

ФГУ «НИИ онкологии  
им. Н.Н. Петрова  
Росмедтехнологий»  
Минздравсоцразвития РФ,  
Санкт-Петербург

## ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ В 2010 ГОДУ: ОБЗОР НАИБОЛЕЕ ИНТЕРЕСНЫХ ОТКРЫТИЙ

Е.Н. Имянитов

*Псевдогены всегда считались бесполезным генетическим материалом, представляющим побочные продукты эволюции геномов. Группа американских учёных, возглавляемых профессором Pier Paolo Pandolfi, в 2010 г. представила первые доказательства участия псевдогенов в регуляции работы генома; по-видимому, это открытие является самым сенсационным событием медико-биологической науки прошедшего года*

### Специфическое лечение паранеопластической кахексии увеличивает продолжительность жизни лабораторных животных

Неблагоприятное влияние общего истощения онкологических больных на течение и исход заболевания является аксиомой клинической онкологии [6]. Борьба с опухоль-ассоциированной кахексией предусматривает меры преимущественно вспомогательного характера, направленные на увеличение калорийности ежедневного рациона. Примечательно, что до настоящего момента не существовало строгих экспериментальных доказательств, демонстрирующих непосредственную взаимосвязь между паранеопластической утратой мышечной массы и снижением продолжительности жизни. Помимо этого, несмотря на существование целого спектра потенциально эффективных подходов к специфической коррекции молекулярных нарушений, вызывающих кахексию, возможности «таргетной» терапии данного осложнения редко воспринимаются в качестве приоритетного направления клинической онкологии. В этом контексте представляется исключительно интересной работа, выполненная специалистами компании Amgen в сотрудничестве с учёными из Гарвардской медицинской школы [24]. Авторы исследования обратили внимание на роль рецептора активина второго типа (ActRIIB, activin type 2 receptor) в патогенезе паранеопластической кахексии. Установлено, что этот рецепторный каскад может активироваться при целом ряде онкологических процессов; более того, модельные эксперименты свидетельствуют о том, что инактивация ActRIIB сопровождается мышечной гипертрофией. Zhou et al. [24] использовали различные подходы, позволяющие угнетать функцию ActRIIB in vivo. Блокирование ActRIIB-опосредованного сигнального каскада у подопытных мышей, поражённых распространённым онкологическим процессом, приводило к полной реверсии мышечной кахексии и, несмотря на продолжающийся опухолевый рост, сопровождалось значительным увеличением общей продолжительности жизни животных.

### Полногеномное секвенирование опухолевой ДНК

Секвенированием называется группа методов, позволяющих расшифровывать нуклеотидную последовательность молекулы ДНК. Первые способы секвенирования были предложены в конце 1970-х гг. и позволили идентифицировать многие биологически важные гены, а также выявить мутации, ассоциированные с различными патологическими процессами. Секвенирование всегда являлось чрезвычайно трудоёмким и дорогостоящим методом. В 1990-х гг. были осуществлены революционные разработки, позволившие автоматизировать некоторые компоненты нуклеотидного анализа ДНК и значительно удешевить многие из его этапов. Эти достижения позволили инкорпорировать секвенирование ДНК в клиническую диагностику, а также выполнить полную расшифровку генома человека. Сегодня, спустя десятилетие после завершения программы «Геном человека», мы становимся свидетелями нового витка в использовании ДНК-технологий – внедрения полногеномного секвенирования ДНК. Полногеномное секвенирование подразумевает исчерпывающую расшифровку последовательности ДНК каждого конкретного образца. Подобный метод представляется незаменимым для исследовательских целей, в частности для идентификации причин наследственных



Рис. 1. Michael R. Stratton

заболеваний [12] или для поиска новых опухоль-ассоциированных мутаций [16]. Предполагается, что через 3-5 лет полногеномное секвенирование станет экономически доступным для клинической диагностики; ожидается, что данный метод будет использоваться для индивидуального медико-генетического консультирования, а также для персонального подбора противоопухолевой терапии. В 2010 году международная группа исследователей, возглавляемая директором Института Сэнгера (Великобритания), профессором Michael R. Stratton (рис.1), опубликовала результаты первого полногеномного секвенирования опухолевой ДНК [16]. В качестве объекта исследования учёные выбрали клеточную линию меланомы. Было продемонстрировано, что опухолевая ДНК содержит тысячи микромутаций и десятки генных перестроек, среди которых встречаются как биологически значимые (функциональные) нарушения, так и нейтральные («шумовые») изменения нуклеотидной последовательности. Паттерн мутаций меланомной ДНК подтверждает причастность канцерогенного действия ультрафиолетовых лучей к патогенезу этой разновидности неоплазий. Осуществление сходных по своей методологии исследований позволило открыть новый ген метастазирования меланомы сетчатки [8], продемонстрировать частую встречаемость мутаций в киназ-кодирующих генах при раке лёгкого [15], составить каталог гомозиготных делеций в опухолях человека [1], идентифицировать новые потенциальные молекулярные мишени для противоопухолевой терапии [13].

