



Особенности экспрессионного профиля больных злокачественной меланомой в зависимости от ответа на иммунотерапию

Е.Н. Лукьянова¹, М.С. Федорова¹, Е.А. Пудова¹, Т.В. Наседкина^{1, 2}, Е.В. Степанова², К.М. Ньюшко³, А.Ю. Попов⁴, Н.В. Коробан³, А.А. Дмитриев¹, М.В. Киселева³, А.В. Липатова¹, А.С. Заседателев^{1, 2}, А.В. Кудрявцева^{1, 3}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Одним из важнейших направлений современной молекулярной генетики и биомедицины является поиск предиктивных маркеров, помогающих выбрать наиболее эффективный способ лечения и препарат, а также индивидуально подобрать его дозировку. Особенно перспективными считаются те маркеры, которые могут обеспечить возможность применения неинвазивной, так называемой жидкостной биопсии. Этот метод позволяет оценить состояние опухоли по анализу естественных жидкостей организма, таких как кровь, моча или слюна. Подобные исследования наиболее удобны в случаях, когда необходимо проводить мониторинг эффективности терапии, чтобы вовремя зафиксировать момент возникновения резистентности опухолевых клеток, начало рецидива и перейти на следующую линию терапии. При лечении агрессивных и быстро метастазирующих злокачественных новообразований, таких как меланома, наличие достоверных маркеров, позволяющих быстро и точно определить тактику лечения, особенно важно. В последнее время появляется все больше исследований, посвященных поиску предиктивных маркеров эффективности иммунотерапии. Меланома характеризуется высокой иммуногенностью, в связи с чем она стала модельным объектом для исследования и внедрения новых подходов иммунотерапии. В настоящей работе проведено сравнение двух групп больных метастатической меланомой кожи с различным ответом на иммунотерапию блокаторами иммунных контрольных точек с целью идентифицировать новые предиктивные экспрессионные биомаркеры среди микро- и матричных РНК, а также определить гены, ответственные за возникновение объективного ответа на терапию у пациентов. В исследовании выявлено несколько микроРНК со значительным изменением содержания в опухолевой ткани пациентов, по-разному отвечающих на иммунотерапию. Обнаружены также различия на уровне экспрессии их генов-мишеней, которые позволят более детально проанализировать молекулярные механизмы, определяющие чувствительность или резистентность клеток злокачественной меланомы к действию иммунотерапии. На основе полученных результатов предложены экспрессионные маркеры (мРНК и микроРНК), которые после дальнейшей апробации могут быть использованы как предикторы ответа опухолей злокачественной меланомы к иммунотерапии.

Ключевые слова: меланома; иммунотерапия; предиктивные маркеры; профилирование микроРНК; высокопроизводительное секвенирование; транскриптомный анализ; регуляция экспрессии генов.

Differences in expression profiles in malignant melanoma patients according to immunotherapy response

E.N. Lukyanova¹, M.S. Fedorova¹, E.A. Pudova¹, T.V. Nasedkina^{1, 2}, E.V. Stepanova², K.M. Nyushko³, A.Y. Popov⁴, N.V. Koroban³, A.A. Dmitriev¹, M.V. Kiseleva³, A.V. Lipatova¹, A.S. Zasedatelev^{1, 2}, A.V. Kudryavtseva^{1, 3}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia

² Blokhin National Cancer Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ Pletnev State Hospital, Department of Health of the Moscow, Moscow, Russia

One of the most important branch of modern molecular genetics and biomedicine is the search for predictive markers that help choose the most effective way of treatment, drug and also determine its individual dosage. Among the markers, those that can provide the possibility of using a non-invasive, so-called "liquid biopsy" are considered particularly promising. This method allows the condition of the tumor to be assessed by analyzing the body's natural fluids, such as blood, urine or saliva. Such studies are most convenient in those cases when it is necessary to monitor the effectiveness of therapy in order to record the time of the onset of resistance of tumor cells, the onset of relapse and to move on to the next line of therapy. In the treatment of aggressive and rapidly became metastatic malignant tumors, such as melanoma, the presence of reliable markers that allow quick and accurate determination of treatment tactics is especially important. Nowadays, there is an increasing number of studies devoted to the search for predictive markers of the effectiveness of immunotherapy. Melanoma is one of the most immunogenic tumors and, as a result, has become a model object for research into and introduction of new approaches to immunotherapy. In this study, we compared two groups of patients with metastatic skin melanoma, with different responses to immunotherapy with blockers of immune control points, to identify new predictive expression biomarkers among microRNAs and mRNAs, and to identify the

Received 13.09.2017

Accepted for publication 08.11.2017

© AUTHORS, 2017

E.N. Lukyanova and M.S. Fedorova equal contribution to manuscript preparation.

e-mail: rhizamoeba@mail.ru

genes responsible for the occurrence of an objective response to therapy. As a result, the study detected several microRNAs with a significant change in expression level within the tumor tissue of patients responding differently to immunotherapy. Differences in the level of expression of their target genes have also been found, that will allow a more detailed analysis of the molecular mechanisms that determine the sensitivity or resistance of malignant melanoma cells to the immunotherapy. Based on the obtained data, we have proposed expression markers (mRNAs and microRNAs) that can be used as predictors of malignant melanoma tumors to immunotherapy.

