

Семинар 9

Немцова М.В.

Медицинская генетика

Фармация Курс 3 ЦИОП «Медицина будущего»

Онкогены. Активирующие мутации в онкогенах. Вирусный канцерогенез (HPV, вирус Эпштейн-Барр).

Гены-супрессоры. Механизмы инактивации генов-супрессоров опухолевого роста. Гены *TP53* и *RB1*. Ретинобластома.

Нестабильность генома является отличительной характеристикой опухолевой клетки

Генетическая нестабильность

- Наличие изменений в хромосомах, как числа хромосом (анеуплоидия и полиплоидия), так и внутренних хромосомных перестроек (делеций, инсерций, транслокаций)
- Наличие точковых мутаций в генах , приводящих к активации или инактивации генной функции
- Существование нестабильности микросателлитных повторов



Эпигенетическая нестабильность

- **Нарушение баланса метилирования/деметилирования**
- Деметилирование транспозонов и вирусных частиц, инактивированных в нормальной клетке
- Деметилирование гетерохроматина, в том числе и центромерного, что приводит к нарушению распределения хромосом при делении клетки
- Гиперметилирование регуляторных районов генов-супрессоров, приводящее к отсутствию их экспрессии



Образование опухоли

Одна опухоль – множество мутаций

Scienceexpress / www.scienceexpress.org / 7 September 2006 / Page 1 / 10.1126/science.1133427

Scienceexpress

Research Article

The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers

Tobias Sjöblom,^{1*} Siân Jones,^{1*} Laura D. Wood,^{1*} D. Williams Parsons,^{1*} Jimmy Lin,¹ Thomas Barber,¹ Diana Mandelker,¹ Rebecca J. Leary,¹ Janine Ptak,¹ Natalie Silliman,¹ Steve Szabo,¹ Phillip Buckhaults,² Christopher Farrell,² Paul Meeh,² Sanford D. Markowitz,³ Joseph Willis,⁴ Dawn Dawson,⁴ James K. V. Willson,⁵ Adi F. Gazdar,⁶ James Hartigan,⁷ Leo Wu,⁸ Changsheng Liu,⁸ Giovanni Parmigiani,⁹ Ben Ho Park,¹⁰ Kurtis E. Bachman,¹¹ Nickolas Papadopoulos,¹ Bert Vogelstein,^{1†} Kenneth W. Kinzler,^{1†} Victor E. Velculescu^{1†}

Секвенирование кодирующих частей 13000 генов в 11 образцах рака груди, 11 образцах колоректального рака, нормальных образцах

Отфильтровывание:

