ladder of MAPK signaling. *Sci STKE* 2005;2005(281):re5.
35. Chen Z.J. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):758–65.
36. Fuchs S.Y., Spiegelman V.S., Kumar K.G. The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* 2004;23(11):2028–36.
37. Zeng W., Sun L., Jiang X. et al. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals

a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* 2010;141(2):315–30.

38. Ragimbeau J., Dondi E., Alcover A. et al. The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *EMBO J* 2003;22(3):537–47.

39. Marijanovic Z., Ragimbeau J., Kumar K.G. et al. TYK2 activity promotes ligand-induced IFNAR1 proteolysis. *Biochem J* 2006;397(1):31–8.

40. Liu J., Plotnikov A., Banerjee A. et al. Ligand-independent pathway that controls stability of interferon alpha receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367(2):388–93.

41. Carbone C.J., Zheng H., Bhattacharya S. et al. Protein tyrosine phosphatase 1B is a key

regulator of IFNAR1 endocytosis and a target for antiviral therapies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(47):19226–31.

42. Payelle-Brogard B., Pellegrini S. Biochemical monitoring of the early endocytic traffic of the type I interferon receptor. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30(2):89–98.

43. Wu G., Xu G., Schulman B.A. et al. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 2003;11(6):1445–56.

44. Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S. et al. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCFHOS/beta-TrCP E3 ubiquitin ligase regulates extent of

NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2003;278(49):48942–9.

45. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa] B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621–63.

46. Windheim M., Peggie M., Cohen P. Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem J* 2008;409(3):723–9.

47. Tenno T., Fujiwara K., Tochio H. et al. Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes Cells* 2004;9(10):865–75.

Амниокар – пролиферативная среда для мезенхимальных клеток

В.В. Честков, В.Ю. Табаков, Ю.В. Щепкина

ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Россия, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1;
ООО НПП «ПанЭко», Россия, 115522, Москва, а/я 119

Контакты: Валерий Викторович Честков chestkov@med-gen.ru

Задачи. Разработать питательную среду Амниокар, содержащую эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) и коктейль факторов роста, для накопления биомассы фибробластов человека. Исследовать пролиферативную активность данной среды на культурах клеток мезенхимального происхождения HUVEC и мезенхимальных стромальных клетках, а также на культуре клеток амниотической жидкости человека.

Материалы и методы. Определение скорости накопления клеточной массы и морфологии клеток при культивировании клеток разного гистогенеза в среде Амниокар и питательной среде, содержащей 10 % ЭТС.

Результаты. Показано, что среда Амниокар превосходила стандартную среду DMEM с 10 % ЭТС в 2–5 раз при культивировании фибробластов кожи, HUVEC и мезенхимальных стволовых клеток. Среда Амниокар увеличивала количество клеток эндотелия, вступающих в митоз, и поддерживала культуру клеток HUVEC при длительном пассировании *in vitro*. Клональное культивирование клеток амниотической жидкости человека в среде Амниокар обеспечивало развитие колоний как фибробластоподобного, так и эпителиального типа.

Выводы. Пролиферативная среда Амниокар эффективна для накопления биомассы различных клеток мезенхимального происхождения и может использоваться в диагностических целях в медицинской генетике, онкологии и др.

Ключевые слова: питательная среда, эмбриональная телячья сыворотка, пролиферация, фибробласты, мезенхимальные стромальные клетки, амниотическая жидкость, амниокар, amniotax, HUVEC, *in vitro*

Amniocar as a proliferative medium for mesenchymal cells

V.V. Chestkov, V.Yu. Tabakov, Yu.V. Shchepkina

Medical and Genetic Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Russia, 115478, Moscow, Zamoskvorechiye St., 1;
NPP "PanEco" LLC, Russia, 115522, Moscow, p/o box 119

Objectives. To develop the Amniocar nutrient medium that contains fetal calf serum (FCS) and growth factors cocktail for mass cultivation of human fibroblasts. To study proliferative activity of the medium on cultures of HUVEC cells of mesenchymal origin and mesenchymal stromal cells, as well as on cell culture of human amniotic fluid.

Materials and methods. Determination of the rate of accumulation of the cellular mass and cell morphology in the course of cultivation of cells of various histogenesis in the Amniocar medium and nutrient medium that contains 10 % of FCS.

Results. It has been demonstrated that the Amniocar medium is prevalent as compared to the standard DMEM medium with 10 % of FCS by 2 to 5 times for cultivation of skin fibroblasts, HUVEC, and mesenchymal stem cells. The Amniocar medium increased the quantity of endothelial cells that enter mitosis and maintained the culture of HUVEC cells with prolonged passaging *in vitro*. Clonal cultivation of human amniotic fluid cells in the Amniocar medium secured development of colonies of both fibroblast and epithelial type.