Key words: melanoma; immunotherapy; predictive biomarkers; NGS; miRNA profiling; transcriptomic analysis; regulation of gene expression.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лукьянова Е.Н., Федорова М.С., Пудова Е.А., Наседкина Т.В., Степанова Е.В., Ньюшко К.М., Попов А.Ю., Коробан Н.В., Дмитриев А.А., Киселева М.В., Липатова А.В., Заседателев А.С., Кудрявцева А.В. Особенности экспрессионного профиля больных злокачественной меланомой в зависимости от ответа на иммунотерапию. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(8):925-931. DOI 10.18699/VJ17.314

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lukyaynova E.N., Fedorova M.S., Pudova E.A., Nasedkina T.V., Stepanova E.V., Nyushko K.M., Popov A.Y., Koroban N.V., Dmitriev A.A., Kiseleva M.V., Lipatova A.V., Zasedatelev A.S., Kudryavtseva A.V. Differences in expression profiles in malignant melanoma patients according to immunotherapy response. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017; 21(8):925-931. DOI 10.18699/VJ17.314 (in Russian)

Несмотря на значительные достижения в области расшифровки механизмов канцерогенеза, разработки методов диагностики и новых лекарственных средств, заболеваемость злокачественными новообразованиями и смертность в России и во всем мире неуклонно растут (Петрова и др., 2014).

Стремительное течение онкологических заболеваний, а также высокая токсичность лекарственной и лучевой терапии обуславливают необходимость первоначально правильного определения тактики лечения. Поэтому одним из важнейших направлений современной молекулярной генетики и биомедицины является поиск предиктивных маркеров, помогающих выбрать наиболее эффективный способ лечения и препарат, а также индивидуально подобрать дозу (Szczerpaniak Sloane et al., 2017). Предиктивными маркерами могут быть однонуклеотидные замены и небольшие инсерции и делеции (Martin-Liberal, Larkin, 2015; Krawczyk et al., 2017), амплификации (Bouchalova et al., 2009), хромосомные перестройки (Sokolenko, Imyaninov, 2017), слитые транскрипты (Rix et al., 2013), а также экспрессия генов (на уровне мРНК и белка) и некодирующих РНК (Shindo et al., 2017). Среди маркеров особенно перспективными считаются те, которые могут обеспечить возможность применения так называемой жидкостной биопсии. Этот метод позволяет оценить состояние опухоли не по фрагменту ткани биоптата, а по анализу естественных жидкостей организма (кровь, моча, слюна). Такие исследования особенно удобны и важны, когда необходимо проводить мониторинг эффективности терапии, чтобы вовремя зафиксировать момент возникновения резистентности опухолевых клеток, начало рецидива и перейти на следующую линию терапии. Особого внимания заслуживают микроРНК, так как в крови они главным образом находятся в составе экзосом или связаны с белковыми комплексами и поэтому более стабильны (Huang, Hoop, 2016).

Необходимое условие развития новых способов лечения онкологических заболеваний – детальное понимание

молекулярных механизмов, лежащих в основе ответа злокачественных клеток на препараты. Это позволяет правильно выбирать целевую группу пациентов, контролировать лечение и корректировать тактику терапии на основе понимания механизмов возникновения резистентности (Milik et al., 2017).

Подобные данные приобретают особую значимость при терапии агрессивных и быстро метастазирующих злокачественных новообразований, таких как меланома. Удовлетворительные результаты лечения меланомы, как правило, могут быть получены только в случае диагностики заболевания на самых ранних стадиях и при своевременном хирургическом вмешательстве (Leong et al., 2012). Меланома – одна из наиболее иммуногенных опухолей, в связи с чем она стала модельным объектом для исследования и внедрения новых подходов иммунотерапии. Высокая чувствительность к онкоиммунопрепаратам во многом объясняется высокой мутационной нагрузкой при меланоме, обуславливающей продукцию большого числа неоантигенов, что, в свою очередь, усиливает иммунный ответ (Alexandrov et al., 2013).

В настоящее время наиболее эффективный способ иммунотерапии – ингибирование так называемых иммунных контрольных точек для последующей активации Т-клеточного ответа и опосредованной им смерти опухолевых клеток. К основным мишеням блокады контрольных точек относятся CTLA4 и PD-1, два ключевых рецептора иммунной толерантности.

До сих пор нет общепринятого подхода к отбору пациентов, для которых будет эффективна терапия ингибиторами иммунных контрольных точек, и к оптимальному комбинированию различных взаимодополняющих подходов к иммунотерапии друг с другом и с традиционными методами лечения рака (Hodi et al., 2010; Roh et al., 2017). Основным методом оценки эффективности иммунотерапии считается иммуногистохимическое окрашивание, например антителами к PD-1. Однако предиктивная точ-

ность остается относительно низкой, более того, существуют значительные сложности с унификацией интерпретации данных.

