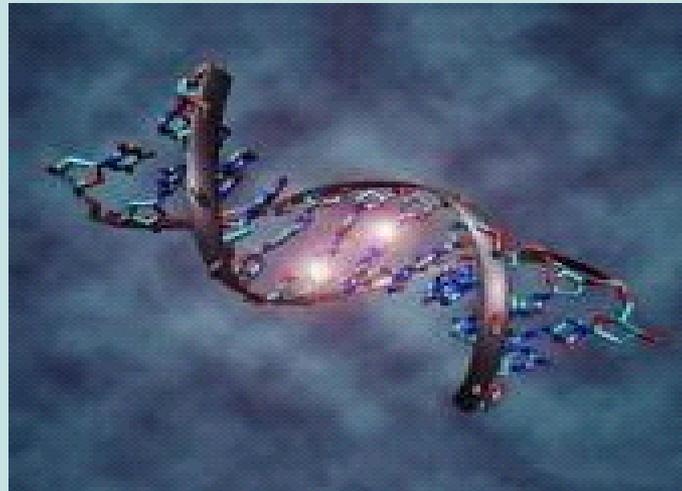


# KNOW YOUR SKIN

## Молекулярно-патологични маркери за туморен отговор при кожен меланом



Доц. д-р М. Георгиева, УМБАЛ Св. Марина, Варна

# Меланом

Меланома е неопластично заболяване, резултат от малигнена трансформация на нормалните меланоцити. Трансформиране на меланоцитите в малигнен меланом включва взаимодействия между генетични фактори, излагане на УВ и туморната микросреда.

- ☼ Един от най-агресивните тумори (79% смъртност от кожни тумори)
- ☼ В Европа, 2.5% от всички неоплазии (5000 смъртни случая от меланом годишно)
- ☼ Честотата се увеличи драматично в последните десетилетия (15 пъти в последните 50 години)
- ☼ Извънредно лоша прогноза, особено в напреднали стадии. **Резистентност към химиотерапия**



## Меланомни субтипове - честота на 'driver' мутации при меланом по анатомично място на първичния тумор

	Arising from Skin Without Chronic Sun Damage	→	~50% BRAF ~20% NRAS
	Arising from Skin With Chronic Sun Damage	→	~10% BRAF ~10% NRAS ~2% KIT
	Arising from Mucosal Surfaces	→	~5% BRAF ~15% NRAS ~20% KIT
	Arising from Acral Surfaces	→	~15% BRAF ~15% NRAS ~15% KIT
	Uveal Melanoma	→	~32% GNA11 ~50% GNAQ <1% BRAF

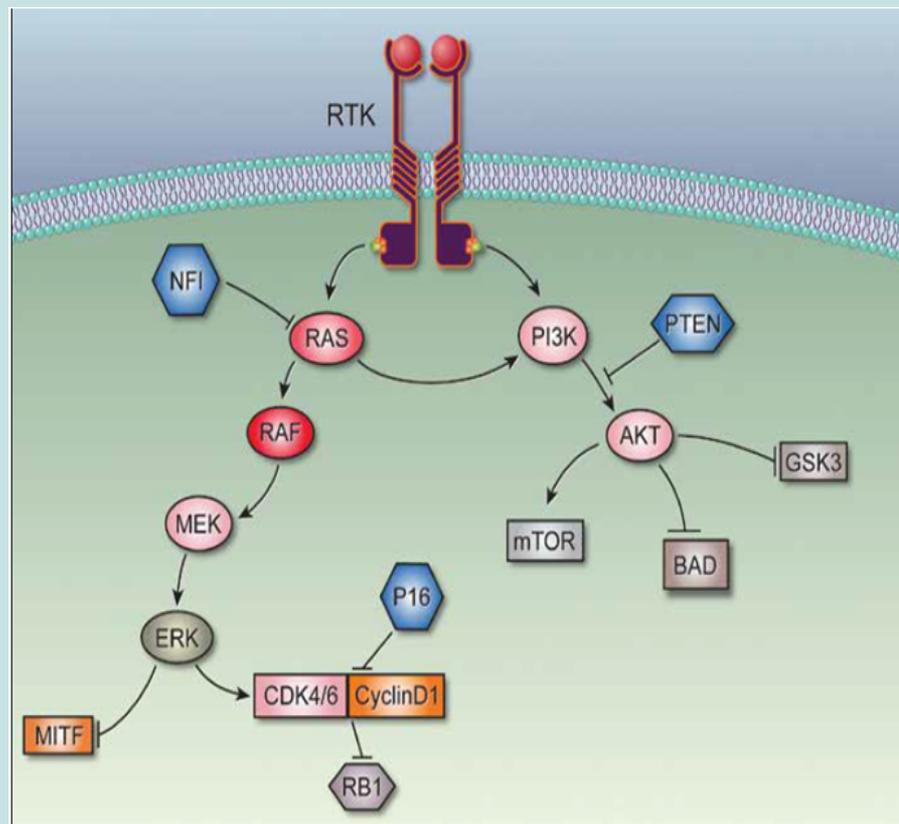
Меланомните субтипове се дефинират на молекулярно ниво чрез активирации ('driver,') мутации в онкогени, като BRAF, NRAS, KIT, GNA11 и GNAQ. Такива мутации водят до конститутивна активация на мутиралите сигнални протеини която инициира и поддържа туморогенезата.