Conclusions. Proliferative Amniocar medium is efficient for mass cultivation of various cells of mesenchymal origin and can be used for diagnostic purposes in medical genetics, oncology, etc.

Key words: nutrient medium, fetal calf serum, proliferation, fibroblasts, mesenchymal stromal cells, amniotic fluid, Amniocar, amniotax, HUVEC, *in vitro*

Введение

Расширение использования метода культуры ткани в различных областях диагностической медицины определяется не только нарастающей потребностью в диагностике заболеваний на молекулярно-генетическом и клеточном уровне, но также и разработками в области заместительной клеточной и тканевой терапии [1]. Поставленная задача требует культивирования клеточных элементов самых разных тканей организма, нуждающихся в определенных гуморальных регуляторных факторах микроокружения. Это предполагает,

что культивирование различных клеток организма требует специальных условий для каждого типа клеток [2].

Метод культивирования клеток человека основан на использовании классических питательных сред с известным химическим составом и универсальной добавкой — сывороткой крупного рогатого скота, чаще всего это эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) [3]. Этот подход позволяет создавать вариации питательной среды по составу минеральных солей, аминокислот и витаминов, но ограничен в изменении содержания факторов роста клеток. Их пропорция и содержание

определяются добавляемой в питательную среду ЭТС, разведение которой в 10 и более раз в составе среды делает концентрацию сывороточных компонентов заведомо ниже физиологической. Такой метод культивирования удобен благодаря его универсальности в отношении большинства клеточных линий и первичных клеточных культур, но оставляет широкое окно возможностей по оптимизации состава питательных сред для конкретных типов клеток [4].

Среди различных типов клеток, используемых для диагностики в современной медицине, фибробласты являются одним из наиболее востребованных [5]. Поэтому была предпринята попытка разработки питательной среды, эффективной для быстрого и массового культивирования этих клеток [6]. Поскольку разработанная среда оказалась востребованной, в первую очередь, при цитогенетической диагностике с использованием клеток амниотической жидкости, она получила название Амниокар [7]. В статье приводятся данные в пользу того, что эта питательная среда поддерживает высокий уровень пролиферации и других клеток организма и, следовательно, может быть использована для решения более широкого круга задач.

Материалы и методы

В работе использовался клеточный материал от пациентов и доноров, оставшийся невостребованным при проведении цитогенетической диагностики в МГНЦ РАМН. Культивирование клеток проводилось в атмосфере с 5 % CO_2 .

Использованные в работе реактивы для культивирования клеток произведены НПП «ПанЭко». Среда Амниокар содержит питательную среду DMEM с модификациями, 10 % ЭТС, факторы роста клеток в оптимальной концентрации для каждой партии ЭТС, гормоны и др.

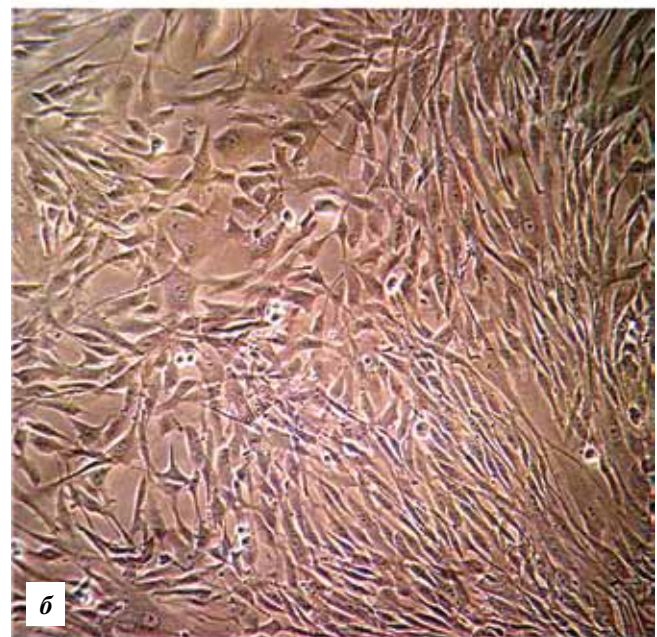
Оценка пролиферативных свойств среды Амниокар проводилась по результатам культивирования фибробластов кожи взрослого человека HSF-W58 на 17–19-м пассаже. В качестве контроля использовали питательную среду DMEM с 10 % ЭТС. Другим контролем являлась коммерчески доступная среда Amniomax-C100 (Invitrogen, Life Technologies, США).

