

НЕКОТОРЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Е.Г. Зенит-Журавлева, А.А. Лушникова, доктор биологических наук, Д.А. Понкратова, И.В. Цыганова, кандидат биологических наук, И.Н. Михайлова, доктор медицинских наук, Е.А. Черемушкин, кандидат медицинских наук, А.С. Вихрова, Е.М. Трещалина, доктор медицинских наук, профессор, Л.В. Демидов, доктор медицинских наук, профессор, Н.Н. Мазуренко, доктор биологических наук, профессор

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: LAN21@yandex.ru

Введение. Частота меланомы кожи (МК) в мире постоянно растет. Диагностика и лечение МК на ранних стадиях позволяет увеличить 5-летнюю выживаемость пациентов до 90%. Эту проблему можно решить с помощью персонализированной таргетной терапии, направленной на ключевые сигнальные пути и сигнальные молекулы, к которым относятся онкогены BRAF/NRAS/KRAS и белки с шаперонной активностью нуклеолин/C23 (ген NCL) и нуклеофозмин/B23 (ген NPM).

Цель исследования — анализ структурных изменений генов NCL и NPM, а также наиболее частых мутаций генов BRAF/NRAS/KRAS в клинически охарактеризованных образцах метастатической МК и в подкожных ксенографтах МК человека, которые могут служить моделями для исследования механизмов канцерогенеза и эффективности таргетной терапии.

Методы. Структурные изменения в генах NCL и NPM определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) всех экзонов и прилегающих интронов, последующего конформационно-чувствительного электрофореза ампликонов в ПААГ и их прямого секвенирования; мутации генов BRAF/NRAS/KRAS — с помощью ПЦР и последующего прямого секвенирования ПЦР-продуктов. Проанализировано 30 образцов метастатической МК различных гистологических типов, 2 образца ксенографтов МК и 30 образцов ДНК доноров (группа контроля).

Результаты. В образцах МК впервые обнаружен ряд структурных изменений генов NPM и NCL, кодирующих основные аргирофильные белки нуклеофозмин/B23 и нуклеолин/C23. Эти изменения выявлены в нескольких экзонах и прилегающих к ним интронах генов NCL/NPM, часть из них специфична для МК и не обнаруживается в норме (группа контроля). Комплекс генетических изменений, затрагивающих NCL, NPM, BRAF, NRAS/KRAS и, возможно, другие локусы, создает генетическую нестабильность и молекулярную неоднородность опухоли, порождающие агрессивное течение заболевания и трудности терапевтического воздействия на МК. Обсуждаются возможные механизмы активации ключевых сигнальных путей с участием изучаемых белков и онкогенов.

Заключение. Выявлен и охарактеризован комплекс генетических изменений в метастатической МК человека различных гистологических типов. Это важно для изучения механизмов индукции и прогрессии МК, а также открывает перспективы для создания молекулярно-направленных препаратов широкого спектра действия.

Ключевые слова: метастатическая меланома кожи, нуклеолин/C23, нуклеофозмин/B23, клеточные онкогены, сигнальные пути, таргетная терапия

SEVERAL GENETIC FEATURES OF HUMAN METASTATIC CUTANEOUS MELANOMA

E.G. Zenit-Zhuravleva, A.A. Lushnikova, D.A. Ponkratova, I.V. Tsyganova, I.N. Mikhailova,
E.A. Cheremushkin, A.S. Vikhrova, E.M. Treschalina, L.V. Demidov, N.N. Mazurenko
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russian Federation, 115478

Introduction. The prevalence of human cutaneous melanoma (CM) in the world is constantly rising. Diagnostics and treatment of CM at the early stages allows to increase the 5-year patient survival up to 90%. This problem can be solved with personalized therapy targeted to the key signaling pathways and driver molecules, involving BRAF/NRAS/KRAS and such argyrophilic proteins with chaperone activity as nucleolin/C23 (encoded by NCL gene) and nucleophosmin/B23 (encoded by NPM gene).

Objective. Analysis of NCL/NPM gene structure and the most common BRAF/NRAS/KRAS gene mutations in the clinically characterized samples of the metastatic CM and subcutaneous human CM xenografts, considered as a model for study of the mechanisms of carcinogenesis and effectiveness of targeted therapy, have been done.

Methods. Some changes in NCL/NPM gene structure were determined by PCR for all gene exons and adjacent introns followed by conformation-sensitive electrophoresis and direct sequencing of PCR products. Mutations of BRAF/NRAS/KRAS genes were detected by PCR followed by direct sequencing of PCR products. 30 CM samples of different histological types, 2 human CM xenografts and 30 donor DNA samples (control group) were analyzed.

Results. A number of structural alterations for NPM/NCL genes encoding the main argyrophilic proteins nucleophosmin/B23 and nucleolin/C23 were found. Some of the alterations were revealed in several exons and adjacent introns of NCL/NPM genes. Some combinations of the changes and polymorphic variant in exon 3 of NCL gene were specific for CM and were absent in normal tissue (control group of donors). The complex genetic alterations affecting NCL/NPM, BRAF/NRAS/KRAS genes (and alleged loci), might create genetic instability and molecular heterogeneity of CM that generate tumor aggressiveness and treatment inefficiency. A possible mechanisms for activation of the key signaling pathways, including described oncogenes and proteins have been discussed.

Conclusion. A complex genomic alterations in metastatic CM of different histological types were found and characterized. This may be important for mechanisms of CM induction and progression, and for prospective creation of targeted drugs with wide spectrum of the action.

Key words: metastatic cutaneous melanoma, nucleolin/C23, nucleophosmin/B23, cellular oncogenes, signaling pathways, targeted therapy

ВВЕДЕНИЕ

Меланома кожи (МК) — злокачественная опухоль, возникающая в результате неопластической трансформации меланоцитов и меланобластов. В структуре онкологической заболеваемости МК составляет около 2%, однако эпидемиологические данные указывают на увеличение частоты заболеваемости МК. В России за последние 10 лет частота МК выросла на 21,38% у женщин и на 24,34% — у мужчин, составив в среднем 25,4 на 100 тыс., причем ежегодно заболевают более 7700 пациентов, из них около 50% умирают [1].

При неблагоприятном прогнозе метастатической МК однолетняя выживаемость больных с изолированным поражением кожи, подкожной клетчатки и лимфатических узлов составляет 59%, при поражении легких — 57%, при поражении других внутренних органов или при повышении уровня лактатдегидрогеназы — 41%. МК метастазирует во многие органы, часто затрагивая желудочно-кишечный тракт. Нередко наблюдаются метастазы МК в головной мозг; выживаемость таких пациентов не превышает 4 мес. Именно поражение центральной нервной системы обуславливает летальный исход у 50% больных с метастатической МК.