Adapted from Lovly, C., W. Pao, J. Sosman. 2015. Molecular Profiling of Melanoma. *My Cancer Genome* <http://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/> (Updated June 16 2015).

# Онкогенно сигнализиране при меланом

При нормални клетки растежните фактори активират рецептор-тирозинкиназите (RTKs), те усилват този сигнал чрез сигнални каскади и осъществяват регулацията на клетъчния растеж, пролиферация и други процеси.

Множество гени в тези сигнални пътища са засегнати от соматични промени в меланом, вкл. **активиращите мутации** (червено), **амплификации** (оранжево) или **генетични промени водещи до загуба на функция** (loss of function)



- MAPK и AKT са двата доминиращи сигнални пътя при малигнен меланом
- MAPK води до увеличаване на клетъчната пролиферация, а AKT води до инхибиране на апоптоза и увеличено оцеляване.
- BRAF димеризиране и активация се подпомагат от RAS.
- ERK обикновено дава негативна обратна връзка. BRAF V600E мутацията конститутивно активира киназата, което води до увеличена пролиферация
- Ретинобластомният (RB1) път е с ключова роля в регулацията на клетъчния цикъл. Ключови гени за патогенезата на меланом са TP53, CDKN2A (циклин-зависим киназен инхибитор 2A) и CDK4 (циклин-зависима киназа 4)



# RAS-RAF-MEK-ERK сигнален път

най-често засегнат от активиращи мутации от всички останали

## BRAF

BRAF кодира серин/треонин киназа - ключов ефектор на RAS/RAF/MEK/ERK сигналния път.

### **BRAFV600 мутации**

Субституциите при Валин на позиция 600 (V600) са ~95% от докладваните точкови мутации при меланом, като най-разпространената е V600E (~75% от V600 мутациите), следвана от V600K (~20%).

Общата честота на BRAFV600 мутациите при пациенти с меланом е около 40-50%. Това отразява честотата при разпространените кожни меланоми, които се развиват в райони с периодично излагане на слънце. (без *BRAFV600K*)

Честотата на BRAFV600 мутациите е по-ниска при акрални (10-15%), мукозни (~5%) и кожни меланоми с хронично слънчево увреждане (CSD) (~10%) и практически липсват при увеални меланоми.

BRAFV600 мутации също са намерени до 82% в бенигнени невуси - вероятна ранна роля в туморното развитие.

# Молекулярни ефекти на BRAF мутациите

- **V600 мутации** - всички увеличават каталитичната активност на BRAF киназата от 150 - 700X и резултата е конститутивна активация на downstream компонентите на RAS-RAF-MEK-ERK сигналния път.