Появляется все больше исследований, посвященных поиску предиктивных маркеров эффективности иммунотерапии. Показано, что наличие анеуплоидии в опухоли коррелирует с маркерами иммунного «ускользания» и с пониженным ответом на иммунотерапию (Davoli et al., 2017). Повышенная мутационная нагрузка (МН) может свидетельствовать о чувствительности, в то время как накопление делеций генов – о резистентности к препаратам-блокаторам иммунных контрольных точек (Roh et al., 2017). В настоящее время высокая МН – наиболее точный генетический маркер. При меланоме этот показатель в целом выше, чем при других злокачественных новообразованиях (Alexandrov et al., 2013). Однако тестирование МН имеет существенный недостаток – высокую стоимость исследования, что, несомненно, ограничивает возможности применения этого подхода в рутинной лабораторной диагностике.

Высокая МН, как правило, связана с нарушением функционирования системы репарации. При меланоме она вызвана действием ультрафиолетового излучения и сопровождается специфической «мутационной подписью» (Alexandrov et al., 2013). На опухолях толстой кишки показано, что пациенты с мутациями в генах системы репарации неспаренных оснований, таких как *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* и других, характеризуются повышенной МН и наиболее чувствительны к иммунотерапии. Выявлены также эпигенетические предикторы. Амплификации и активирующие соматические мутации в гене *EZH2* коррелируют с уровнем метилирования ДНК, обеспечивая эпигенетическую инактивацию ряда генов, вовлеченных в опухолевую супрессию, и иммунный ответ при меланоме (Tiffen et al., 2016).

В работе проведено сравнение двух групп больных метастатической меланомой кожи с различным ответом

на иммунотерапию блокаторами контрольных точек, для того чтобы идентифицировать новые предиктивные экспрессионные биомаркеры, а также выявить гены, ответственные за возникновение объективного ответа на терапию у пациентов. В дальнейшем это позволит разработать способы оптимального выбора терапии в рамках персонализированного подхода к лечению, а также модулировать иммунный ответ в целях улучшения результатов лечения ингибиторами контрольных точек.

Материалы и методы

В исследовании использованы результаты высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina, депонированные в базу данных проекта «The Cancer Genome Atlas» (TCGA-project). Общая выборка больных метастатической меланомой кожи составила 13 пациентов, получавших после хирургического лечения препараты ипилимумаб или ниволумаб. В аннотации образцов присутствовали сведения об эффективности терапии: частичный ответ (PR), полный ответ (CR) и прогрессия заболевания (PD). Выборка была разделена на две группы: 1) пациенты, имевшие частичный или полный ответ на терапию (при частичном уменьшении размеров опухоли или ее полном видимом исчезновении); 2) пациенты, у которых наблюдалась быстрая прогрессия заболевания. Эффективность ответа на терапию оценивалась в соответствии с критериями RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), при этом учитывалась возможность временного увеличения объема опухоли вследствие повышения содержания клеток иммунной системы. Основные характеристики пациентов, включенных в исследуемую выборку, представлены в табл. 1.

Анализ дифференциальной экспрессии микроРНК и мРНК проведен в статистической среде R с использованием пакета DESeq2. Получены списки дифференциально экспрессируемых микроРНК и мРНК, удовлетворяющих следующим условиям: 1) уровень достоверности

Table 1. Clinicopathological characterization of samples

Patient	Response to treatment	Sex	Age	Treatment	Clinical stage	Response
TCGA-DA-A3F2	PR	M	55	aCTLA4	IIIb	+
TCGA-EE-A2G5	PD	W	28	aCTLA4	Ib	-
TCGA-EE-A3JI	PD	M	48	aCTLA4	I	-
TCGA-FR-A3YN	CR	M	44	aCTLA4	Ib	+
TCGA-GF-A3OT	PD	W	58	aCTLA4	IIIc	-
TCGA-GN-A4U4	PR	M	73	aCTLA4	IIa	+
TCGA-GN-A4U9	PR	M	71	aCTLA4	IIIc	+
TCGA-GN-A8LK	PD	M	70	aCTLA4	Ib	-
TCGA-GN-A8LN	PR	M	68	aCTLA4	IIc	+
TCGA-QB-AA90	PD	M	73	aCTLA4	IIIc	-
TCGA-WE-A8K5	PD	M	65	aCTLA4	Iv	-
TCGA-WE-A8ZN	PD	M	57	aPD1	IIb	-
TCGA-WE-AAA0	PD	M	47	aCTLA4	Ia	-

(р-значение) с коррекцией средней доли ложных отклонений (FDR-corrected p-value) менее 0.05; 2) параметр порога дифференциальной экспрессии ($\log_2\text{FoldChange}$) по модулю более 1.0.