Для МК характерны агрессивное клиническое течение, высокая метастатическая активность и неблагоприятный прогноз. Наиболее важными прогностическими критериями МК являются гистологический тип, толщина опухоли по Бреслоу и ее изъязвление, а также уровень инвазии по Кларку и митотический индекс. В зависимости от клинико-гистологических вариантов МК 5-летняя выживаемость больных варьирует от 58 до 85%. Улучшение выживаемости при МК связывают прежде всего с ранней диагностикой опухолей, расширением спектра иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров, а также разработкой новых методов лечения, включая молекулярно-направленную (таргетную) терапию [2, 3].

Диагностика МК на ранних стадиях (I–II) позволяет увеличить 5-летнюю выживаемость пациентов до 90%. В последнее время для этой цели используется ряд специфических маркеров, продуцируемых в клетках МК. Более чем в 80% случаев меланомы кожи происходит aberrантная активация MAPK-сигнального пути на уровнях RAS-RAF-MEK-ERK вследствие мутаций в соответствующих генах (рис. 1). Мутации гена *BRAF*, локализованного на хромосоме 7q34 и кодирующего серинтреониновую киназу, обнаруживают в опухолях у 50–70% больных метастатической МК. К настоящему времени известно >100 соматических мутаций гена *BRAF*. В большинстве случаев (до 90% всех мутаций) — это нуклеотидная замена с.1799T>A в экзоне 15, которая приводит к замещению валина на глутаминовую кислоту в позиции 600 полипептида (*V600E/BRAF*). Активация MAPK/ERK-сигнального каскада, опосредованная мутацией *BRAF*, играет ключевую роль в клеточной пролиферации и прогрессии МК. Этот путь активируется также за счет мутаций гена *NRAS* в кодоне *Q61R|K|L* экзона 3, которые обнаруживаются в 15–30% случаев МК. Мутации генов *BRAF* и *NRAS* взаимно исключают, они выявляются также в доброкачественных (незлокачественных) не-

вусах, что свидетельствует о сложном механизме трансформации меланоцитов с участием ряда генов.

В отсутствие драйверных мутаций генов *NRAS* или *BRAF* в МК обнаруживаются мутации генов *KIT*, *PDGFRA*, а также изменения генов, участвующих в регуляции клеточного цикла: амплификация *CCND1* или *CDK4*, делеция гена-супрессора опухолевого роста *CDKN2A*(p16) и другие нарушения. Кроме соматических активирующих мутаций генов *BRAF* и *NRAS*, с помощью секвенирования экзона опухолевых клеток в МК идентифицированы мутации гена *RAC1* и герминальные мутации в генах предрасположенности к МК *BAP1* и *MITF*, а также ряд других генетических нарушений, приводящих к активации ключевых сигнальных путей [4].

Достижения в изучении механизмов канцерогенеза МК привели к разработке новых методов лечения, включая молекулярно-направленную (таргетную) терапию. Перспективными оказались таргетные препараты, блокирующие сигнальные каскады, активированные в результате мутаций генов *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *EGFR*, *CDK2a*, *PTEN* (см. рис. 1) [5, 6]. Например, молекулярно-направленный препарат вемурафиниб на 63% снижает риск летального исхода ($p < 0,0001$; $OR = 0,37$) и на 76% — риск ухудшения клинического течения МК, увеличивая выживаемость без прогрессирования. Показано, что вемурафиниб активен в отношении всех замен в кодоне *V600E|K* [7, 8]. Однако ингибиторы *BRAF* могут индуцировать инвазию и метастазирование клеток с мутациями *RAS* за счет реактивации MEK-ERK-сигнального пути и развития резистентных к терапии опухолей, что требует комбинированного подхода к таргетной терапии МК [9]. В частности, предложена схема комбинированной терапии опухолей с мутациями в гене *BRAF* ингибиторами *CRAF*, *BRAF* и *MEK* [10]. В клетках меланом, резистентных к комбинированной терапии ингибиторами *RAF*-*MEK*, были выявлены нарушения циклического аденозинмонофосфат (цАМФ)-зависимого меланоцитспецифичного сигналинга, включающего рецепторы аденилатциклазы, а также реактивации белка *CREB*, связывающего *PtkA* и цАМФ, и экспрессия *c-FOS*, *NR4A1/A2* и *MITF*. Это говорит в пользу активации целых групп онкогенов в клетках меланоцитарного ряда и необходимости терапии, резистентной к таргетным препаратам меланомы, нацеленной на все ключевые сигнальные пути и хроматин [11]. Показаны низкий уровень экспрессии фосфорилированного *CRAF* и высокий — цАМФ в чувствительных к вемурафинибу клеточных линиях меланомы, а также высокий уровень экспрессии фосфо-*CRAF*, но низкий уровень цАМФ — в резистентных линиях. Поэтому ингибирование *CRAF* через активацию цАМФ позволило бы преодолеть резистентность к вемурафинибу меланом с генотипами (*WT*)*BRAF*/*(WT)**NRAS* [12]. Однако около 60% *EGFR*-позитивных меланом, резистентных к ингибиторам *BRAF*-*MEK*-киназ, могут вновь приобрести чувствительность к таргетной терапии, поскольку в гетерогенной популяции клеток меланомы при отсутствии этих ингибиторов резистентные клетки с высоким уровнем экспрессии *EGFR* и *TGFβ* не имеют пролиферативных преимуществ перед клетками, чувствительными к ингибиторам [13].

Разработка альтернативных стратегий лечения МК зависит от дальнейшего анализа механизмов индукции МК и создания новых моделей для изучения патогенеза опухоли.