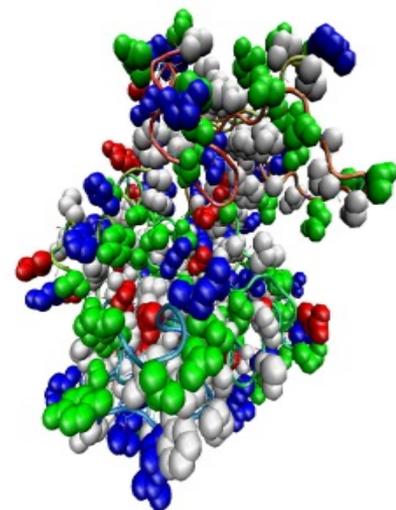
- **Non-V600 - мутации** - протеини с хетерогенна киназна активност

- Ефектите върху каталитичната активност са: висока, средна и ниска/понижена

- мутации, които не увеличават каталитичната активност на BRAF спомагат за димеризацията на BRAF с CRAF и все пак активират MEK & ERK

Exon 15 1799 T/A  $\longrightarrow$  V600 E

Засяга киназния домейн на протеина - „gain-of-function“ мутация



# BRAF мутации – клинично значение

## ☼ BRAF V600 мутации

- BRAFV600E мутация е свързана с по-млада възраст при диагноза.
- Пациенти с метастатичен меланом с BRAFV600K мутация са по-възрастни при диагноза
- Наличие на BRAFV600K мутация се свързва също и с по-късо време от начална диагноза до IV стадий на заболяването и по-къса преживяемост след диагноза в стадий IV, в сравнение с BRAFV600E
- BRAF V600K мутирал меланом показва увеличена склонност да метастазира в мозък и бели дробове
- - Силен предиктивен фактор за FDA одобрени таргетни терапии: Vemurafenib, Dabrafenib, Trametinib

*Класификацията на меланоми съдържащи BRAF мутация се дължи на появата на селективните BRAF инхибитори*

## ☼ Non-V600 BRAF мутации – често имат едновременно активиращи NRAS мутации, за разлика от BRAFV600 мутации

- Предиктивни за липса на повлияване от V600 – селективни BRAF инхибитори
- Активиращи non-V600 BRAF мутации (L597S) – чувствителни на MEK инхибитори – докладвана е драматична и дълготрайна чувствителност при двама пациенти с BRAFL597 мутации към MEK инхибиторите TAK-733 и trametinib
- Преклинични проучвания: подкрепят тестването на MEK и CRAF инхибитори



# NRAS

RAS/RAF/MEK/ERK сигналният път също се активира в меланом чрез точкови мутации в NRAS гена.

Втора по разпространение соматична мутация: кожни (20%), акрални (10%), мукозни (5%), увеални - липсва

Както и при BRAF, най-висок процент NRAS мутации са при кожните тумори без CSD и не са открити при увеални меланоми.

## Молекулярна биология:

- Повечето от мутациите са Q60 и Q61 в екзон 2 (~80%) и G12 и G13 в екзон 1 (~20%).

- Обикновено са взаимно изключващи се с BRAF V600 мутации, но се припокриват с Non-V600 BRAF мутации

- Активират MAPK и други сигнални пътища - PI3K-AKT, RAC и др.

## Клинично значение

- Свързани са с по-напреднала възраст при диагноза, локализация на първичния тумор на крайниците и нодуларна хистология.

- По-късо време за далечни метастази и по-къса преживяемост след начална диагноза

- Наличието на BRAF или NRAS мутации увеличава риска от развитие на мозъчни метастази при начална диагноза.

## Прогноза: Лоша

При начална диагноза - Dewitt, PCMR, 2011

Стадий IV - Jakob, Cancer, 2012

## Терапии:

Няма одобрени NRAS специфични терапии засега, но е важно да се тестват NRAS мутации защото са предиктивни за резистентност към BRAF инхибитори

**В проучване** - MEK инхибитори (MEK162) и CDK4 инхибитори; Комбинирани методи

Клинични проучвания с NRAS позитивни пациенти (NCT0178157, NCT01320085, NCT00304525 и NCT01363232).

# KIT

c-KIT гена кодира рецептор тирозинкиназа която активира множество сигнални пътища, вкл. RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT и JAK-STAT

c-KIT участва в меланоцитния пигментен път чрез активация на MITF

Открити са увеличен брой копия (~25%) и мутации в рецепторния тирозинкиназен ген (точкови мутации и мутирали+амплифицирани) при мукозни, акрални и CSD кожни меланоми

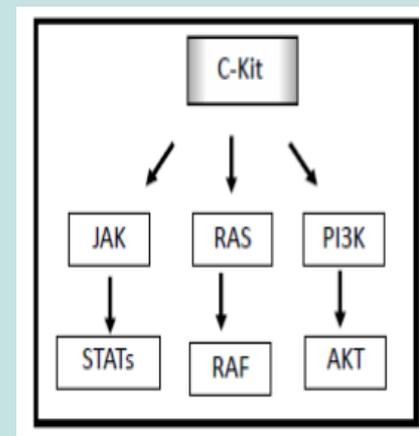
KIT генетичните аберации при меланом се различават от други тумори (GIST) в честотата на увеличен брой копия, в преобладаване на мутации-субституции (делеции и инсерции са редки) и мутации в екзони 13, 17 и 18.