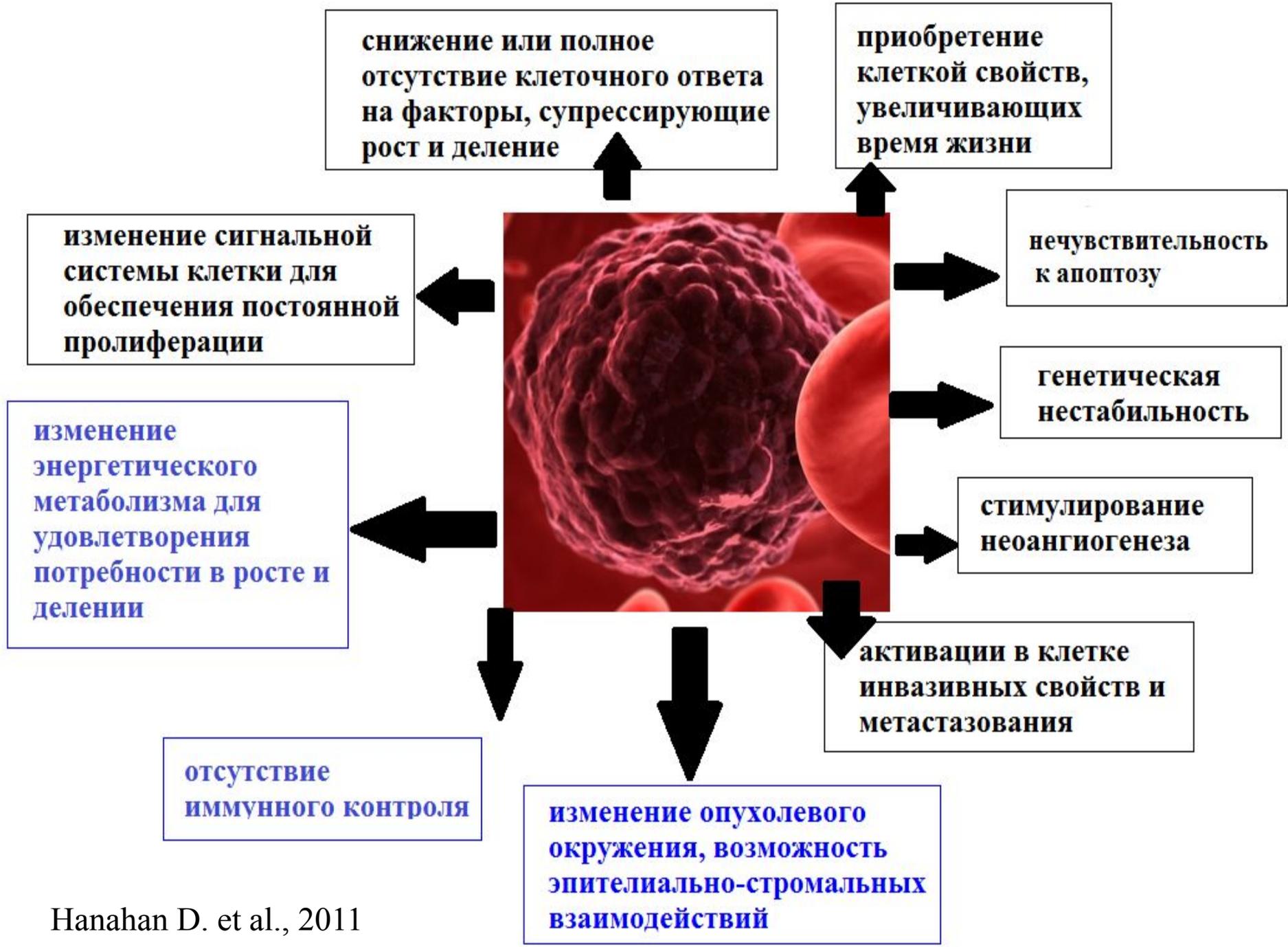
Синонимичных замен

Мутаций, присутствующих в нормальных образцах

Мутаций, не подтвержденных ресеквенированием

Обнаружено 1307 соматических мутаций в 1149 генах

Выявлено 189 генов, мутации в которых встречаются особенно часто



КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ



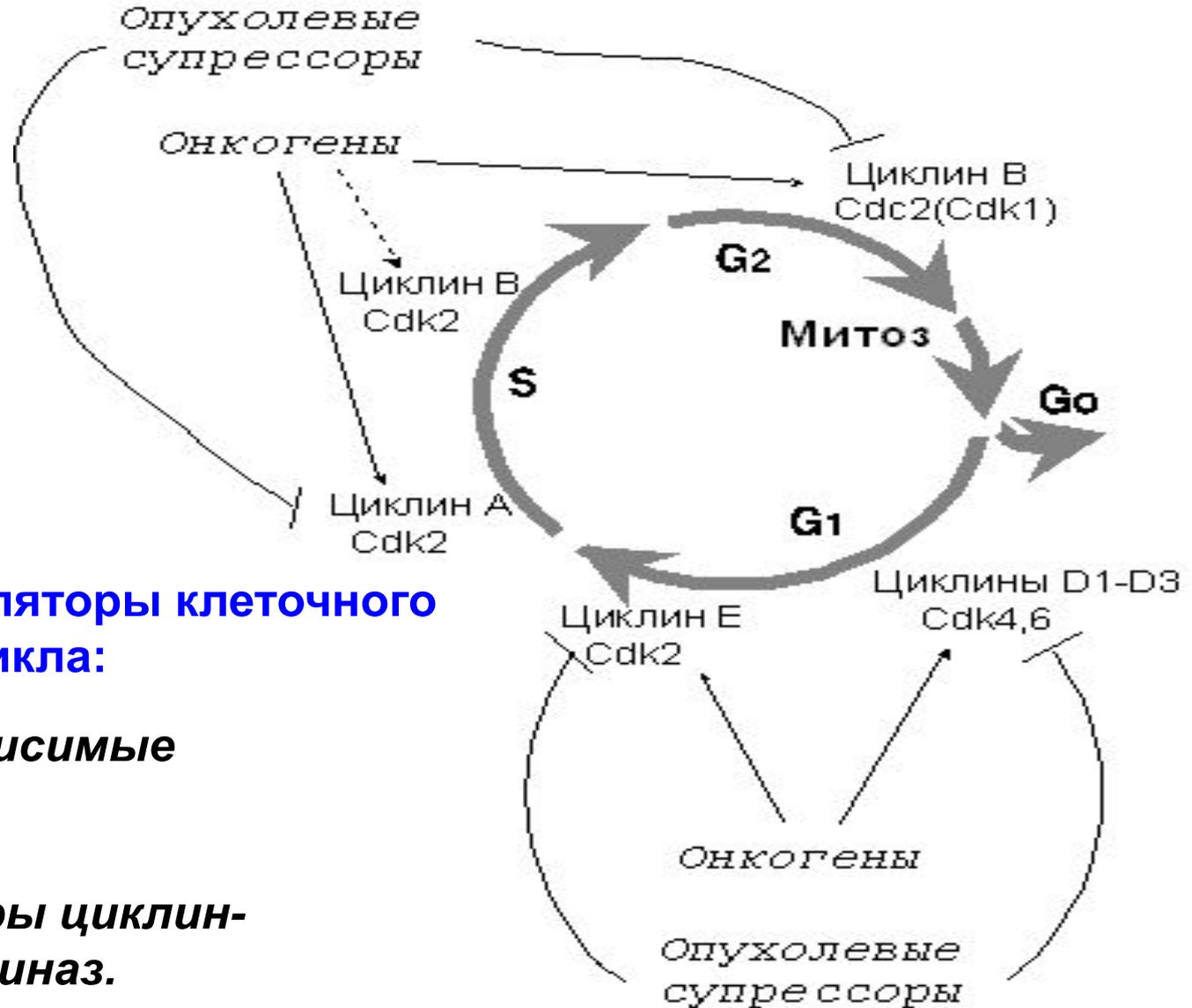
Все фазы клеточного цикла регулируются **специфическими белками**, кодируемыми генами клеточного цикла (cdc-генами)

В клетках эукариотов средняя продолжительность

- S-фазы – 8 часов
- G₂-фазы – 4 часа
- M-фазы – около 1 часа
- G₁-фазы – переменна по длительности

Точка рестрикции

Регуляция клеточного цикла



Ключевые регуляторы клеточного цикла:

- **циклин-зависимые киназы,**
- **циклины,**
- **ингибиторы циклин-зависимых киназ.**

ОНКОГЕНЫ

Позитивные регуляторы, способные индуцировать деление клетки в отсутствие внешнего стимула

В нормальных тканях имеют фоновый уровень экспрессии в качестве **протоонкогенов**

Действие проявляется в результате активации **протоонкогена до онкогена** даже в гетерозиготном состоянии (достаточно активации одного аллеля)

Активация

1. Нарушение экспрессии

- гиперэкспрессия;
- эктопическая экспрессия
- производство нового химерного белка с аномальной функцией