В качестве потенциальных терапевтических мишеней большой интерес представляют многофункциональные аргирофильные белки ядрышковых организаторов нуклеолин/C23 (кодируется геном *NCL*) и нуклеофозмин/B23 (кодируется геном *NPM*). Эти белки локализованы в ядрах клеток и в меньшей степени – в цитоплазме. Одной из важнейших функций C23/B23 является контроль прохождения клеткой сверхточных точек (чекпойнтов). Чем выше уровень этих белков в клетке, тем быстрее клетка проходит клеточный цикл, медленнее дифференцируется и наоборот. Нуклеолин и нуклеофозмин регулируют такие ключевые процессы, как биогенез рибосом, транскрипция и трансляция, клеточный сигналинг, пролиферация и апоптоз. В основе этой регуляции лежит межмолекулярное взаимодействие B23 и C23 с множеством белков, включая микро-РНК и белки-супрессоры BRCA1/2 и P53 [14]. Гликированные молекулы C23 входят в состав внеклеточных мембранных белковых комплексов с молекулярной массой 500 кДа, включающих также 2 Wnt-родственных белка, аутоантиген Ku86, распознающие сигнал субъединицы SRP68/72 рецептора комплемента qC1q-R, и рибосомные белки S4/S6, а также пептиды МНС класса I. Молекулы C23 обеспечивают стабильность структуры и функционирование этого комплекса, передачу сигналов клеточной адгезии, миграции, инвазии, регуляцию ангиогенеза и апоптоза, клеточной пролиферации, а также транспорт ионов Ca²⁺ и ряд других функций. Рецепторный C23 считается перспективной молекулярной мишенью для таргетной терапии МК, а также для иммунодиагностики других злокачественных опухолей. Это – основной медиатор для различных лигандов, ассоциированных с онкологической и другой патологией [15–17].

Нуклеофозмин/B23 также является многофункциональным фосфопротеином, в клеточном ядре преобладает полноразмерная изоформа этого белка. От продукции B23 в клетке напрямую зависят транспорт гистонов и сборка хроматина. Резкое изменение уровня B23 индуцирует нарушение митоза, геномную нестабильность и развитие опухоли. В опухолях нередко наблюдаются повышенный уровень экспрессии гена *NPM1* и тесное взаимодействие нуклеофозмина/B23 с белками – продуктами онкогенов и генов-супрессоров *c-Fos*, *c-Myc*, *p53*, *Rb*, *K-Ras* [18]. Локализация нуклеофозмина/B23 в ядрышках и клеточном ядре, его взаимодействие с множеством регуляторных белков и участие в важнейших клеточных функциях указывают на роль нуклеофозмина как атипичного опухолевого супрессора и возможную мишень для таргетной терапии опухолей. Внеядерные молекулы нуклеофозмина и нуклеолина взаимодействуют как с кластером ГДФ-KRAS, так

и с ГТФ-KRAS. Однако после активации рецептора фактора роста фракция ГТФ-KRAS нарастает, что приводит к гиперактивации MAPK-сигнального пути [19]. С мутациями в экзоне 12 гена *NPM* ассоциирован фенотип острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), с транслокацией *NPM-ALK* – анапластическая крупноклеточная лимфома. О структуре генов *NCL* и *NPM* и их экспрессии в клетках метастатической МК пока данных нет.

Цель настоящей работы – анализ структурных изменений генов *NCL* и *NPM*, а также мутаций генов *BRAF* и *NRAS* в клинически охарактеризованных образцах метастатической МК и в подкожных ксенографтах МК человека, которые служат моделями для изучения механизмов канцерогенеза и эффективности таргетной терапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В выборке обследованных было 30 больных МК, наблюдавшихся в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН: 18 женщин (возраст в момент постановки диагноза 41 год – 78 лет; средний возраст – 56,0±16,0 года) и 12 мужчин (возраст соответственно 23 года – 68 лет; в среднем – 41,0±19,0 года). Среди гистологических типов наиболее частыми были беспигментные эпителиоидно-клеточные МК (у 16 из 30), пигментные эпителиоидноклеточные (у 4 из 30), МК смешанного типа (у 3 из 30), пигментная узловая МК (у 3 из 30), в единичных случаях – пигментные и беспигментные веретенноклеточные МК. У 2 обследованных обнаружены первично множественные злокачественные образования (ПМЗО). У пациента Б., 68 лет, была диагностирована беспигментная веретенноклеточная МК передней грудной стенки с множественными метастазами в лимфатических узлах с мутацией *BRAFV600E*, а также рак толстой кишки (РТК) и рак правой почки (РП). У больной Ш., 75 лет, диагностирована эпителиоидно-клеточная МК дистальной фаланги IV пальца кисти с метастазами, в анамнезе – диссеминированный рак легкого (РЛ), аденокарцинома с делецией в экзоне 19 *EGFR* (проводилась таргетная терапия ирессой) и гормонопозитивный протоковый рак правой молочной железы (РМЖ, проводилась мастэктомия).

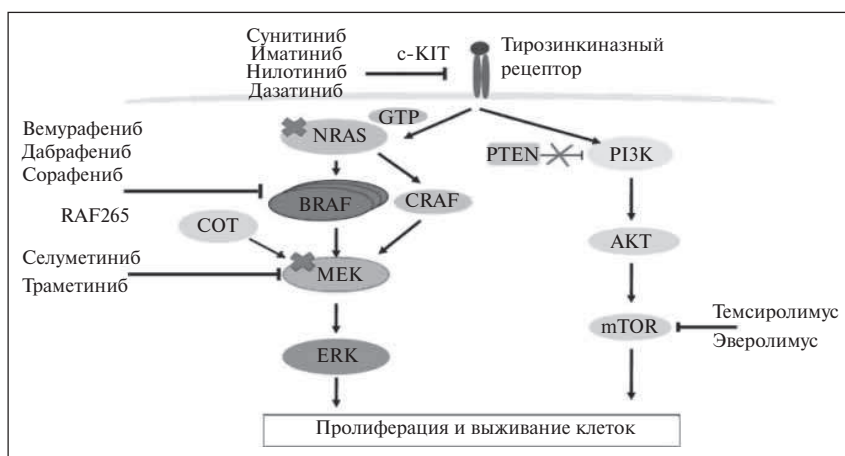


Рис. 1. Схема действия основных таргетных препаратов на ключевые сигнальные пути, активированные в опухолевых клетках МК

Исследовали образцы ДНК, выделенной из 30 метастазов МК и 1 первичной МК, полученных от 30 пациентов с МК различной локализации, а также из 2 подкожных ксенографтов (К) штаммов Mel-6 и Mel-7, полученных при пересадке под кожу бестимусных мышей опухолей от 2 больных МК. ДНК выделяли (из свежей опухолевой ткани и в 1 случае – из архивного материала) с помощью набора НК-Проба-Плюс (ООО «ДНК-технология», Москва) по инструкции производителя. На матрице геномной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплифицировали последовательности генов, кодирующих C23/B23. Для исследования структурных изменений генов *NCL/NPM* были подобраны пары праймеров ко всем кодирующим участкам и прилегающим интронным последовательностям и соответствующие условия ПЦР (табл. 1). Полученные ПЦР-продукты анализировали с помощью конформационно-чувствительного электрофореза и последующего секвенирования измененных вариантов в ООО «Генотех» на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 500. В качестве контрольных образцов использовали ДНК, выделенную из периферической крови здоровых доноров в сопоставимой по возрасту и полу группе (n=30).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследуемых образцах МК мы обнаружили различные структурные изменения генов *NPM/NCL*: однонуклеотидные замены, интронные структурные варианты и новую герминальную делецию 3 нуклеотидов в экзоне 4 гена *NCL*. Кроме того, были выявлены уже известные полиморфные варианты – ПВ (база данных *Ensembl*

genome browser/ncbi.nlm.nih.gov/). Многие из указанных изменений встречались в изученных образцах опухолей неоднократно и были представлены несколькими типами (табл. 2). Сравнение типов структурных изменений в образцах МК и в контроле позволило выявить несколько общепопуляционных ПВ, а также структурные изменения генов *NPM/NCL* и их комбинации, которые не обнаруживаются в контроле (рис. 2).