Тези мутации не корелират с преживяемост.

c-KIT **мутационен анализ** е за BRAF негативни пациенти с акрални, лентигинозни или мукозни меланоми

**Терапия:** KIT инхибитори  
Imatinib при KIT Mutant/amplified  
други c-KIT блокери са sunitinib, dasatinib и sorafenib  
Фаза 2 проучвания

Резистентност към cKIT таргетна терапия се асоциира с появата на NRAS мутации.





## Роля на MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) в патогенезата на меланом

MITF е решаващ за продукцията на меланин. Важен е и за диференциацията, инвазията (по време на физиологичната миграция) и преживяемостта на меланоцитите.

Тъй като всички тези функции са критични за нормалната меланоцитна биология, дерегулацията на MITF допринася за патогенезата на меланом.

**MITF амплификация** става в около 20% от меланомите и се асоциира с **лоша прогноза**.

Специфична герминативна мутация се асоциира с увеличен брой невуси, не-син цвят на очите и увеличен риск за меланом.

Има данни за интересна връзка между MITF и MAPK сигналния път, което е от значение за таргетните BRAF терапии.

BRAF инхибиторите увеличават антигенността на меланомите чрез увеличена стабилност на MITF протеина и последваща увеличена експресия на меланоцитни антигени.

*MITF директно контролира експресията на PGC1 $\alpha$ , което индуцира митохондриална респирация/дишане и съпътстваща промяна от гликолиза към оксидативно фосфорилиране.*

## Таргетни агенти за активирания MAPK сигнален път при BRAFV600 мутирал меланом. (MAPK, митоген активирана протеин киназа)

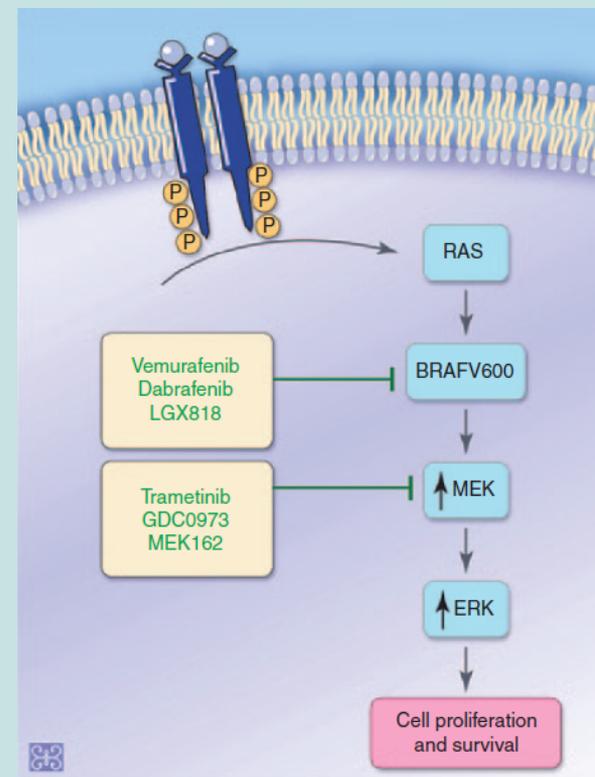
Селективни инхибитори на BRAF, като **vemurafenib** и **dabrafenib** индуцират туморна регресия и удължават общата преживяемост при пациенти с BRAF-V600E мутирал метастатичен меланом.

Терапия с тези агенти води до намаляване на нивата на pERK, което означава клиничен отговор.

Но те могат и парадоксално да хиперстимулират RAF киназите в клетките, при които е активиран RAS пътя upstream от див тип BRAF киназа.

**MEK инхибиторите** (trametinib, MEK 162) се използват често в комбинация с BRAF инхибитори за лечение на меланом. MEK е компонент от BRAF/MEK/ERK сигналния път, който се активира в отговор на BRAF-инхибиране. (т.е. при резистентност към BRAF инхибиторите)

Има и клинични проучвания с **imatinib (Gleevec)** и **nilotinib (Tasigna)**, които таргетират клетки с мутации в C-KIT гена.