### Разработка и клинические испытания ингибиторов RAF: первое эффективное средство для лечения меланомы

Белок RAF является серин-треониновой киназой, участвующей в передаче сигналов с трансмембранных рецепторов. Гиперактивность этого сигнального пути обеспечивает главное биологическое свойство трансформированных клеток – способность к автономному, независимому от потребностей организма делению. Зачастую активация пролиферативных каскадов связана с модификацией самого рецептора; именно поэтому фарма-

кологическая инактивация мембранных тирозинкиназ ERBB2/HER2 (трастузумаб), EGFR/HER1 (гефитиниб, эрлотиниб, цетуксимаб, панитумумаб), KIT (иматиниб) стала наиболее известным направлением таргетной терапии. В других случаях активирующее событие затрагивает молекулы, переносящие сигналы от мембраны к ядру. Наиболее известным примером подобного механизма злокачественной трансформации является мутационная активация гена KRAS. Опухоли, содержащие мутацию KRAS, демонстрируют резистентность к терапии EGFR-ингибиторами, т.к. их патогенез не зависит от состояния мембранного рецептора и определяется другим, «нижележащим» событием [22]. Ещё один пример нечувствительности к анти-EGFR терапии связан с мутационной активацией гена BRAF; протеинкиназа RAF является непосредственной мишенью белка RAS, поэтому мутации в соответствующих генах приводят к практически идентичным последствиям [4]. Мутации BRAF встречаются в нескольких разновидностях новообразований; в частности, данные повреждения обнаруживаются примерно в 40% меланом [14]. Специалисты компании «Plexxikon» разработали специфический низкомолекулярный ингибитор мутированного белка BRAF - PLX4032 (RG7204) [2]. Клинические испытания этого препарата на больных с BRAF-мутированной меланомой продемонстрировали беспрецедентные результаты: объективный ответ на лечение наблюдался у 26 из 32 (81% !!!) больных, что практически на порядок превышает ожидаемую эффективность стандартных схем терапии [7]. Интересно, что PLX4032 может оказывать противоположное действие на мутированный и нормальный RAF: в то время как данный препарат угнетает активность белка RAF с мутацией V600E, его воздействие на интактный RAF сопровождается активацией соответствующего пролиферативного каскада [9]. Не исключено, что именно с этой особенностью связан самый неожиданный побочный эффект PLX4032 – индукция плоскоклеточных карцином кожи [7].

### Специфическая химиопрофилактика рака толстой кишки

Опухоли толстой кишки отличаются последовательным накоплением специфических молекулярных повреждений на ранних этапах злокачественной трансформации, поэтому именно эта группа новообразований представляется наиболее перспективной для разработки и испытаний новых химиопрофилактических мероприятий. Патогенез карцином толстой кишки практически всегда предусматривает инактивацию гена APC, причём данное событие обычно происходит на неопасной стадии развития заболевания – в момент формирования дисплазии или полипа [5]. Группа специалистов из Техасского университета провела ряд элегантных экспериментов, установивших специфическую чувствительность APC-дефицитных «предраковых» клеток к комбинированной обработке апоптоз-индуцирующим фактором TRAIL (tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) и производным ретиноевой кислоты (all-trans-retinyl

acetate) [23]. Существенно, что нормальные клетки демонстрировали полную резистентность к подобной комбинации. Эффективность данных препаратов в лечении полипов и предотвращении развития карцином толстой кишки была подтверждена в экспериментах на лабораторных мышах.