Изменения в структуре гена *NPM*

Ген *NPM* локализован на хромосоме 5q35.1, содержит 12 экзонов и 11 интронов протяженностью 23181 п.н., известно более 12 псевдогенов. Наряду с полноразмерным белком, молекулы которого содержат 294 аминокислотных остатка, в результате альтернативного сплайсинга образуются еще 2 изоформы B23. Молекула B23/нуклеофозмина содержит уникальные области, ответственные за олигомеризацию, шаперонную активность, связывание с нуклеиновыми кислотами и белками. Мы выявили структурные изменения гена *NPM* в 22 из 30 проанализированных образцов МК. В большинстве случаев они были локализованы в интронах 5 и 6 (всего 17/30) и представлены сочетанием 2 однонуклеотидных замен *IVS5 31A/G + IVS6 42G/A*; в интронах 6 и 8 (8/30 и 6/30 соответственно), представленных однонуклеотидными заменами *IVS6-39A/G + (-42)A/G* и *IVS8 -63A/G* (см. табл. 2). Аналогичные интронные варианты были обнаружены в контроле с сопоставимой частотой (рис. 2). С учетом относительно высокой частоты выявленных генетических изменений, а также их обнаружения в опухолях другой локализации (ксенографты РТК, РЛ и РП, собственные данные) можно предполагать функциональную значимость описан-

Таблица 1

СПИСОК ПРАЙМЕРОВ И УСЛОВИЯ ПЦР ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *NCL/NPM* И *BRAF, NRAS* И *KRAS* С ОБНАРУЖЕННЫМИ СТРУКТУРНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ

№	Пары праймеров	Последовательности (5' – 3')	Температура отжига праймеров, °С/длина ампликона, п.н.
1	NPM 7F NPM 7R	AAGTTCCTTTTCCCATGTGC GAACAAGAGCTGTTCTATCACCAA	59/240
2	NPM 8F NPM 8R	ACTTCAAGGTCCTGCTTTC ATGATCTCCACACCAGCTT	59/240
3	NPM 10F NPM 10R	AGCTTTATAAGGGAGTTTTGTGAGAA AAACATTC AAGTCTATGCAAACCA	59/360
4	NCL 2F NCL 3R	GCGTATGAACACTAATGGCAA TTGCCACAGATATCCAATTTCA	59/280
5	NCL 3F NCL 3R	GGGGCTGGACTTACTGGTTT CTTGGCATTCTTGCCATTCT	59/320
6	NCL 4F NCL 4R	TGTTGGTTTTGGGAGATTGC CCTCCTTAAACATAACTCATGTCCG	59/280
7	BRAF-Ex15BR-For BRAF_ Ex15BR_Rev	ACCTAAACTCTTCATAATGCT ACAACCTGTTCAAACCTGATGG	56/173
8	Ex3-NRAS_For Ex3-NRAS_Rev	AATTGAACTTCCCTCCCTCCCT AATTGAACTTCCCTCCCTCCCT	68/150
9	Ex2 KRAS-For Ex2 KRAS-Rev KR-shEx2-Rev	ATGACTGAATATAAACTTGTGG TTATCTGTATCAAAGAATGGT TGCATATTAACAAGATTTACC	54/153

ных генетических изменений. Дальнейший анализ структуры гена *NPM* в неизменной ткани и других образцах МК позволит проверить это предположение.

На С-конце молекулы *B23* имеется кластер положительно заряженных аминокислот, ответственный за связывание этого белка с молекулами ДНК и РНК, аденозинтрифосфата, белками ядрышка, а также за транспорт гистонов и рибонуклеазную активность. Показано, что взаимодействие *B23* с транскрипционными факторами, белками-супрессорами и другими регуляторными белками с последующими посттрансляционными изменениями приводит к изменению профиля экспрессии этих белков, в частности к увеличению уровня экспрессии протеинкиназы *B* – *pAkt*, обуславливающему трансформацию тироцитов и развитие рака щитовидной железы [20]. Метаанализ 106 различных *B23*-ассоциированных белков выявил 6 прогностически значимых для саркомы Юинга полипептидов, активность которых регулируется нуклеофозином [21]. Метаанализ с помощью микрочипов уровня экспрессии генов в клетках кишечника в норме, в аденомах и при колоректальном раке (КРР) выявил дифференциальную экспрессию *NPM* в зависимости от прогрессии опухолей; подавление экспрессии гена *NPM* в культуре клеток с помощью малых ядерных (мя) РНК приводило к *r53*-опосредованному аресту клеточного цикла и супрессии опухолевого роста [22]. Более того, профиль экспрессии гена *NPM* в культуре КРР коррелировал с миграцией опухолевых клеток и с их инвазией [23]. Другой механизм канцерогенеза связан с взаимодействием *B23* и транскрипционного фактора *FOXM1*, активирующего транскрипцию целого ряда генов, включая онкогены, что может привести к индукции опухолевого роста [24].

Структурные изменения гена *NPM* могут повлиять на первичную структуру функционально важных доменов, изменяя физико-химические свойства белка и его биологическую активность. Дальнейшая характеристика таких изменений позволит прояснить механизмы *B23*-опосредованной индукции опухолевого роста.