# Механизми на резистентност към BRAF инхибитори

На практика при всеки пациент третиран с BRAF инхибитор рано или късно заболяването прогресира.

**А. Механизми на първична резистентност** -не са напълно изяснени; асоциират се с амплификация на регулатора на клетъчния цикъл *cyclin D1*, загуба на туморсупресорния ген *PTEN* и стромалната продукция на хепатоцитния растежен фактор (*HGF*).  
Идентифициран е адаптивен метаболитен път който намалява ефикасността на BRAF инхибиторите - онкогенния BRAF регулира оксидативния метаболизъм чрез *PGC1a* и *MITF*. Тази склонност към оксидативно фосфорилиране при меланомите третирани с BRAF таргетна терапия предполага използване на митохондриални инхибитори в комбинация с BRAF инхибитори. (Haq R et al 2014)

**Б. Механизми на придобита резистентност** - характеризирани и класифицирани като MEK-зависими и MEK- независими

**MEK – зависима** реактивация на ERK-MAP киназното сигнализиране заради гъвкавата смяна между RAF изоформите (увеличаване експресия на CRAF),

- димеризация на (скъсени) сплайс варианти на *BRAF V600E*
- амплификация на *BRAF V600E*,
- активиращи мутации в *NRAS*,
- увеличена експресия на *COT* (серин/треонин MAPK кинази) като алтернативен активатор на MEK
- активиращи мутации в MEK;
- загуба на *NF1*

**MEK-независимо** активиране на алтернативни сигнални пътища, като

- увеличено *PDGFR-β* - сигнализиране или
- активиране на фосфоинозитид 3-киназия (PI3K/АКТ) сигнален път чрез увеличени нива на рецептора на инсулиновия растежен фактор (*IGFR1*).

Друг начин за представяне на резистентност базиран на функционални пътища.

Три общи категории за описване механизмите на резистентност към таргетна терапия:

- ❖ Излишък на сигнални пътища - способност на сигналния път да остане активиран, въпреки, че е инхибиран от таргетна терапия;
- ❖ Избягващи пътища - дори да е инхибиран сигналният път, клетката може да засили алтернативен сигнален път и да избегне ефекта на таргетната терапия;
- ❖ Реактивация на сигналния път - способност на клетката да реактивира *downstream* сигналния път чрез мутации, въпреки наличието на инхибираща терапия

## Стратегии за преодоляване на резистентността

- оптимизиране инхибирането на MAPK сигналния път (таргетиране на ERK, CDK4/6 като монотерапии и в комбинация)
- използване на комбинации които таргетират алтернативни пътища способстващи резистентност (PI3K/ AKT).
- комбиниране на таргетна терапия с имунотерапия (вкл. interferon, IL-2, anti-CTLA-4, anti-PD-1/PD-L1) - базира се на хипотезата, че високата честота на отговор при BRAF/MEK инхибиторите може да бъде трансформирана във висока честота на продължителен отговор с имунотерапия.

Agent	Trade Name	Mechanism	Approval Date
ipilimumab	Yervoy	anti-CTLA-4 antibody	March 25, 2011
vemurafenib	Zelboraf	BRAF inhibitor	August 17, 2011
dabrafenib	Tafinlar	BRAF inhibitor	May 29, 2013
trametinib	Mekinist	MEK inhibitor	May 29, 2013
dabrafenib + trametinib	Tafinlar/ Mekinist	BRAF/MEK inhibitor	January 8/9, 2014 Action Date on FDA Priority Review

## Молекулярна диагностика

Важно е клиницистите да разбират основните принципи на молекулярната диагностика, за да осигурят на пациентите си най-новото и ефикасно лечение.

Молекулярно профилиране на туморите обикновено се прави на ДНК изолирана от парафинови блокчета. Преди тестването е необходим анализ на тъканната проба от патолог, за потвърждаване наличието на тумор и определяне на туморното съдържание на пробата. (макродисекция)

### Методи за молекулярно-патологично тестване на меланом

#### 1. Алел-специфичен PCR – открива мутации в единични гени

**Метод:** Real-time PCR, при който се добавят към реакцията флуоресцентно маркирани проби за див тип и мутантен тип. След хибридизация към геномната ДНК се освобождават маркираните молекули за детекция. Последващите PCR цикли с тези проби амплифицират сигналите, като така се измерват точно двата алела които се изследват.