Результаты

Результаты количественной оценки пролиферативных свойств фибробластов в испытываемых средах представлены в табл. 1. Показано, что по эффективности культивирования фибробластов разработанная среда Амниокар многократно превосходит среду DMEM с 10 % ЭТС (стандартные условия культивирования) и не уступает среде Amniomax. Морфология фибробластов в среде Амниокар не отличается от их морфологии в контрольной среде (рисунок). Необходимо отметить дополнительное преимущество среды Амниокар — она может храниться при -20°C более 1 года.

Таблица 1. Относительный показатель роста и время удвоения культуры фибробластов в различных средах

Среда	Относительный показатель роста	Время удвоения, ч
Контроль (DMEM + 10 % ЭТС)	1	42
Amniomax-C100 (Invitrogen) [7]	3,0	27,2
Amniomax-II (Invitrogen) [7]	3,6	25,5
Амниокар (НПП «ПанЭко») [6]	6,4	21,8



Цитоморфология фибробластов кожи взрослого человека штамма HSF-W58 в различных условиях культивирования: а — в ростовой среде DMEM + 10 % ЭТС; б — в пролиферативной среде Амниокар. Фазовый контраст ($\times 150$)

Перспективной моделью для исследования процессов ангиогенеза, патогенеза и лечения заболеваний сердца и сосудов являются псевдоинии диплоидных клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC [8, 9]. Вместе с тем отмечено, что рост этих клеток в культуре *in vitro* замедлен и сильно ограничен в пассажах при использовании классических сред [10]. Эти клетки, так же как и фибробласты, имеют мезенхимальное происхождение, что позволило оценить эффективность их культивирования в разработанной среде при длительном пассировании *in vitro*. Показано, что пролиферативная среда Амниокар стимулирует пролиферацию клеток эндотелия и препятствует их переходу в состояние терминальной дифференцировки. При этом количество удвоений клеток в культуре возрастает с 3–4 до 15–20 (табл. 2).

Таблица 2. Сравнительная характеристика роста культуры клеток HUVEC в классической (DMEM/F12) и пролиферативной (Амниокар) средах

Среда	Максимальное число пассажей в культуре	Время удвоения в пассажах, ч
Контроль (DMEM/F12 + 10 % ЭТС)	4	52
Амниокар (НПП «ПанЭко») [6]	20	20,3–38,6

В нашей лаборатории получены данные о том, что среда Амниокар может быть эффективна при культивировании мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани.

Питательная среда Амниокар нашла применение в медицинской генетике для культивирования клеток амниотической жидкости. В табл. 3 приведены данные 1115 независимых сравнительных исследований использования данной среды для цитогенетической диагностики в сопоставлении с результатами культивирования в среде Amniomax-C100 [11]. Клетки амниотической жидкости культивировали 8–12 сут, затем оценивали количество образовавшихся колоний и митотический индекс клеточной культуры. Необходимо отметить, что морфология клеток и колоний указывала на эффективный клональный рост как фибробластоподобных, так и эпителиальных клеток.

Обсуждение

Основной тенденцией в развитии современных питательных сред для клеток человека и животных является разработка бессывороточных сред. Однако для культивирования первичных клеточных культур их эффективность недостаточна, и стандартные методы культивирования с использованием классических питательных сред и сывороток животного происхождения остаются широко используемыми в диагностической работе. Для этих целей разрабатываются питательные среды, содержащие сыворотку животных и коктейль факторов роста, стимулирующий пролиферацию ин-

Таблица 3. Сравнительная характеристика пролиферативных сред для культивирования клеток амниотической жидкости

Среда	Среднее число колоний на флакон 25 см ²	Митотический индекс, % (на 5000 клеток)
Amniomax-C100 (Invitrogen)	9,9 ± 4,5	4,35 ± 0,65
Амниокар (НПП «ПанЭко»)	8,5 ± 3,6	3,94 ± 1,2

тересующих клеток. Такие среды можно обозначить как пролиферативные.

В данной работе представлены результаты разработки пролиферативной питательной среды Амниокар, оптимизированной для культивирования фибробластов и других клеток мезенхимального происхождения. Поскольку каждая партия ЭТС обладает своим пролиферативным потенциалом, оптимальная концентрация факторов роста должна подбираться с учетом качества используемой ЭТС. НПП «ПанЭко» уже в течение нескольких лет производит питательную среду Амниокар, не уступающую по ростовым свойствам мировым аналогам.