Изменения в структуре гена *NCL*

Ген *NCL*, кодирующий нуклеолин, картирован на хромосоме 2q37.1, содержит 14 экзонов и 13 интронов протяженностью около 11 т.п.н., интрон 11 кодирует мяРНК *U20*. Будучи многофункциональным белком, нуклеолин/*C23* участвует в регуляции важнейших клеточных процессов, включая транскрипцию, биогенез рибосом, стабилизацию РНК и трансляцию, а также процессинг микроРНК. В молекуле *C23* имеется 4 РНК-связывающих домена и обогащенный аргинином/глицином домен, которые взаимодействуют с молекулами РНК и опосредуют клеточную пролиферацию, блок апоптоза с последующим развитием опухолей, генерализацией

вирусных инфекций и другими патологическими процессами. На С-конце молекулы *C23* локализован домен *RGG* (*GAR*) – 9-членный повтор триплета Арг-Гли-Гли, важный для функционирования гликированного рецепторного нуклеолина [25]. Нарушение интактной молекулярной структуры *C23*, вызванное генетическими изменениями, может иметь критическое значение для индукции неоплазий. В 3 из 30 (10%) проанализированных образцах метастатической МК были выявлены однонуклеотидные замены *IVS2+31G/A* в интроне 2 гена *NCL* и в 1/30 – уже известный полиморфизм *p. E149E (GAG/GAA)* в экзоне 3, который не встретился в ДНК контрольных образцов и может рассматриваться как специфичный для МК. Эти варианты представляют интерес, поскольку ДНК, не кодирующая белки, по-видимому, функционально значима. Дело в том, что соответствующая некодирующая РНК (нкРНК, *ncRNA*), может выполнять регуляторные функции, включая опосредованный транскрипцией нкДНК сайленсинг соседних генов и их промоторов – транскрипционную интерференцию. Наличие интронных вариантов гена *NCL* указывает на возможное изменение регуляторных функций в случае нкРНК. Этот вопрос также требует дальнейшего изучения с привлечением обширной выборки больных с метастатической МК.

Впервые обнаруженная нами герминальная делеция *del c.763-765 GAT* в экзоне 4 гена *NCL* затрагивает обогащенный аспарагином и глутаминовой кислотой домен этого белка, участвующий во взаимодействиях с нуклеиновыми кислотами и кислыми белками (база данных *Ensembl*). По нашим предварительным данным, частота этой мутации в контрольной группе доноров в 5–6 раз превышает частоту у пациентов с МК. Однако в отличие от доноров, у пациентов с МК делеция встречается в ~15% случаев в сочетании с другими интронными вариантами, например *IVS2+31G/A* и ПВ (синонимичной

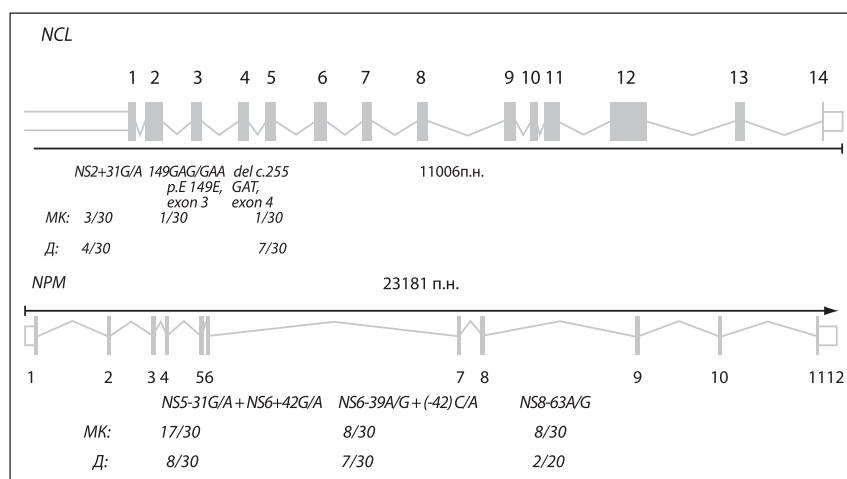


Рис. 2. Схемы транскриптов генов *NCL* (вверху) и *NPM* (внизу); цифрами обозначены экзоны (вертикальные линии), соединенные интронными последовательностями (кривые), которые вырезаются при сплайсинге. Внизу показано количество экзонных структурных изменений и полиморфных интронных вариантов, обнаруженных в ДНК из клеток метастатической МК и в ДНК доноров (Д)

заменой) *p. E149E (149 GAG/GAA)* в экзоне 3 гена *NCL*. У доноров эта делеция обнаруживается либо в сочетании с *IVS2+31G/A* в интроне 2 гена *NCL*, либо отдельно (примерно в равных пропорциях). Структурный анализ этой мутации в гене *NCL*, затрагивающей функционально важный домен, будет представлен в следующей статье.

Хотя *C23* локализован преимущественно в ядрышках, он участвует в ядерно-цитоплазматическом транспорте и высоко экспрессируется на поверхности некоторых типов клеток. Ингибирование активности рецепторного нуклеолина блокирует рост опухолевых клеток молочной железы, предстательной железы и мозга (глиомы) [25]. У пациента Ч., 40 лет – носителя данной мутации, было отмечено 5 рецидивов МК в течение непродолжительного времени наблюдения. Аналогичная картина быстрого прогрессирования опухоли наблюдалась у 2 других пациентов с указанной делецией в гене *NCL*, но без мутации (данные здесь не представлены).

Известно, что фосфорилированный нуклеолин активно взаимодействует с комплексом различных клеточных белков, участвуя в ключевых процессах клеточной жизнедеятельности. Активация *C23* приводит к быстрой пролиферации клеток и стимулирует опухолевый рост. Обнаруженные недавно статистически значимые изменения уровня экспрессии *NCL* при немелкоклеточном раке легкого имеют прогностическое значение [26]. Более того, были сконструированы 2 аптамерных моле-

кулярных химеры нуклеолин-мРНК, ингибирующие экспрессию *SLUG/NRP1* и опухолевый рост модельных ксенографтов РЛ [27].

Мультифакторный анализ выявил прогностическую значимость экспрессии *NCL* для ряда других неоплазий, включая детские эпендимомы, а также остеосаркомы и глиомы [28]. Показано, что взаимодействие С-концевого аргинин-глицин-богатого домена *C23* с коактиватором β -рецептора ретиноевой кислоты *COUP-TFII* создает основу для инвазивного роста опухоли при протоковом раке молочной железы (РМЖ) [29]. Неспецифический механизм индукции канцерогенеза заключается, по-видимому, в активации за счет гиперпродукции *C23* роста эндотелиальных клеток и стимуляции ангиогенных факторов роста, например плейотропина [30]. Альтернативный механизм заключается во взаимодействии молекул *C23* с активатором плазминогена урокиназного типа (*uPAR*), благодаря которому активатор переносится в ядро и участвует в регуляции генной экспрессии [31]. Отметим, что молекулы *C23* и интегрин являются рецепторами интегрин $\alpha 5 \beta 1$, опосредующего экспрессию *uPAR* так, что комплекс *C23/α5β1/uPAR* способствует интернализации и транспорту эндостатина в клеточное ядро. Особый интерес вызывают исследования роли *C23* в развитии меланомы [17, 19].