### Первая демонстрация возможности терапевтической РНК-интерференции у человека

Одним из наиболее популярных направлений молекулярной биологии является использование так называемых малых интерферирующих РНК (small interfering RNA, siRNA) для специфического подавления активности того или иного гена. Данный подход основывается на трансфекции небольшой молекулы РНК, комплементарной матричной РНК-мишени. Взаимодействие между siRNA и мРНК нарушает трансляцию последней, а также может индуцировать распад атакуемого транскрипта. В результате происходит функциональная инактивация гена, выбранного для экспериментальной манипуляции. Колоссальное преимущество РНК-интерференции – её универсальность; предполагается что практически к каждому (нежелательному) гену можно подобрать специфический siRNA-ингибитор. Тем не менее, клиническое использование малых интерферирующих РНК ограничивается несовершенством средств доставки этих относительно больших молекул в клетки-мишени [19]. На страницах журнала Nature в 2010 г. опубликован отчёт о первом клиническом испытании siRNA как средства противоопухолевой терапии [3]. В качестве мишени был выбран ген RRM2, кодирующий M2-субъединицу рибонуклеотид-редуктазы. Для эффективной доставки специфической siRNA в опухолевые клетки использовали сложную композицию, собранную на основе наночастиц. Самым существенным результатом данного исследования является демонстрация доз-зависимого накопления наночастиц с siRNA в опухолевой ткани, сопровождавшееся ожидаемым биологическим эффектом – уменьшением содержания RRM2-специфических мРНК и белка.

### Биологические функции псевдогенов

Псевдогенами называются копии функционально активных генов, присутствующие в геноме эукариот. В отличие от «настоящих» генов, псевдогены содержат инактивирующие мутации (стоп-кодоны, сдвиги рамки считывания и т.д.), которые препятствуют их нормальной трансляции. Псевдогены всегда считались бесполезным генетическим материалом, представляющим побочные продукты эволюции геномов. Тем не менее вызывает удивление тот факт, что псевдогены проявляют значительный эволюционный консерватизм, свидетельствующий о потенциальной биологической значимости их нуклеотидных последовательностей. Более того, псевдогены характеризуются тканеспецифической экспрессией; нарушения транскрипции псевдогенов наблюдаются при многих патологических состояниях, включая опухолевые



Рис. 2. Pier Paolo Pandolfi

заболевания. Группа американских учёных, возглавляемых профессором Pier Paolo Pandolfi (рис. 2), в 2010 г. представила первые доказательства участия псевдогенов в регуляции работы генома; по-видимому, это открытие является самым сенсационным событием медико-биологической науки прошедшего года [17]. Исследователи предположили и экспериментально подтвердили, что псевдогены конкурируют с «настоящими» генами за связывание со специфическими микроРНК; последние, в свою очередь, образуют комплементарные комплексы с РНК-транскриптами и являются мощными негативными регуляторами работы генов. Таким образом, псевдогены выступают в качестве «ловушки» специфических микроРНК. Инактивация псевдогенов-супрессоров, наблюдаемая в процессе злокачественной трансформации, высвобождает соответствующие микроРНК, что, в свою очередь, приводит к инактивации истинных антионкогенов; противоположные по своей направленности процессы наблюдаются при активации псевдоонкогенов. Таким образом, как онкогены, так и супрессорные гены демонстрируют координированную регуляцию транскрипции с соответствующими псевдогенами, причём в качестве дирижёров этого процесса выступают молекулы микроРНК.

### Образование опухолевых капилляров из трансформированных клеток

Концепция опухолевого ангиогенеза является одной из самых популярных тем клинической и фундаментальной онкологии прошедшего десятилетия. Считается, что трансформированные клетки могут образовывать визуализируемую опухолевую массу только в том случае, если они секретируют факторы роста сосудов и таким образом активно способствуют образованию собственной капиллярной сети. Ангиогенез представляется идеальной мишенью для противоопухолевой терапии: в частности, эндотелиоциты, в отличие от неопластических клеток, не характеризуются геномной нестабильностью, поэтому они не могут адаптироваться к цитостатическим лекарственным воздействиям. В 2010 г. были одновременно опубликованы 2 независимые статьи, которые ставят под сомнение многие догмы экспериментальной онкологии [18, 21]. Авторы упомянутых работ изучали спектр





Рис. 3. Vincent K. Tuohy

мутаций в эндотелиоцитах, формирующих капиллярную сеть глиобластом, и продемонстрировали идентичность спектра молекулярных нарушений опухолевым клеткам. Подобное сходство можно объяснить только тем, что эндотелий глиобластом не является самостоятельной тканью, а возникает вследствие дифференцировки стволовых клеток опухоли; данная догадка согласуется с результатами анализа тканеспецифических белковых маркеров. Более того, глиобластомы у подопытных мышей, вызванные инъекцией стволовых опухолевых клеток, содержали человеческий, а не мышинный эндотелий. Следует в целом признать, что многие устоявшиеся представления о тканеспецифической детерминированности клеток-предшественников нуждаются в существенном пересмотре; в качестве дополнительного аргумента можно процитировать недавнее исследование, в котором различные кроветворные клетки были получены непосредственно из фибробластов человека [20].