Вопрос об адекватности таких пролиферативных сред условиям, существующим вокруг клетки *in vivo*, еще долго не будет иметь однозначного ответа. Состав факторов роста в тканевой жидкости, окружающей клетку, в определенной степени динамичен и отличается от состава сыворотки крови. Кроме того, использование 10 % ЭТС заведомо обрекает культивируемые клетки на дефицит большинства сывороточных факторов роста клеток. С другой стороны, содержание факторов роста в пролиферативных средах существенно выше их концентрации в сыворотке животных. Поскольку в коктейль входит, как правило, лишь несколько факторов роста, возможен дисбаланс их содержания в питательной среде, что потенциально может менять направление дифференцировки клеток.

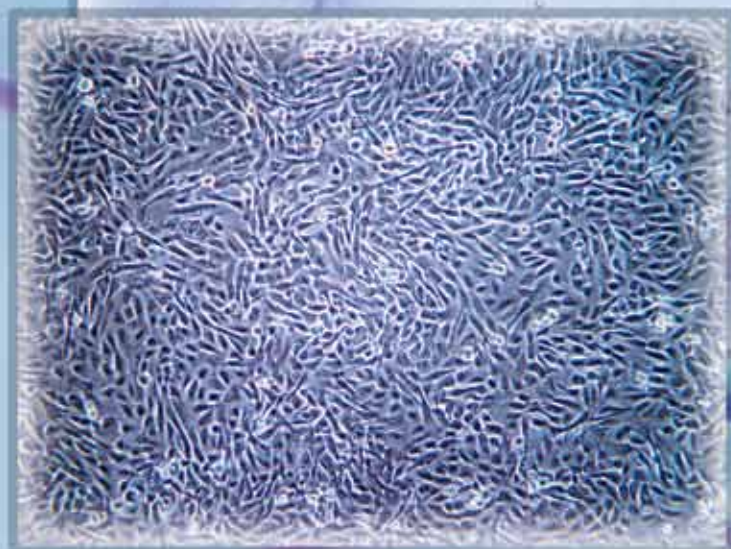
При условиях культивирования клеток, далеких от физиологических, чаще нарушается прохождение клетками нормального клеточного цикла и в культуре клеток наблюдается повышенная частота хромосомных aberrаций [12–14]. Такие последствия крайне нежелательны для разрабатываемых пролиферативных сред, поскольку они используются, в том числе, и для цитогенетической диагностики. Необходимо отметить, что Амниокар уже несколько лет применяется в цитогенетической диагностике, и подобного рода проблем при его использовании не выявлено. По-видимому, это единственный, но достаточно надежный интегральный показатель соответствия разработанной среды физиологическим потребностям клеток.

Заключение

Разработанная пролиферативная среда Амниокар может эффективно применяться для культивирования клеток амниотической жидкости, а также для быстрого накопления биомассы клеток мезенхимального происхождения при культивировании *in vitro*.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Soto-Gutierrez A., Yagi H., Uygun B.E. et al. Cell delivery: from cell transplantation to organ engineering. *Cell Transplant* 2010;19(6):655–65.
2. Freshney R.I. *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*. 5th ed. Hoboken, NJ: John Wiley&Sons, 2005.
3. Boone C.W., Mantel N., Caruso T.D. Jr. et al. Quality control studies on fetal bovine serum used in tissue culture. *In vitro* 1971;7(3):174–89.
4. Табаков В.Ю., Щепкина Ю.В., Честков В.В. Современные принципы классификации и разработки питательных сред для культивирования клеток человека и животных. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2013;(1):47–57. [Tabakov V.Yu., Shchepkina Yu.V., Chestkov V.V. Modern principles of classification and development of nutrient media for cultivation of human and animal cells. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine* = *Cell Technologies in Biology and Medicine* 2013;(1):47–57. (In Russ.)]
5. Wong T., McGrath J. A., Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br J Dermatol* 2007;156(6):1149–55.
6. Chang H.C., Jones O.W., Masui H. Human amniotic fluid cells grown in a hormone-supplemented medium: suitability for prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79(15):4795–9.
7. Табаков В.Ю., Щепкина Ю.В., Честков В.В. Способ культивирования клеток амниотической жидкости и фибробластов человека в специализированной среде «Амниокар». Патент RU № 2415929, приоритет 10.06.2009. [Tabakov V.Yu., Shchepkina Yu.V., Chestkov V.V. Method of cultivation of human amniotic fluid cells and human fibroblasts in the Amniocar specialized medium. Patent RU No. 2415929, priority 10.06.2009. (In Russ.)]
8. Schaefermeier P.K., Cabeza N., Besser J.C. et al. Potential cell sources for tissue engineering of heart valves in comparison with human pulmonary valve cells. *ASAIO J* 2009;55(1):86–92.
9. Takakura N., Watanabe T., Suenobu S. et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000;102(2):199–209.
10. Morgan D.M.L. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. In: *Human Cell Culture Protocols*. Gareth E. Jones (ed.). Totowa, NJ: HumanaPress, 1996. Pp. 104–9.
11. Kuligowski S., Csirke B., Biddle W. et al. AMNIOMAX™-II complete: a second-generation AMNIOMAX medium for primary amniocyte culture. *FOCUS* 1999;21(2):35–7.
12. Полянская Г.Г., Дьяконова М.Ю. Влияние условий культивирования на кариотипическую структуру клеточной сублинии почки кенгуровой крысы. *Цитология* 1988;30(11):1355–63. [Polyanskaya G.G., Diakonova M.Yu. Effect of culture conditions on karyotypic structure of cell subline of the kangaroo rat kidney. *Tsitologiya* = *Cytology* 1988;30(11):1355–63. (In Russ.)]
13. Pochampally R.R., Smith J.R., Ylostalo J., Prockop D.J. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 2004;103(5):1647–52.
14. Tian J., Ishibashi K., Honda S. et al. The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in different culture conditions. *Br J Ophthalmol* 2005;89(11):1510–7.