Активированные молекулы *RAS* и рецептор *ErbB1* семейства эпидермальных факторов роста взаимодейству-

Таблица 2

ТИПЫ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНОВ *NPM/NCL* И СПЕЦИФИЧНЫЕ МУТАЦИИ *BRAF/NRAS/KRAS* В ОБРАЗЦАХ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МК

Тип	Ген	Изменение	Частота обнаружения	Комбинации генетических изменений <i>NPM/NCL</i> и мутаций в образцах МК
1	<i>NPM</i> , интроны 5–6	Одновременно <i>IVS5-31G/A</i> и <i>IVS6 + (-42)G/A</i>	17 (57%) образцов и 1 ксенографт	<i>mun 1 + BRAF V600E</i> , включая <i>1BRAF V600K</i> : 8 (27%) образцов: из них 5 (17%): <i>mun 1 + V600E BRAF + mun 4</i> и <i>mun 5 (NCL)</i> ; 2 образца: <i>mun 1 + Q61R NRAS</i> ; 1 образец: <i>mun 1 + G13D KRAS</i>
2	<i>NPM</i> , интрон 6	Однонуклеотидная замена <i>IVS6 -39A/G + mun 1</i>	8 (26%) образцов МК	4 (13%) образца: <i>mun 2 + BRAF V600E + mun 4 (NCL) + mun 5 (NCL)</i>
3	<i>NPM</i> , интрон 8	Однонуклеотидная замена <i>IVS8-63A/G + mun 1</i>	6 (20%) образцов	5 (16%) образцов: <i>mun 3 + BRAF V600E</i> , 2 (6%) образца: <i>mun 3 + Q61R NRAS</i>
4	<i>NCL</i> , интрон 2	Однонуклеотидная замена <i>IVS2+31G/A</i>	4 (13%) образца	<i>Tun 4 + BRAF V600E + mun 1 (NPM)</i> (все 4 образца – быстро рецидивирующая МК)
5	<i>NCL</i> , экзон 3	Однонуклеотидная замена (ПВ) <i>p. E149E (GAG/GAA)</i>	7 (23%) образцов	6 (20%) образцов: <i>mun 5 + BRAF V600E + mun 1</i> ; 1 образец: <i>mun 5 + Q61R NRAS</i>
6	<i>NCL</i> , экзон 4	<i>Del c.255 (763-765 GAT) + mun 4</i>	1 образец	<i>E149E (149GAG/GAA)</i> + герминальная делеция в экзоне 4 <i>NCL</i> , семейное отягощение, 5 рецидивов МК
7	<i>BRAF</i>	<i>BRAF V600E</i>	15 (50%) образцов 1 из 2 ксенографтов	13 (43%) образцов: эпителиоидно-клеточная МК с множественными метастазами, 1/30 – веретенноклеточная МК; 1/30 – ПМЗО: МК+РТК+РП
8	<i>BRAF</i>	<i>BRAF V600K</i>	1 образец	Рецидивирующая МК с замещением лимфоидной ткани опухолью
9	<i>NRAS</i>	<i>NRAS Q61R</i>	3 образца	2 образца – рецидивирующие узловые МК спины
10	<i>KRAS</i>	<i>KRAS G13D</i>	1 образец	ПМЗО: МК+РЛ+РМЖ

ют с молекулами C23, обеспечивая 3-мерный рост клеток меланомы, пересекающих под кожу иммунодефицитных мышей [25]. Поэтому разработка C23-молекулярно-направленных препаратов перспективна для ингибирования опухолевого роста, индуцированного при активации ряда онкогенов и клеточных рецепторов [32].

Мутации гена *BRAF*

Соматические мутации гена *BRAF* наблюдаются в 40–88% случаев МК, наиболее распространена мутация *BRAF V600E* в экзоне 15. Наличие мутаций гена *BRAF* указывает на неблагоприятный прогноз: более ранний возраст начала заболевания, высокую частоту местных рецидивов с поражением регионарных лимфатических узлов (ЛУ) и инвазией опухоли в глубокие слои кожи, быстрый рост опухолей и низкую выживаемость пациентов. В исследованной нами выборке мутации в экзоне 15 *BRAF* обнаружены в 15 из 30 (50%) случаев: в 12 из них выявлена типичная замена *V600E*, в 1 – обнаружена мутация *BRAFV600K*. У всех носителей этих мутаций гена *BRAF* были диагностированы множественные метастазы в ЛУ, а в ряде случаев – в легкие и печень. У пациентки Т., 50 лет, мутация *BRAF V600E* была обнаружена в первичной опухоли, а также в метастазах МК в ЛУ и легких. В 15 из 30 образцов МК мутация *V600EBRAF* сочеталась со структурными изменениями в интронах 5, 6 и 8 гена *NPM*, включая образец с ПВ в экзоне 3 гена *NCL* (см. табл. 2). В 3 образцах эпителиоидно-клеточной МК спины с множественными метастазами в лимфоузлы и замещением лимфоидной ткани, мутация *V600EBRAF* сочеталась с изменениями сразу в 2 генах – *NPM* (интроны 5, 6 и 8) и *NCL* (интрон 2 и экзон 3). В 1 из 2 образцов метастатической МК в составе ПМЗО (МК + РТК + РП) мутация *V600EBRAF* сочеталась с ПВ *IVS 6 -39A/G + (-42)C/A* в интроне 6 гена *NPM*, а в другом случае (МК + РЛ + РМЖ) герминальные мутации в экзоне 2 гена *KRAS* и в экзоне 19 *EGFR* сочетались с ПВ *p. E149E (149 GAG/GAA)* в экзоне 3 гена *NCL*. Предполагается, что мутации гена *BRAF* в метастатических очагах МК, в отличие от первичной МК, ассоциированы с ухудшением прогноза заболевания и снижением общей выживаемости [33]. По-видимому, сочетание этих мутаций со структурными изменениями ключевых для клеточной пролиферации и сигналинга генов *NCL/NPM* вносит дополнительный вклад в прогрессию МК посредством активации в клетках ключевых сигнальных путей.

Мутации онкогенов *RAS*

Семейство онкогенов *RAS* кодирует малые ГТФазы, передающие внеклеточные сигналы и регулирующие ключевые процессы в клетке: рост, дифференцировку, подвижность и апоптоз. Активированная в результате мутаций изоформа *NRAS* участвует в RAS/RAF/MAPK-зависимом клеточном сигналинге, индуцируя клеточную пролиферацию и прогрессию опухолей. Мутации гена *NRAS* обнаруживаются в 5–33% случаев МК. Нанокластеры Ras-GTP также участвуют в рекрутировании на плазматической мембране комплексов Raf/MEK и ERK и в индукции/активации MAPK-сигнального каскада [19].