Далее для каждой микроРНК из полученного списка идентифицировали мРНК-мишени. С этой целью проведен анализ баз данных: miRDB (<http://mirdb.org/download.html>) и microRNA.org (<http://www.microRNA.org/microRNA/getDownloads.do>). Полученный список мРНК-потенциальных мишеней сопоставили со списком дифференциально экспрессируемых мРНК в сравниваемых группах больных. Были выбраны только те мРНК, которые присутствовали в обоих списках и изменение экспрессии которых имело разнонаправленный характер по отношению к соответствующей микроРНК. Использованный подход позволил выбрать для дальнейшего анализа среди всех предсказанных мРНК-мишеней наиболее достоверно связанные с молекулярными механизмами, ответственными за чувствительность или резистентность клеток меланомы к иммунотерапии. Следует отметить, что при небольшом размере выборки необходимо рассматривать только изменения, демонстрирующие высочайшие значения достоверности. Проанализированы функции выявленных генов для оценки их роли в механизмах, обеспечивающих чувствительность или устойчивость к иммунотерапии.

Результаты

Проведен биоинформатический анализ, направленный на поиск в образцах злокачественной меланомы дифференциально экспрессируемых микроРНК и их генов-мишеней, которые отличают пациентов, демонстрирующих объективный лечебный эффект иммунотерапии, от пациентов без значимого ответа. Идентифицирован ряд микроРНК, удовлетворяющих условиям отбора, и выявлены потенциальные мРНК-мишени (табл. 2).

Биоинформатический поиск генов-мишеней, регулируемых выявленными нами маркерными микроРНК, проведенный с использованием двух разных баз данных, miRDB и microRNA.org, позволил идентифицировать девять генов (табл. 3).

Перечисленные в табл. 3 гены вовлечены в различные клеточные процессы. Функции некоторых из этих генов до сих пор детально не известны.

Ген *GPR22* (G белок-сцепленный рецептор 22) расположен на длинном плече хромосомы 7 в регионе 22.3 (7q22.3), его белковый продукт принадлежит к семейству рецепторов 1 и связан с G-белком-рецептором; функции *GPR22* не известны (O'Dowd et al., 1997).

Фосфолипаза C, кодируемая геном *PLCXD3*, локализованным на коротком плече хромосомы 5 в области 13.1 (5p13.1), относится к суперсемейству фосфоинозитидспецифических фосфолипаз C, регулируемых рецептором фосфодиэстеразы. Фосфолипазы C принимают участие в регуляции уровня цитозольного кальция и активности протеинкиназы (Gellatly et al., 2012). Детально функции гена *PLCXD3* не изучены, однако кодируемый им фермент, предположительно, влияет на активность многих белков клетки (Katan, 2005).

Ген *MYT1L* (миеиновый транскрипционный фактор 1) расположен на коротком плече хромосомы 2 в области 25.3

(2p25.3), кодирует белок, содержащий мотив цинкового пальца. Этот белок функционирует в развивающейся центральной нервной системе млекопитающих. В экспериментальных условиях экспрессия *MYT1L* в сочетании с основным факторами транскрипции типа спираль-петля-спираль может преобразовывать человеческие фибробласты в индуцированные нейроны, которые способны генерировать потенциалы действия (Pang et al., 2011; Yoo et al., 2011). Данные о вовлеченности *MYT1L* в иммунные реакции или в процесс канцерогенеза в литературе отсутствуют.

Белок A4 семейства переносчиков растворенных веществ 24 кодируется геном *SLC24A4*, локализованным на длинном плече хромосомы 14 в регионе 32 (14q32). Он принадлежит к семейству переносчиков растворенных веществ. В частности, *SLC24A4* связан с транспортом глюкозы и других сахаров, органических кислот, ионов металлов и аминов. Показано, что три полиморфизма в гене *SLC24A4*, а именно: rs28777, rs35391 и rs16891982, ассоциированы с повышенным риском развития злокачественной меланомы (Duffy et al., 2010).

В области импринтированных генов на коротком плече хромосомы 11 в регионе 15.4 (11p15.4) располагается ген *PHLDA2* (*TSSC3*). Этот регион содержит кластер генов-супрессоров опухолевого роста, изменения в котором могут быть связаны со многими видами рака, такими как карцинома надпочечника, рак легких, яичников и молочной железы (Schwienbacher et al., 1998; Müller et al., 2000).

Ген *LIN28A* локализуется на коротком плече хромосомы 1 (1p36.11), кодирует субъединицу РНК-связывающего белка LIN28A/LIN28B, регулирующего, в частности, биогенез микроРНК семейства let-7, образующих регуляторную петлю. При злокачественных новообразованиях часто наблюдается повышенная экспрессия *LIN28A*, что может быть ассоциировано с дополнительной активацией онкогенов *RAS*, *MYC* и *HMGA2*, а также с изменениями в клеточном метаболизме, пролиферацией, ангиогенезом, процессами программируемой клеточной гибели, геномной нестабильностью, воспалением в зоне опухоли, метастазированием. В совокупности эти изменения приводят к иммортализации злокачественных клеток и «ускользанию» от иммунной системы. Показано также, что повышенная экспрессия *LIN28A* коррелирует с неблагоприятным прогнозом при ряде онкологических заболеваний (Wang et al., 2015).