2. Механизм

- точковая активирующая мутация
- амплификация гена
- переход гена под более активный промотор, или активация промотора старого

ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ

Негативные регуляторы, препятствующие делению клетки

В норме экспрессируются почти во всех тканях

Действие проявляется только при наличии повреждения обоих аллелей (полная инактивация функции)

Инактивация

1. Мутации

гетерозиготы по мутантным аллелям генов-супрессоров имеют повышенную предрасположенность к опухолям

2. Потеря гетерозиготности

в опухолевых тканях - делеции районов локализации генов-супрессоров

3. Метилирование регуляторных районов, приводящее к отсутствию экспрессии гена

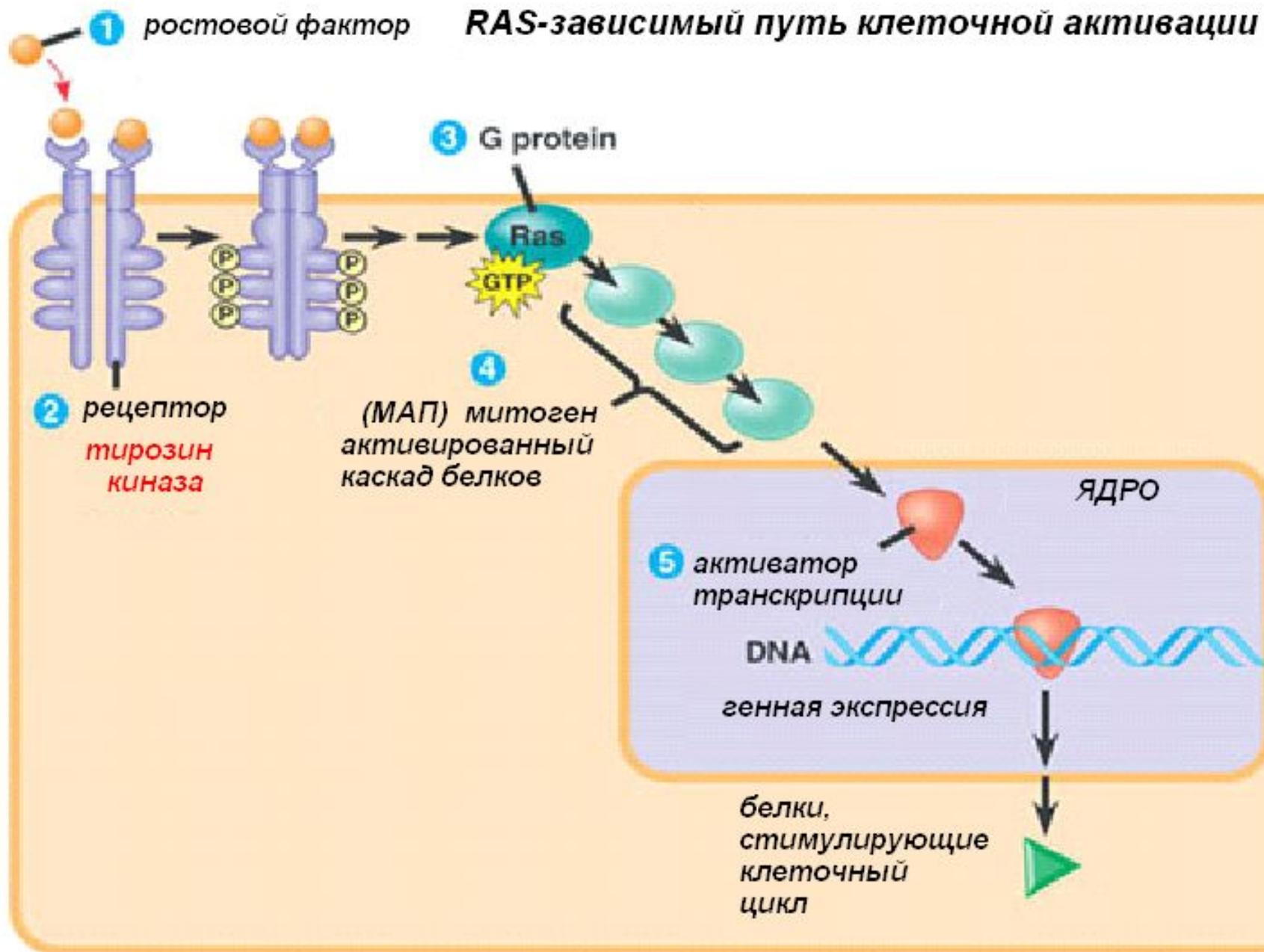
Онкогены

- ***вирусные онкогены***

- Вирус папилломы – рак шейки матки
- Вирус Эпштейн -Барр – рак носоглотки
- Вирус гепатита В – рак печени

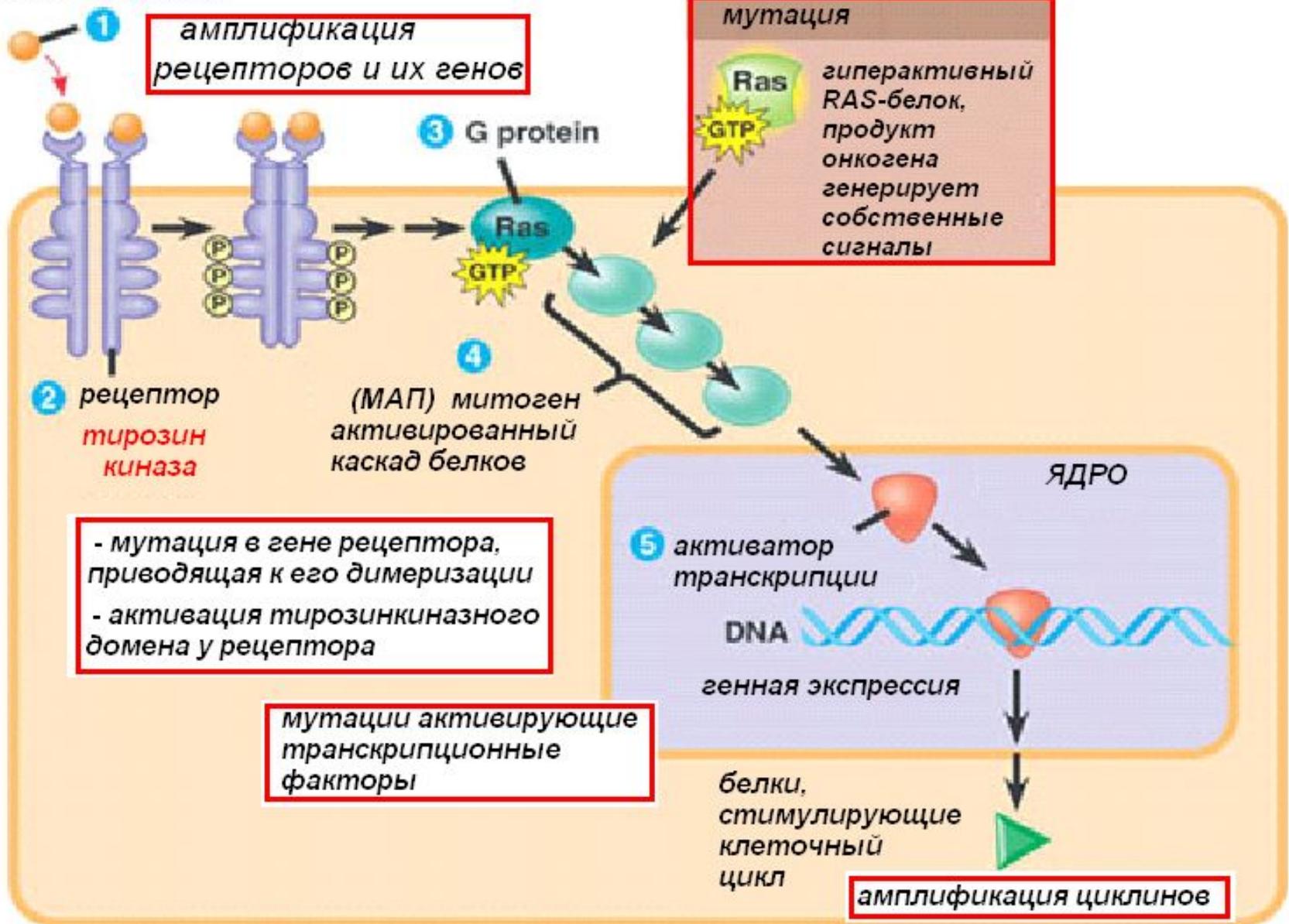
- ***клеточные онкогены (протоонкогены)***