## Литература

1. Bignell G.R., Greenman C.D., Davies H., Butler A.P., Edkins S., Andrews J.M., Buck G., Chen L., Beare D., Latimer C., Widawski S., Hinton J., Fabry C., Fu B., Swamy S., Dalglish G.L., Teh B.T., Deloukas P., Yang F., Campbell P.J., Futreal P.A., Stratton M.R. Signatures of mutation and selection in the cancer genome // *Nature*. – 2010. – Vol.463. – P.893-898.
2. Bollag G., Hirth P., Tsai J., Zhang J., Ibrahim P.N., Cho H., Spevak W., Zhang C., Zhang Y., Habets G., Burton E.A., Wong B., Tsang G., West B.L., Powell B., Shelloo R., Marimuthu A., Nguyen H., Zhang K.Y., Artis D.R., Schlessinger J., Su F., Higgins B., Iyer R., D'Andrea K., Koehler A., Stumm M., Lin P.S., Lee R.J., Grippo J., Puzanov I., Kim K.B., Ribas A., McArthur G.A., Sosman J.A., Chapman P.B., Flaberty K.T., Xu X., Nathanson K.L., Nolop K. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma // *Nature*. – 2010. – Vol.467. – P.596-599.
3. Davis M.E., Zuckerman J.E., Choi C.H., Seligson D., Tolcher A., Alabi C.A., Yen Y., Heidel J.D., Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles // *Nature*. – 2010. – Vol.464. – P.1067-1070.
4. Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., Sartore-Bianchi A., Arena S., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol.26. – P.5705-5712.
5. Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis // *Cell*. – 1990. – Vol.61. – P.759-767.
6. Fearon K.C. Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem // *Europ. J. Cancer*. – 2008. – Vol.44. – P.1124-1132.
7. Flaberty K.T., Puzanov I., Kim K.B., Ribas A., McArthur G.A., Sosman J.A., O'Dwyer P.J., Lee R.J., Grippo J.F., Nolop K., Chapman P.B. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol.363. – P.809-819.

## Тканеспецифическая вакцина для рака молочной железы

Поиск эффективных мишеней для противоопухолевой терапии осложняется тем фактом, что для злокачественной трансформации вовсе не обязательно появление качественных различий в структуре тех или иных белков; напротив, возникновение неопластического фенотипа может быть связано с нарушением количественного баланса между активностью онкогенов и антионкогенов, что значительно сужает возможности для терапевтических вмешательств. Альтернативным подходом к уничтожению опухолевых клеток могут являться тканеспецифические воздействия. Например, ткань молочной железы не является необходимой для поддержания жизнедеятельности женщин, поэтому создание препаратов, препятствующих делению клеток маммарного эпителия (как неопластических, так и нормальных) может оказаться перспективным подходом для профилактики и лечения карцином этого органа [10]. Американские специалисты из Кливленда, возглавляемые профессором Vincent K. Tuohy (рис. 3), предложили использовать в качестве белка-мишени альфа-лактальбумин, продуцируемый здоровой молочной железой только во время лактации и присутствующий в трансформированных эпителиоцитах. Вакцина, созданная на основе этого белка, продемонстрировала уникальную эффективность в опытах на мышах как в отношении супрессии уже возникших опухолей, так и для профилактики карцином молочной железы. Примечательно, что применение подобной вакцины не сопровождалось какими-либо побочными эффектами в отношении нелактующих животных [11].

Данная работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 02.740.11.0780) и Правительства Москвы (№ 15/11-Ген-М).