Меланосомальный трансмембранный белок, кодируемый геном *OCA2*, располагающимся на длинном плече хромосомы 15 (15q12-q13.1), является высоко полиморфным и функционально связан с процессами пигментации. Ряд полиморфных вариантов гена *OCA2* у человека играет роль в определении нормальных фенотипических вариаций цвета глаза, а некоторые из них ассоциированы с риском возникновения меланомы (Hawkes et al., 2013). Показано, что сниженная экспрессия гена *OCA2* коррелирует с прогрессией меланомы (Ryu et al., 2007).

Идентифицированные в данной работе гены *BANK1* и *RYR2* вовлечены в процессы внутриклеточной передачи кальция. Поддержание баланса Ca^{2+} внутриклеточного свободного кальция (Ca^{2+}), в том числе работа кальциевых каналов, играет большую роль в реализации многих жизненно важных функций клетки и необходимо для проли-

Table 2. miRNAs differentially expressing in skin melanoma tissues and their target genes

miRNAs	log2FoldChange	FDR-corrected p-value	Target genes
miR-187	-7.504300342	1.26E-06	<i>RYR2</i>
miR-214	3.185228481	0.005	<i>SLC24A4, PHLDA2</i>
miR-221	-1.571716577	0.019	<i>PLCXD3, MYT1L, LIN28A</i>
miR-30E	1.219245476	0.015	<i>OCA2</i>
miR-3662	-2.588305151	0.036	<i>MYT1L, LIN28A, PLCXD3, BANK1</i>
miR-373	4.550029362	0.014	<i>SLC24A4</i>
miR-539	-3.186501375	0.009	<i>MYT1L, RYR2, GPR22, PLCXD3, BANK1</i>

ферации и миграции. Нарушение этих процессов связано с рядом заболеваний, в первую очередь онкологических.

Ген *BANK1* (В-клеточный каркасный белок с анкириновыми повторностями 1) локализован на длинном плече хромосомы 4 (4q24). Кодируемый им белковый продукт функционирует в качестве важной адаптерной молекулы, связывается с В-клеточным рецептором, после чего в В-клетках образуются внутриклеточные вторичные мессенджеры, что приводит к мобилизации кальция из внутриклеточных хранилищ (Aiba et al., 2006). Установлена ассоциация гена *BANK1* с патогенезом аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка (Kozurev et al., 2008) и аутоиммунный тиреоидит (Muhali et al., 2013).

Кодирующий рецептор риадолина 2 ген *RYR2* локализуется на длинном плече хромосомы 1 в области 43 (1q43). Белковый продукт данного гена – один из компонентов кальциевого канала (Benkusky et al., 2004).

Обсуждение

Наиболее эффективным способом поиска предикторов ответа на лекарственную терапию считается сопоставление групп пациентов, различающихся по эффективности лечения. Даже в случае применения таргетных препаратов с заведомо известной молекулярной мишенью могут быть выявлены дополнительные предикторы ответа. Например, при разработке препарата кризотиниб, ингибитора *MET*, оказалось, что предиктором ответа на таргетную терапию аденокарциномы легкого является наличие транслокации гена *ALK*.

При сравнении двух групп больных злокачественной меланомой, различающихся по чувствительности к иммунотерапии, нами определены дифференциально экспрессируемые микроРНК, а дальнейший анализ позволил идентифицировать их гены-мишени, также характеризующиеся дифференциальной экспрессией: *GPR22, PLCXD3, MYT1L, BANK1, SLC24A4, PHLDA2, LIN28A, OCA2* и *RYR2*.

По литературным данным, идентифицированная нами группа генов (*GPR22, PLCXD3* и *MYT1L*) изучена крайне слабо. Для некоторых из перечисленных генов отсутствуют сведения о функциях белкового продукта или уровне экспрессии при различных патологических состояниях. Ограниченная информация может объясняться, например, крайней тканеспецифичностью экспрессии гена либо тем, что он экспрессируется на очень коротком эта-

Table 3. Change of the expression of genes regulated by miRNAs under study in the group of patients responding to immune therapy

Target gene	Log2FoldChange	FDR-corrected p-value
<i>OCA2</i>	-6.088176199	2.81E-05
<i>SLC24A4</i>	-4.443078093	3.11E-05
<i>PHLDA2</i>	-3.337098901	1.61E-07
<i>BANK1</i>	2.673397565	8.97E-06
<i>RYR2</i>	4.229018476	6.99E-05
<i>GPR22</i>	5.11669104	7.35E-06
<i>PLCXD3</i>	6.487593377	1.39E-05
<i>LIN28A</i>	8.508599155	4.77E-07
<i>MYT1L</i>	9.447990872	2.71E-09

пе онтогенеза и на низком уровне. Возможно также, что ген произошел в результате дупликации, у него есть ряд родственных генов, справляющихся с необходимыми организму и исходно возложенными на него функциями. Это позволяет гену постепенно дивергировать и приобрести дополнительные свойства, обеспечивающие связь с иммунной системой и опосредующие степень ответа клетки на иммунотерапию.