АМНИОКАР

Готовая к применению среда

Не требует введения дополнительных компонентов

**Эффективное культивирование фибробластов и
других клеток мезенхимного происхождения**



www.paneco.ru, www.paneco-ltd.ru info@paneco.ru (495) 651-93-34

Уважаемые коллеги!

При оформлении статей, направляемых в журнал «Успехи молекулярной онкологии», следует руководствоваться **обновленными правилами**:

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме) на адрес: **adv.mol.onc@ronc.ru**.

Шрифт – Times New Roman, 14 пунктов, через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. На первой странице должно быть указано: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа, **его (их) полный адрес с указанием индекса**.

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

В конце статьи должны быть обязательно приведены **контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество полностью, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание автора (авторов)**, с которым редакция будет вести переписку.

3. Объем статей: оригинальная статья – не более 12 страниц; мини-обзоры – не более 5 страниц; обзор литературы – не более 30 страниц; краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

Структура оригинальной статьи: введение, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение (выводы).

К статьям должно быть приложено **резюме** на русском языке, отражающее содержание работы, с названием статьи, фамилиями и инициалами авторов, названием учреждений; **для оригинальных статей – структурированное резюме** (введение, материалы и методы, результаты и т. д.). Объем резюме – 2000–5000 знаков с пробелами. Количество **ключевых слов** должно составлять от 10 до 50.

4. Иллюстративный материал:

- Фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы – четкими.

- Фотографии представляются в электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

- Графики, схемы и рисунки должны быть представлены в формате MS PowerPoint.

- Все рисунки должны быть пронумерованы. Подписи к рисункам даются на отдельном листе. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписи к рисунку.

- Все таблицы должны быть пронумерованы, иметь название. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

- Ссылки на таблицы, рисунки и другие иллюстративные материалы приводятся в надлежащих местах по тексту статьи в круглых скобках.

5. Единицы измерений даются в СИ.

- Все сокращения (аббревиатуры) в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование не общепринятых сокращений не допускается.

- Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

6. К статье должен быть приложен список цитируемой литературы, оформленный следующим образом:

- Список ссылок приводится **в порядке цитирования**. Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация – строго соответствовать нумерации в тексте статьи. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

- Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте).

- При ссылке на **статьи из журналов** указывают также название статьи; название журнала, год, том, номер выпуска, страницы.

- При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания.

- При ссылке на **авторефераты диссертаций** указывают также полное название работы, вид диссертации (докторская или кандидатская), год и место издания.

- При ссылке на **данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника.

- Все ссылки на литературные источники печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [5]).

- Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно **не более 30 источников**, в обзорах литературы – **не более 100**.

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати в ускоренном виде.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.



Издательский дом «АБВ-пресс» специализируется на выпуске периодической научной медицинской литературы, книгопечатной продукции, создании и поддержке сайтов медицинского направления

НАШИ ЖУРНАЛЫ и ГАЗЕТЫ



НАШИ КНИГИ



Книги и наши издания
можно заказать и приобрести
в редакции по адресу:
г. Москва, Каширское ш.,
д. 24, стр. 15
и по телефону:
+7 (499) 929-96-19.
Адрес электронной почты:
abv@abvpress.ru

НАШИ САЙТЫ



www.netoncology.ru



www.oncoproct.ru



www.roou.ru



www.hnonco.ru



www.urotoday.ru



www.neuromuscular.ru



www.breastcancersociety.ru