- ***ростовые факторы – эпидермальный фактор роста (EGF1), фактор роста фибробластов (FGF1), фактор роста гепатоцитов (HGF) и др.;***
- ***рецепторы для факторов роста - рецепторные тирозинкиназы - EGF-R (ErbB), FGFR3, HGF-R (Met), Ret и др.;***
- ***факторы сигнальной трансдукции - белки семейства Ras – K-Ras, H-Ras и N-Ras;***
- ***транскрипционные факторы – E2F, Jun, Ets1, Myc и др.;***

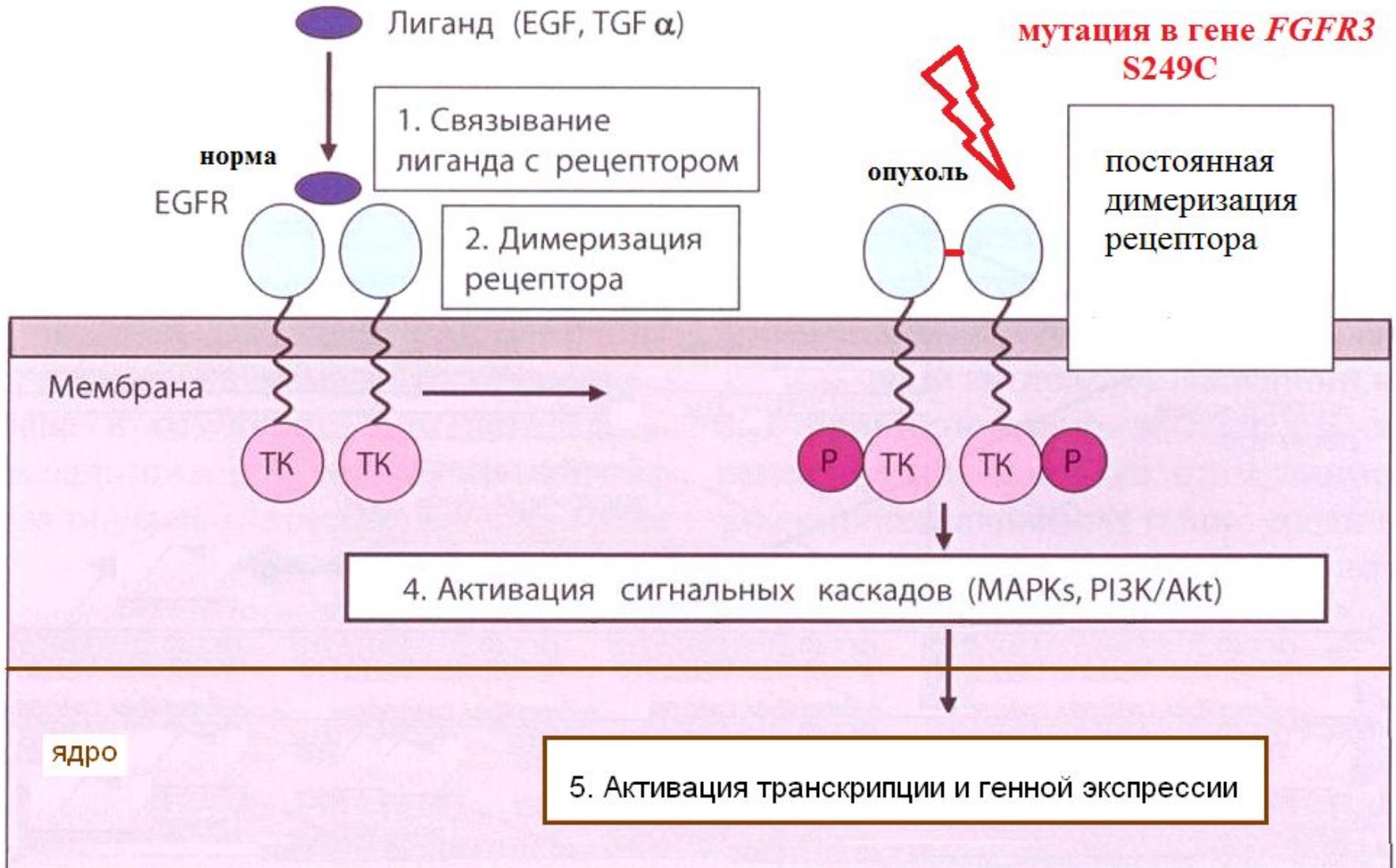
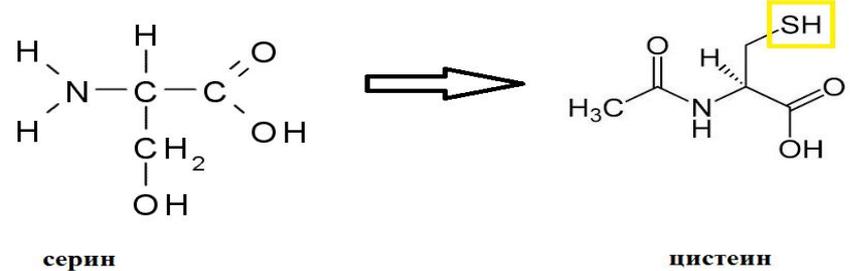