Идентифицированные в результате биоинформатического анализа гены *SLC24A4, PHLDA2, LIN28A* и *OCA2* продемонстрировали вовлеченность в процессы онкогенеза, но для многих из них нет достаточного количества литературных данных для проведения полноценного анализа. Тем не менее даже по имеющейся информации видна функциональная связь идентифицированных генов с канцерогенезом при меланоме. Например, ген *LIN28A* участвует и в онкогенезе, и в процессах иммунного ответа, в то время как определенные наследственные варианты гена *OCA2* связаны с повышенным риском возникновения меланомы. В работе, посвященной иммунотерапии онкологических заболеваний (Yang et al., 2013), проведено сравнение различных комбинаций цитокинов с целью получения генно-инженерных CD8+Т-клеток. Исследователи попытались создать менее дифференцированные противоопухолевые CD8+Т-клетки *ex vivo*, закладывая основу для дальнейшего развития онкоиммунотерапии.

Обнаружено, что под воздействием смеси цитокинов активировалась экспрессия гена *LIN28A*.

Изменения в экспрессии белков, участвующих в процессе продвижения кальция через плазматическую мембрану и клеточные органеллы, идентифицированы при различных злокачественных новообразованиях (Monteith et al., 2012). В некоторых случаях кальциевые каналы рассматриваются в качестве потенциальных терапевтических мишеней для определенных нозологических форм, а уровень их экспрессии часто коррелирует с прогнозом заболевания. Накопленные данные свидетельствуют о том, что кальциевая сигнализация играет важную роль во многих клеточных процессах, в том числе злокачественной трансформации и поддержании иммунитета (Hanahan, Weinberg, 2011). Полученные нами результаты демонстрируют значительные различия в уровнях экспрессии генов *BANK1* и *RYR2*, в зависимости от степени ответа больных меланомой на иммунотерапию. Этот факт открывает возможность их использования в качестве предиктивных маркеров, а также подтверждает роль кальциевого баланса при нормальных и патологических состояниях организма.

Установлены различия на уровне экспрессии генов, которые позволят более детально проанализировать молекулярные механизмы, определяющие чувствительность или резистентность клеток злокачественной меланомы к действию иммунотерапии. Предложены экспрессионные маркеры на основе мРНК и микроРНК, которые после дальнейшей апробации могут быть использованы как предикторы ответа опухолей злокачественной меланомы на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек.

Среди маркеров мРНК выделено пять генов, экспрессия которых увеличивается более чем в четыре раза. Применение в качестве маркера повышения уровня экспрессии (а не понижения) традиционно считается более удобным в лабораторной практике. Это позволяет использовать для анализа меньшее количество исходного материала и точнее интерпретировать полученные результаты тестов.

Выявление нескольких микроРНК со значительным изменением содержания в опухолевой ткани пациентов, по-разному отвечающих на иммунотерапию, позволяет надеяться в будущем на возможность перехода на неинвазивную диагностику.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 14-35-00107.

The authors are grateful to the staff of the Genome Shared Access Center, Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php) and Initium Pharm Company for granting access to computational facilities.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Aiba Y., Yamazaki T., Okada T., Gotoh K., Sanjo H., Ogata M., Kurosaki T. BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses. *Immunity*. 2006;24(3):259-268. DOI 10.1016/j.immuni.2006.01.002.

Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., Borg A., Børresen-Dale A.L., Boyault S., Burkhardt B., Butler A.P., Caldas C., Davies H.R., Desmedt C., Eils R., Eyfjörd J.E., Foekens J.A., Greaves M., Hosoda F., Hutter B., Ilcic T., Imbeaud S., Imielinski M., Jäger N., Jones D.T., Jones D., Knappskog S., Kool M., Lakhani S.R., López-Otin C., Martin S., Munshi N.C., Nakamura H., Northcott P.A., Pajic M., Paemmanuil E., Paradiso A., Pearson J.V., Puente X.S., Raine K., Ramakrishna M., Richardson A.L., Richter J., Rosenstiel P., Schlessner M., Schumacher T.N., Span P.N., Teague J.W., Totoki Y., Tutt A.N., Valdés-Mas R., van Buuren M.M., van 't Veer L., Vincent-Salomon A., Waddell N., Yates L.R. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative; ICGC Breast Cancer Consortium; ICGC MMML-Seq Consortium; ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J., Futreal P.A., McDermott U., Lichten P., Meyerson M., Grimmond S.M., Siebert R., Campo E., Shibata T., Pfister S.M., Campbell P.J., Stratton M.R. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;22;500(7463):415-421. DOI 10.1038/nature12477.

Benkusky N.A., Farrell E.F., Valdivia H.H. Ryanodine receptor channelopathies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;322(4):1280-1285. DOI 10.1016/j.bbrc.2004.08.033.

Bouchalova K., Cizkova M., Cwiertka K., Trojanec R., Hajdich M. Triple negative breast cancer – current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* 2009;153(1):13-17.