**Време за теста:** 1-2 дни; **Pros:** Чувствителен – може да открие мутантна ДНК 1-5%. Не се изисква специално оборудване; **Cons:** Таргет-специфичен и не може да открива други мутации в туморната ДНК

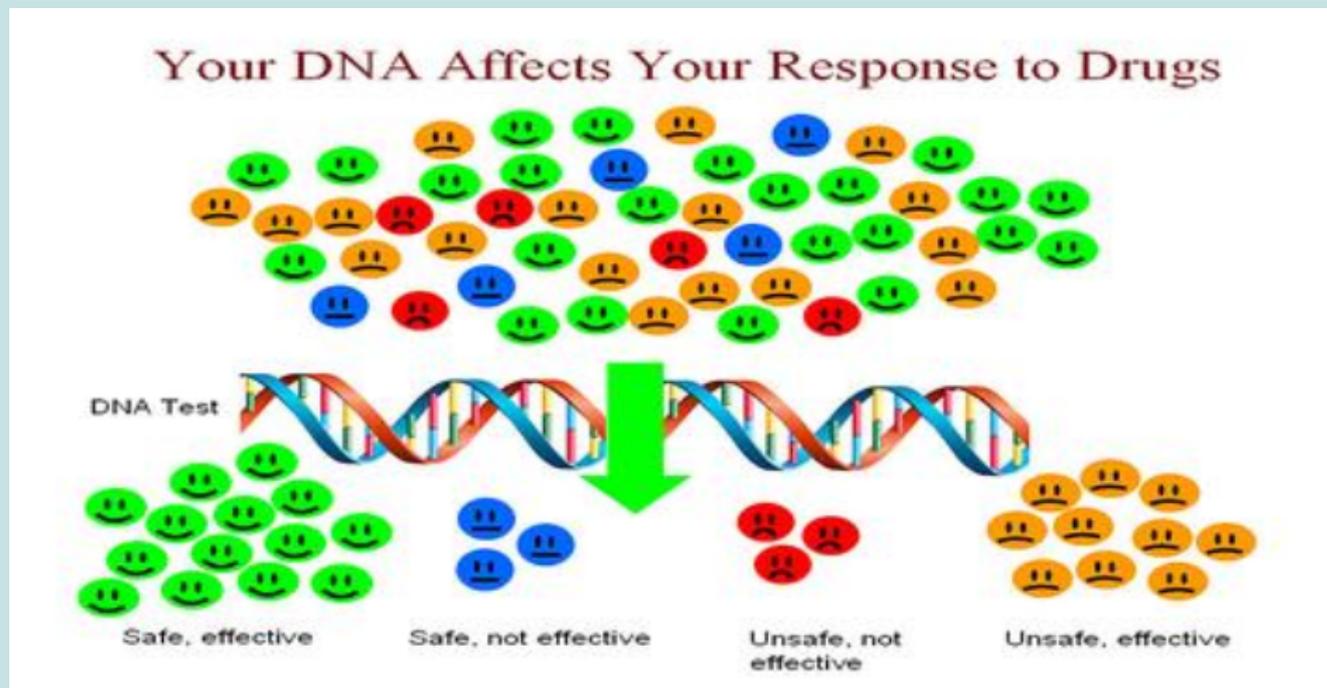
2. **Sanger секвениране** се използва за идентифициране на SKIT мутации.

3. **Имунохистохимично тестване** с BRAFV600E – специфично антитяло VE1 и NRAS Q61 R – специфично антитяло ( и двете със 100% чувствителност и специфичност за съответните мутации)

4. **NGS** също се използва за молекулярна диагностика на меланоцитни тумори. Напоследък се предлагат NGS тестове на **генни панели** предимно за терапевтични цели. Те са по-чувствителни в сравнение със SS (Sanger seq) и се използва по-малко ДНК. Basket trials, Off label

## Придружаваща диагностика (Companion diagnostics) -

Молекулярни тестове за оценка наличието на мутации позволяващи идентифициране на механизми за таргетно лечение.