8. Harbour J.W., Onken M.D., Roberson E.D., Duan S., Cao L., Worley L.A., Council M.L., Matatall K.A., Helms C., Bowcock A.M. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas // *Science*. – 2010. – Vol.330. – P.1410-1413.
9. Hatzivassiliou G., Song K., Yen I., Brandhuber B.J., Anderson D.J., Alvarado R., Ludlam M.J., Stokoe D., Gloor S.L., Vigers G., Morales T., Aliagas I., Liu B., Sideris S., Hoeflich K.P., Jaiswal B.S., Seshagiri S., Koeppe H., Belvin M., Friedman L.S., Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth // *Nature*. – 2010. – Vol.464. – P.431-435.
10. Imyanitov E.N., Hanson K.P. Mechanisms of breast cancer // *Drug Discov Today Dis Mech*. – 2004. – Vol.1. – P.235-245.
11. Jaini R., Kesaraju P., Johnson J.M., Altuntas C.Z., Jane-Wit D., Tuohy V.K. An autoimmune-mediated strategy for prophylactic breast cancer vaccination // *Nat. Med*. – 2010. – Vol.16. – P.799-803.
12. Jones S., Hruban R.H., Kamiyama M., Borges M., Zhang X., Parsons D.W., Lin J.C., Palmisano E., Brune K., Jaffee E.M., Jacobuzio-Donabue C.A., Maitra A., Parmigiani G., Kern S.E., Velculescu V.E., Kinzler K.W., Vogelstein B., Esbleman J.R., Goggins M., Klein A.P. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene // *Science*. – 2009. – Vol.324. – P.217.
13. Kan Z., Jaiswal B.S., Stinson J., Janakiraman V., Bhatt D., Stern H.M., Yue P., Haverty P.M., Bourgon R., Zheng J., Moorhead M., Chaudhuri S., Tomsbo L.P., Peters B.A., Pujara K., Cordes S., Davis D.P., Carlton V.E., Yuan W., Li L., Wang W., Eigenbrot C., Kaminker J.S., Eberhard D.A., Waring P., Schuster S.C., Modrusan Z., Zhang Z., Stokoe D., de Sauvage F.J., Fabam M., Seshagiri S. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers // *Nature*. – 2010. – Vol.466. – P.869-873.
14. Lee J.H., Choi J.W., Kim Y.S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histologic types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis // *Brit. J. Dermatol*. – 2010 (in press).
15. Lee W., Jiang Z., Liu J., Haverty P.M., Guan Y., Stinson J., Yue P., Zhang Y., Pant K.P., Bhatt D., Ha C., Johnson S., Kennemer M.J., Mohan S., Nazarenko I., Watanabe C., Sparks A.B., Shames D.S., Gentleman R., de Sauvage F.J., Stern H., Pandita A., Ballinger D.G., Drmanac R., Modrusan Z., Seshagiri S., Zhang Z. The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient // *Nature*. – 2010. – Vol.465. – P.473-477.
16. Pleasance E.D., Cheetham R.K., Stephens P.J., McBride D.J., Humpbray S.J., Greenman C.D., Varela I., Lin M.L., Ordycze G.R., Bignell G.R., Ye K., Alipaz J., Bauer M.J., Beare D., Butler A., Carter R.J., Chen L., Cox A.J., Edkins S., Kokko-Gonzales P.I., Gormley N.A., Grocock R.J., Haudenschild C.D., Hims M.M., James T., Jia M., Kingsbury Z., Leroy C., Marshall J., Menzies A., Mudie L.J., Ning Z., Royce T., Schulz-Trieglaff O.B., Spiridou A., Stebbings L.A., Szajkowski L., Teague J., Williamson D., Chin L., Ross M.T., Campbell P.J., Bentley D.R., Futreal P.A., Stratton M.R. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome // *Nature*. – 2010. – Vol.463. – P.191-196.
17. Poliseno L., Salmena L., Zhang J., Carver B., Haveman W.J., Pandolfi P.P. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology // *Nature*. – 2010. – Vol.465. – P.1033-1038.
18. Ricci-Vitiani L., Pallini R., Biffoni M., Todaro M., Invernici G., Cenci T., Maira G., Parati E.A., Stassi G., Larocca L.M., De Maria R. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells // *Nature*. – 2010. – Vol.468. – P.824-828.
19. Shim M.S., Kwon Y.J. Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo // *FEBS J*. – 2010. – Vol.277. – P.4814-4827.
20. Szabo E., Rampalli S., Risueco R.M., Schmerch A., Mitchell R., Fiebig-Comyn A., Levadoux-Martin M., Bhatia M. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors // *Nature*. – 2010. – Vol.468. – P.521-526.
21. Wang R., Chadalavada K., Wilsbire J., Kowalik U., Hovinga K.E., Geber A., Fligelman B., Leversha M., Brennan C., Tabar V. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. – *Nature*. – 2010. – Vol.468. – P.829-833.
22. Wheeler D.L., Dunn E.F., Harari P.M. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. // *Nat. Rev. Clin. Oncol*. – 2010. – Vol.7. – P.493-507.
23. Zhang L., Ren X., Alt E., Bai X., Huang S., Xu Z., Lynch P.M., Moyer M.P., Wen X.F., Wu X. Chemoprevention of colorectal cancer by targeting APC-deficient cells for apoptosis // *Nature*. – 2010. – Vol.464. – P.1058-1061.
24. Zhou X., Wang J.L., Lu J., Song Y., Kwak K.S., Jiao Q., Rosenfeld R., Chen Q., Boone T., Simonet W.S., Lacey D.L., Goldberg A.L., Han H.Q. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival // *Cell*. – 2010. – Vol.142. – P.531-543.