Davoli T., Uno H., Wooten E.C., Elledge S.J. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science*. 2017;355(6322). DOI 10.1126/science.aaf8399.

Duffy D.L., Zhao Z.Z., Sturm R.A., Hayward N.K., Martin N.G., Montgomery G.W. Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2010;130(2):520-528. Epub 2009; Aug 27. DOI 10.1038/jid.2009.258.

Gellatly S.A., Kalujnaia S., Cramb G. Cloning, tissue distribution and sub-cellular localisation of phospholipase C X-domain containing protein (PLCXD) isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;424(4):651-656. Epub 2012; Jun 22. DOI 10.1016/j.bbrc.2012.06.079.

Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hawkes J.E., Cassidy P.B., Manga P., Boissy R.E., Goldgar D., Cannon-Albright L., Florell S.R., Leachman S.A. Report of a novel OCA2 gene mutation and an investigation of OCA2 variants on melanoma risk in a familial melanoma pedigree. *J. Dermatol. Sci.* 2013;69(1):30-7. Epub 2012; Oct 13. DOI 10.1016/j.jdermsci.2012.09.016.

Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J.C., Akerley W., van den Eertwegh A.J., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J.M., Linette G.P., Hogg D., Ottensmeier C.H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I., Clark J.I., Wolchok J.D., Weber J.S., Tian J., Yellin M.J., Nichol G.M., Hoos A., Urba W.J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(8):711-723. Epub 2010; Jun 5. DOI 10.1056/NEJMoa1003466.

Huang S.K., Hoon D.S. Liquid biopsy utility for the surveillance of cutaneous malignant melanoma patients. *Mol. Oncol.* 2016;10(3):450-463. Epub 2015; Dec 17. DOI 10.1016/j.molonc.2015.12.008.

Katan M. New insights into the families of PLC enzymes: looking back and going forward. *Biochem. J.* 2005;391(3):e7-9. DOI 10.1042/BJ20051506.

Kozyrev S.V., Abelson A.K., Wojcik J., Zaghlool A., Linga Reddy M.V., Sanchez E., Gunnarsson I., Svenungsson E., Sturfelt G., Jönsen A., Truedsson L., Pons-Estel B.A., Witte T., D'Alfonso S., Barizzone N., Danieli M.G., Gutierrez C., Suarez A., Junker P., Lastrup H., González-Escribano M.F., Martin J., Abderrahim H., Alarcón-Riquelme M.E. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 2008;40(2):211-216. DOI 10.1038/ng.79.