## Придружаваща диагностика за меланом

**Vemurafenib** е одобрен от FDA за пациенти с BRAF мутации детектирани с CE IVD **cobas® 4800 BRAF V600** мутационен тест (Roche Molecular Systems Inc.) като придружаваща диагностика, а **dabrafenib** и **trametinib** са одобрени с придружаващ тест **THxID™ BRAF** кит (bioMérieux, Inc.).

**Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** е алел-специфичен real-time PCR тест създаден за качествена детекция на BRAF V600E мутация специално в ДНК екстрахирана от формалин фиксирана включена в парафин тъкан за селектиране на пациенти с меланом, чиито тумори имат BRAF V600E мутация за терапия с Vemurafenib. Този тест детектира също и V600K и V600D мутации, но с пониски чувствителност и лимит на детекция и не може да отдиференцира различните мутации. Все пак Cobas метода има много ниска честота на грешки при детекцията.

**THxID™ BRAF Kit** е IVD алел-специфичен real-time PCR тест създаден за качествена детекция на BRAF V600E и V600K мутации в проби ДНК екстрахирана от формалин фиксирана включена в парафин тъкан за селектиране на пациенти с меланом, чиито тумори имат BRAF V600E или V600K мутация за терапия с dabrafenib (Tafinlar) и trametinib (Mekinist™)

Параметри, които могат да увеличат честотата на грешки са лоша фиксация на пробите, високо ниво на пигментация и остаряване на парафиновите блокчета. Друг важен параметър за точност на резултата е процента туморни клетки в пробата, който е хубаво да е висок.

Тестване обикновено се препоръчва за пациенти в стадии IIIC и IV. Има над 95% съвпадение на BRAF и NRAS мутационен статус при първични тумори и регионални метастази. Счита се, че метастазите отразяват по-точно туморната биология по време на системната терапия и затова са предпочитани за тестване. Може да се тестват и първични тумори ако няма на разположение метастатична тъкан.

Преди поръчване на молекулярно тестване, клиницистите би трябвало да се съобразят с типа меланом (напр. кожен или акрален) и наличие на метастази.

Пациенти с кожен меланом се тестват за BRAF (+/- NRAS), а при негативни резултати, се тестват за KIT. Пациенти с акрални или мукозни меланомы би трябвало да се тестват едновременно за BRAF (+/- NRAS) и KIT мутации.

Засега липсва придружаващи диагностични тестове (IVD) за NRAS и SKIT.