Молекулы B23 и C23 специфически связываются с молекулами K-Ras, но не с H-Ras на внутренней сто-

роне клеточной мембраны, это взаимодействие является критическим для MAPK-зависимого сигналинга. О взаимодействии B23/C23 с N-RAS известно значительно меньше. Мутация *Q61R NRAS* была обнаружена нами в 3 из 30 образцов МК, включая 2 образца рецидивирующей узловой МК спины с метастазами в ЛУ, легких и печени (в 1 случае). В 2/3 образцов (МК с метастазами в ЛУ и легких) мутация гена *NRAS* сочеталась со структурными изменениями в экзонах 7 и 10 гена *NPM* (типы 1 и 3; см. табл. 2). Мутация *G13D KRAS* была идентифицирована в 1 из 30 образцов МК у пациентки с ПМЗО (МК + РЛ + РМЖ) в сочетании с герминальной мутацией гена *EGFR*, ПВ в интроне 6 гена *NPM* и специфичным ПВ в экзоне 3 гена *NCL*, не встречающимся в контрольной популяции доноров. Отметим, что последовательности экзона 3–4 кодируют домены C23, ответственные за взаимодействие с РНК, ДНК и гистоновыми белками. Эта активность нуклеолина важна для удаления нуклеосомных гистонов H2A/H2B и H3/H4 при репарации двуцепочечных разрывов ДНК в фазе G1 клеточного цикла. Нуклеолин регулирует трансляцию мРНК, связываясь с G-богатыми мотивами или с UTR, путем деацетилирования мРНК в комплексе с поли(А)-связывающим белком (PABPC) и тем самым усиливает экспрессию ряда онкобелков.

Для модуляции нуклеолин-зависимой экспрессии ряда микроРНК, ассоциированных с прогрессией РМЖ, предложено использовать синтетические аптамеры с высоким содержанием гуанозина, ингибирующие активность рецепторного нуклеолина [34]. Для меланомы разрабатывается другой оригинальный подход с использованием РНК-связывающей активности нуклеолина [35]. Таким образом, многофункциональный шаперон нуклеолин является перспективной мишенью для молекулярно-направленной терапии ряда опухолей, включая МК.

В настоящее время рассматривается несколько подходов к анализу ключевых сигнальных путей и нарушений их регуляции, которые приводят к развитию меланомы: 1) поиск мутаций в генах-мишенях и регуляторных белков-маркеров прогрессии МК; 2) создание фармакологических агентов для таргетной терапии сигнальных молекул; 3) анализ лекарственной устойчивости и механизмов индукции МК; 4) изучение механизмов резистентности МК к лекарственной терапии [36]. Комплексный анализ генетических изменений при метастатической МК создает основу для развития всех этих направлений клинической онкологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отсутствие эффективных методов лечения метастатической МК делает особенно актуальным поиск и характеристику молекулярно-генетических маркеров прогрессии.

Анализ образцов метастатической МК с помощью специфичной ПЦР, конформационно-чувствительного электрофореза и последующего секвенирования ПЦР-продуктов позволил нам обнаружить ряд генетических изменений генов *NPM* и *NCL*, кодирующих B23/нуклеофозмин и C23/нуклеолин. Выявлены специфичные изменения в экзоне 3 гена *NCL* и характерные для образцов метастатической МК сочетания структурных вариантов

с делецией в экзоне 4 гена *NCL*. Выявленные в исследованной выборке пациентов (n=30) и в контрольной группе (n=30) изменения гена *NPM* не отличались по своей структуре, за исключением полиморфизма в экзоне 3 гена *NCL*, т.е. были неспецифичными. Однако в образцах метастатической МК были обнаружены специфичные комбинации указанных ПВ друг с другом и с мутациями онкогенов *BRAF/NRAS*. Совокупность этих структурных изменений нужно рассматривать в связи с функциональной активностью *B23/C23* и динамикой клеточных процессов в целом. При этом возможно изменение структуры функционально важных доменов с последующей деструкцией или стабилизацией молекул, а также посттрансляционными изменениями с участием микроРНК и длинных некодирующих РНК. Дальнейший структурно-функциональный анализ генов *NPM/NCL* важен для понимания механизмов индукции и про-

грессии злокачественной МК. Комплекс генетических изменений, включая гены *NCL*, *NPM*, *BRAF*, *NRAS* и, возможно, другие локусы, создает генетическую нестабильность и молекулярную неоднородность опухоли, в частности стволовых опухолевых клеток с повышенным метастатическим потенциалом. Это способствует агрессивному течению заболевания и создает трудности для эффективной терапии МК.