- Krawczyk P., Kowalski D.M., Ramlau R., Kalinka-Warzocha E., Winiarczyk K., Stencel K., Powrózek T., Reszka K., Wojas-Krawczyk K., Bryl M., Wójcik-Superczyńska M., Głogowski M., Barinow-Wojewódzki A., Milanowski J., Krzakowski M. Comparison of the effectiveness of erlotinib, gefitinib, and afatinib for treatment of non-small cell lung cancer in patients with common and rare EGFR gene mutations. *Oncol. Lett.* 2017;(6):4433-4444. Epub 2017; Apr 3. DOI 10.3892/ol.2017.5980.
- Leong S.P., Mihm M.C. Jr., Murphy G.F., Hoon D.S., Kashani-Sabet M., Agarwala S.S., Zager J.S., Hauschild A., Sondak V.K., Guild V., Kirkwood J.M. Progression of cutaneous melanoma: implications for treatment. *Clin. Exp. Metastasis.* 2012;29(7):775-796. DOI 10.1007/s10585-012-9521-1.
- Martin-Liberal J., Larkin J. Vemurafenib for the treatment of BRAF mutant metastatic melanoma. *Future Oncol.* 2015;11(4):579-589. DOI 10.2217/fon.14.252.
- Milik S.N., Lasheen D.S., Serya R.A.T., Abouzid K.A.M. How to train your inhibitor: Design strategies to overcome resistance to Epidermal Growth Factor Receptor inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2017;142:131-151. DOI 10.1016/j.ejmech.2017.07.023.
- Monteith G.R., Davis F.M., Roberts-Thomson S.J. Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J. Biol. Chem.* 2012;287(38):31666-31673. Epub 2012; Jul 20. DOI 10.1074/jbc.R112.343061.
- Muhali F.S., Song R.H., Wang X., Shi X.H., Jiang W.J., Xiao L., Li D.F., He S.T., Xu J., Zhang J.A. Genetic variants of BANK1 gene in autoimmune thyroid diseases: a case-control association study. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2013;121(9):556-560. Epub 2013; Oct 14. DOI 10.1055/s-0033-1348220.
- Müller S., van den Boom D., Zirkel D., Köster H., Berthold F., Schwab M., Westphal M., Zunkeller W. Retention of imprinting of the human apoptosis-related gene TSSC3 in human brain tumors. *Hum. Mol. Genet.* 2000;22(9):757-763. PMID: 10749982.
- O'Dowd B.F., Nguyen T., Jung B.P., Marchese A., Cheng R., Heng H.H., Kolakowski L.F. Jr., Lynch K.R., George S.R. Cloning and chromosomal mapping of four putative novel human G-protein-coupled receptor genes. *Gene.* 1997;187(1):75-81.
- Pang Z.P., Yang N., Vierbuchen T., Ostermeier A., Fuentes D.R., Yang T.Q., Citri A., Sebastiano V., Marro S., Südhof T.C., Wernig M. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature.* 2011;26;476(7359):220-223. DOI 10.1038/nature10202.
- Petrova G.V., Kaprin A.D., Starinskij V.V., Gretsova O.P. The incidence of malignant neoplasms in the Russian population. *Onkologiya. Zhurnal imeni P.A. Gertsena = P.A. Herzen Journal of Oncology.* 2014;2(5):5-10. (in Russian)
- Rix U., Colinge J., Blatt K., Gridling M., Remsing Rix L.L., Parapatics K., Cerny-Reiterer S., Burkard T.R., Jäger U., Melo J.V., Bennett K.L., Valent P., Superti-Furga G. A target-disease network model of second-generation BCR-ABL inhibitor action in Ph+ ALL. *PLoS One.* 2013;8(10):e77155. DOI 10.1371/journal.pone.0077155.
- Roh W., Chen P.L., Reuben A., Spencer C.N., Prieto P.A., Miller J.P., Gopalakrishnan V., Wang F., Cooper Z.A., Reddy S.M., Gumbs C., Little L., Chang Q., Chen W.S., Wani K., De Mace-
do M.P., Chen E., Austin-Breneman J.L., Jiang H., Roszik J., Tetzlaff M.T., Davies M.A., Gershenwald J.E., Tawbi H., Lazar A.J., Hwu P., Hwu W.J., Diab A., Glitza I.C., Patel S.P., Woodman S.E., Amaria R.N., Prieto V.G., Hu J., Sharma P., Allison J.P., Chin L., Zhang J., Wargo J.A., Futreal P.A. Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci. Transl. Med.* 2017;9(379). DOI 10.1126/scitranslmed.aah3560. Erratum: *Sci. Transl. Med.* 2017. Apr 12;9(385).
- Ryu B., Kim D.S., Deluca A.M., Alani R.M. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLoS One.* 2007;2(7):e594. DOI 10.1371/journal.pone.0000594.
- Schwienbacher C., Sabbioni S., Campi M., Veronese A., Bernardi G., Menegatti A., Hatada I., Mukai T., Ohashi H., Barbanti-Brodano G., Croce C.M., Negrini M. Transcriptional map of 170-kb region at chromosome 11p15.5: identification and mutational analysis of the BWR1A gene reveals the presence of mutations in tumor samples. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1998;95(7):3873-3878.
- Shindo Y., Hazama S., Nakamura Y., Inoue Y., Kanekiyo S., Suzuki N., Takenouchi H., Tsunedomi R., Nakajima M., Ueno T., Takeda S., Yoshino S., Okuno K., Fujita Y., Hamamoto Y., Kawakami Y., Oka M., Nagano H. miR-196b, miR-378a and miR-486 are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment in colorectal cancer. *Oncol. Lett.* 2017;14(2):1355-1362. Epub 2017; Jun 2. DOI 10.3892/ol.2017.6303.
- Sokolenko A.P., Imyanitov E.N. Molecular tests for the choice of cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2017; DOI 10.2174/1381612823666170719110125.
- Szczepaniak Sloane R.A., Gopalakrishnan V., Reddy S.M., Zhang X., Reuben A., Wargo J.A. Interaction of molecular alterations with immune response in melanoma. *Cancer.* 2017;123(S11):2130-2142. DOI 10.1002/cncr.30681. 28543700.
- Tiffen J., Wilson S., Gallagher S.J., Hersey P., Filipp F.V. Somatic copy number amplification and hyperactivating somatic mutations of EZH2 correlate with DNA methylation and drive epigenetic silencing of genes involved in tumor suppression and immune responses in melanoma. *Neoplasia.* 2016;18(2):121-132. DOI 10.1016/j.neo.2016.01.003.
- Wang T., Wang G., Hao D., Liu X., Wang D., Ning N., Li X. Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. *Mol. Cancer.* 2015;14:125. DOI 10.1186/s12943-015-0402-5.
- Yang S., Ji Y., Gattinoni L., Zhang L., Yu Z., Restifo N.P., Rosenberg S.A., Morgan R.A. Modulating the differentiation status of ex vivo-cultured anti-tumor T cells using cytokine cocktails. *Cancer Immunol. Immunother.* 2013;62(4):727-736. Epub 2012; Dec 4. DOI 10.1007/s00262-012-1378-2.
- Yoo A.S., Sun A.X., Li L., Shcheglovitov A., Portmann T., Li Y., Lee-Messer C., Dolmetsch R.E., Tsien R.W., Crabtree G.R. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature.* 2011; 476(7359):228-231. DOI 10.1038/nature10323.