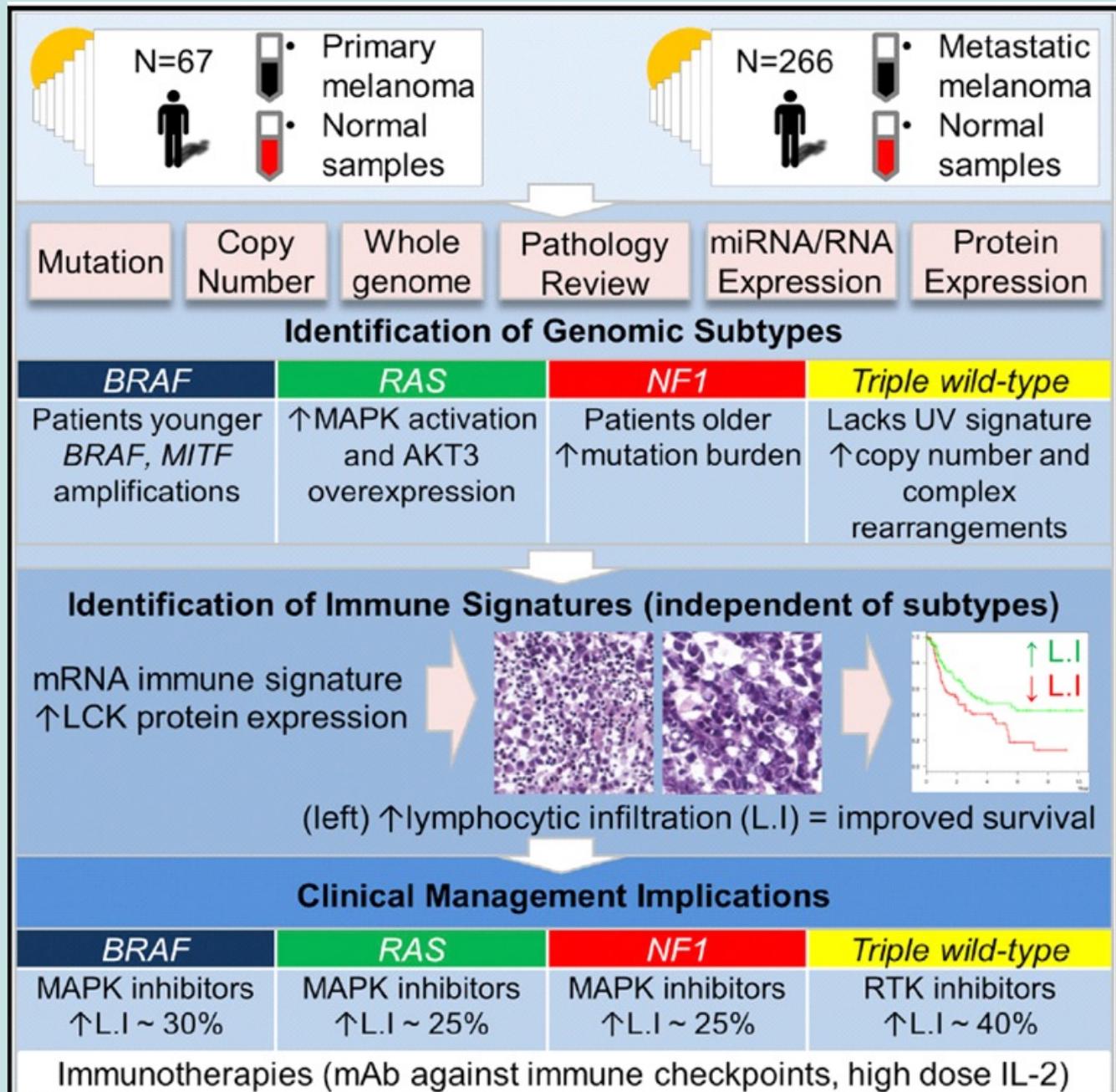


## Геномна класификация на кожен меланом – TCGA Nature 2015

Интегриран анализ на кожни меланоми установява структура за геномна класификация на 4 субтипа които могат да насочват клинични решения за таргетни терапии:

- BRAF и RAS, дефинирани чрез мутации, които са чести при меланом,
- NF1- (neurofibromatosis-1 ген) характеризизирана чрез инактивиращи мутации в NF1 гена и
- Тройно негативен див тип – cKIT мутации с ниска честота и много промени в брой копия;
- ❖ Имуногенен транскриптомен субклас – Идентифицирана е имунна сигнатура, характеризираща подгрупа пациенти (около 51%), с високи нива на експресия на имунни инфилтрационни маркери, свързани с подобрена преживяемост и с потенциал за приложение на имунотерапия.
- ❖ Протеин PD-L1, използван за предсказване на отговора към checkpoint инхибиторите, може да бъде свръхекспресиран при меланомни клетки по генетични причини – детектирана е амплификация на PD-L1 гена особено при хора с BRAFV600 мутации.

Този извод обяснява защо теста за измерване само на PD-L1 експресията при тумори не е достатъчен за предсказване на отговорите към PD1/PD-L1 таргетните терапии.



# ИЗВОДИ

1. Меланомагенезата е комплексен процес включващ взаимодействия между генетични фактори, излагане на УВ и туморната микросреда.
2. Сигналните пътища, засегнати от соматични промени в меланома са: **МАРК** и **PI3K/АКТ/mTOR** - двата доминиращи сигнални пътя при малигнен меланом, Ретинобластомният (RB1) и MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) сигнални пътища.
3. Мутации в онкогени (BRAF, NRAS, SKIT, GNAQ and GNA11) и един туморсупресорен ген NF1 са налични в по-голямата част от меланомите, въпреки, че честотата на всеки тип мутация варира по анатомично място ( напр. мукозни, кожни, увеални).
4. МАРК сигналният път е свръхактивиран в почти всички меланоми и е чувствителен на инхибиране с малки молекули.
5. Тестване за BRAF мутации обикновено се препоръчва за пациенти в стадии IIIC и IV. Добре би било да се тестват и мутации в NRAS и SKIT.
6. Взаимодействията между МАРК сигналния път и експресията на туморни антигени и имунната инфилтрация предсказва терапевтична синергия с комбинирано молекулярно и имунно таргетиране.



# БЛАГОДАРЯ