Характеристика найденных изменений в ключевых генах *NPM/NCL*, кодирующих многофункциональные регуляторные белки, с использованием как клинического материала, так и модельных систем, например ксенографтов МК у иммунодефицитных мышей имеет важное значение. Она позволила бы уточнить механизмы онкогенеза МК и определить новые стратегии лечения для диссеминированной МК, которая стоит сейчас в первом ряду заболеваний, перспективных для таргетной терапии [37].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2011 г. (заболеваемость и смертность). Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2013. (Malignant neoplasms in Russia in 2011 (morbidity and mortality). Eds. V.I. Chissov, V.V. Starinsky, G.P. Petrova. Moscow. 2013 (in Russian))
2. Демидов Л.В., Соколов Д.В., Булычева И.В. Совершенствование методов диагностики меланомы кожи. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2007; 18 (1): 36–41. (Demidov L.V., Sokolov D.V., Bulytcheva I.V. Improvement of diagnostics methods for cutaneous melanoma. Bulletin of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the RAMN. 2007; 18 (1): 36–41 (in Russian))
3. Зенит-Журавлева Е.Г., Полковниченко Е.М., Лушников А.А., Трещалина Е.М., Букаева И.А., Райхлин Н.Т. Нуклеофосмин и нуклеолин: кодирующие гены и экспрессия в различных тканях человека и животных. Молекулярная медицина. 2012; 4: 24–30. (Zenit-Zhuravleva E.G., Polkovnichenko E.M., Lushnikova A.A., Treschalina H.M., Bukaeva I.A., Raikhlin N.T. Nucleophosmin and nucleolin: coding genes and expression in various tissues of humans and animals. Molecular Medicine. 2012; 4: 24–30 (in Russian))
4. Bello D.M., Arjyan Ch.E., Carvajal R.D. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. Cancer Control. 2013; 29 (4): 261–81.
5. Olszanski A. Current and future roles of targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma. J. Manag. Care Pharm. 2014; 20 (4): 346–56.
6. Tsao H., Chin L., Garraway L.A., Fisher D. Melanoma: from mutations to medicine. Genes Dev. 2012; 26 (11): 1131–55.
7. Lemech Ch., Infante J., Arkenau H-T. The potential for BRAF V600 inhibitors in advanced cutaneous melanoma: rationale and latest evidence. Ther. Adv. Med. Oncol. 2012; 4 (2): 61–73.
8. Woodman S.E., Lazar A.J., Aldape K.D. et al. New strategies in melanoma: molecular testing in advanced disease? Clin. Cancer Res. 2012; 18: 1195–200.
9. Asundi J., Lacap J.A., Clark S. et al. MAPK pathway inhibition enhances the efficacy of an anti-endothelin B receptor drug conjugate by inducing target expression in melanoma. Mol. Cancer Ther. 2014; PMID: 24651527.
10. Sullivan R.J., Flaherty K. MAP kinase signaling and inhibition in melanoma. Oncogene. 2013; 32 (19): 2373–79.
11. Johannesen C.M., Johnson L.A., Piccioni F. et al. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. Nature. 2013; 504: 138–42.
12. Krayem M., Journe F., Wiedig M. Prominent role of cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in the sensitivity of (WT)BRAF/(WT) NRAS melanoma cells to vemurafenib. Eur. J. Cancer. 2014; 50 (7): 1310–20.
13. Sun C., Wang L., Huang S. et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF (V600E) inhibition in melanoma. Nature. 2014; 508 (7994): 118–22.
14. Wu D.M., Zhang P., Liu R.Y. et al. Phosphorylation and changes in the distribution of nucleolin promote tumor metastasis via the PI3K/Akt pathway in colorectal carcinoma. FEBS Lett. 2014; doi:10.1016/j.febslet.2014.03.047.
15. Abdelmohsen K., Gorospe M. RNA-binding protein nucleolin in disease. RNA Biol. 2012; 9 (6): 799–808.
16. Fujiki H., Watanabe T., Suganuma M. Cell-surface nucleolin acts as a central mediator for carcinogenic, anti-carcinogenic, and disease-related ligands. J. Cancer Clin. Oncol. 2014; 140: 689–99.
17. Hoja-Lukowich D., Przybylo M., Poche E. et al. The new face of nucleolin in human melanoma. Cancer Immunol. Immunother. 2009; 58 (9): 1471–78.
18. Li L., Hou J., Liu X. et al. Nucleolin – targeting liposomes guided by aptamer AS 1411 for delivery of siRNA for the treatment of malignant melanomas. Biomaterials. 2014; 35 (12): 3840–50.
19. Inder K.L., Lau C., Loo D. et al. Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. J. Biol. Chem. 2009; 284: 28410–19.
20. Piantaa A., Pyppina C., Franzonib A. et al. Nucleophosmin is overexpressed in thyroid tumors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010; 397 (3): 499–504.
21. Haga A., Ogawara Y., Kubota D. et al. Interatomic approach for evaluating nucleophosmin-binding proteins as biomarkers for Ewing sarcoma. Electrophoresis. 2013; 34 (11): 1670–78.
22. Wong J.C., Hasan M.R., Rahman R. et al. Nucleophosmin 1, upregulated in adenoma and cancers of the colon, inhibits p53-mediated cellular senescence. Int. J. Cancer. 2013; 133 (7): 1567–77.
23. Liu Y., Zhang X-F., Qi L-Sh. et al. Expression of nucleophosmin /NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. J. Biochem. Sci. 2012; 19: 53–59.
24. Bhat U.G., Jagadeeswaran R., Halasi M., Garitel A.L. Nucleophosmin interacts with FOXM1 and modulates the level and localization of FOXM1 in human cancer. J. Biol. Chem. 2011; 286 (48): 41425–33.
25. Schokorov S., Juster D., Kloog Y., Pinkas-Kramardki R. Disruption the oncogenic synergism between nucleolin and Ras results in cell growth inhibition and cell death. PLoS One. 2013; 8 (9): e 75269. doi 10.1371.
26. Zao H., Huang Y., Xue C. et al. Prognostic significance of the combined score of endothelial expression of nucleolin and CD31 in surgically resected non-small cell lung cancer. PLoS One. 2013; 8 (1) doi: 10.1371.
27. Lai W.Y., Wang W.Y., Chang Y.C. et al. Synergistic inhibition of lung cancer cell invasion, tumor growth and angiogenesis using aptamer-siRNA chimeras. Biomaterials. 2014; 35 (9): 2905–14.
28. Modena P., Buttarelli F.R., Miceli R. et al. Predictors of outcome in an AIEOP series of childhood ependymomas: a multifactorial analysis. Neuro Oncol. 2012; 14 (11): 1346–59.
29. Lichfield L.M., Riggs K.A., Hockerberry A.M. et al. Identification and characterization of nucleolin as a COUP-TFII coactivator of retinoic acid receptor β transcription in breast cancer cells. PLoS One. 2012; 7 (5): 131–7.
30. Koutsoumpa M., Papadimitriou E. Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies. Recent Pat. Anticancer Drug Discov. 2013; Nov 18. PMID: 24251811.
31. Stepanova V., Lebedeva T., Kuo A. et al. Nuclear translocation of urokinase-type plasminogen activator. Blood. 2008; 112 (1): 100–10.
32. Birmpas C., Briand J.P., Courty J., Katsoris P. The polypeptide HB-19 binds to cell surface and inhibits angiogenesis. Vasc. Cells. 2012; 4 (1): 4–21.
33. Amaria R.N., Kim K.B. Dabrafenib for the treatment of melanoma. Expert. Opin. Pharmacother. 2014; Apr 10. (Epub ahead of print)
34. Pichiorri F., Paimieri D., De Luca L. et al. In vivo NCL targeting affects breast cancer aggressiveness through miRNA regulation. J. Exp. Med. 2013; 6 (5): 951–68.
35. Li L., Hou J., Liu X. et al. Nucleolin – targeting liposomes guided by aptamer AS 1411 for delivery of siRNA for the treatment of malignant melanomas. Biomaterials. 2014; 35 (12): 3840–50.
36. Evans M.S., Madhanapandhula S.V., Robertson G.P. et al. Current and future trials of targeted therapies in cutaneous melanoma. Adv. Exp. Med. Biol. 2013; 799 (2): 223–55.
37. Jarkowski A., Khushalani N.I. BRAF and beyond: tailoring strategies for the individual melanoma patient. J. Carcinog. 2014; 13 (1): 1–14.

Поступила 16 мая 2014 г.