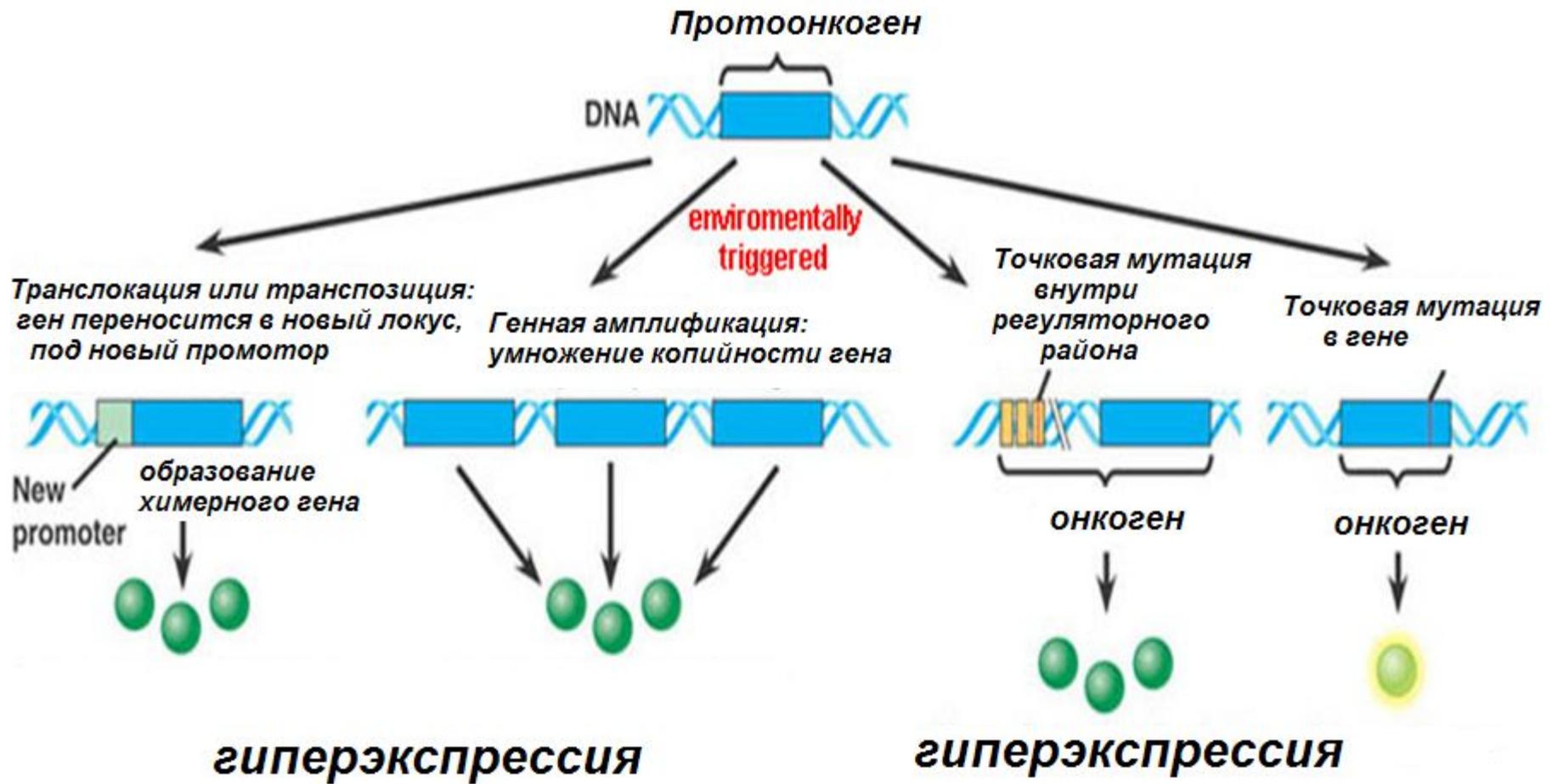
RAS-зависимый путь клеточной активации

ростовой фактор



Мутация в 249 кодоне гена *FGFR3* приводит к

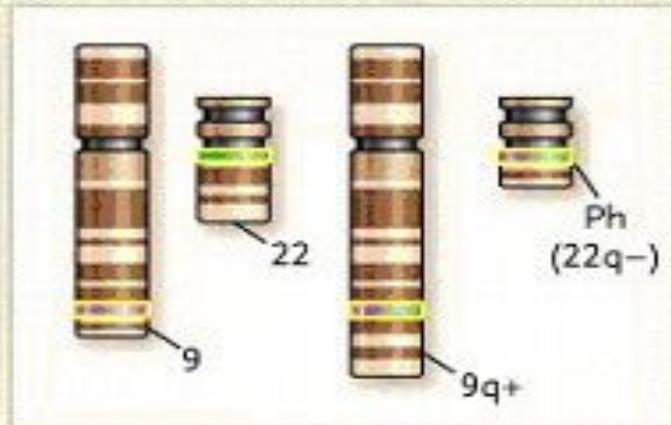




Пути активации протоонкогенов

1. Перемещение гена в другой локус, под более активный регуляторный элемент, с образованием химерных генов
2. Амплификация онкогенов
3. Мутации в собственном регуляторном элементе
4. Активирующие мутации самого протоонкогена

Филадельфийская хромосома – маркер хронического миелоидного лейкоза, встречается у 90% больных.



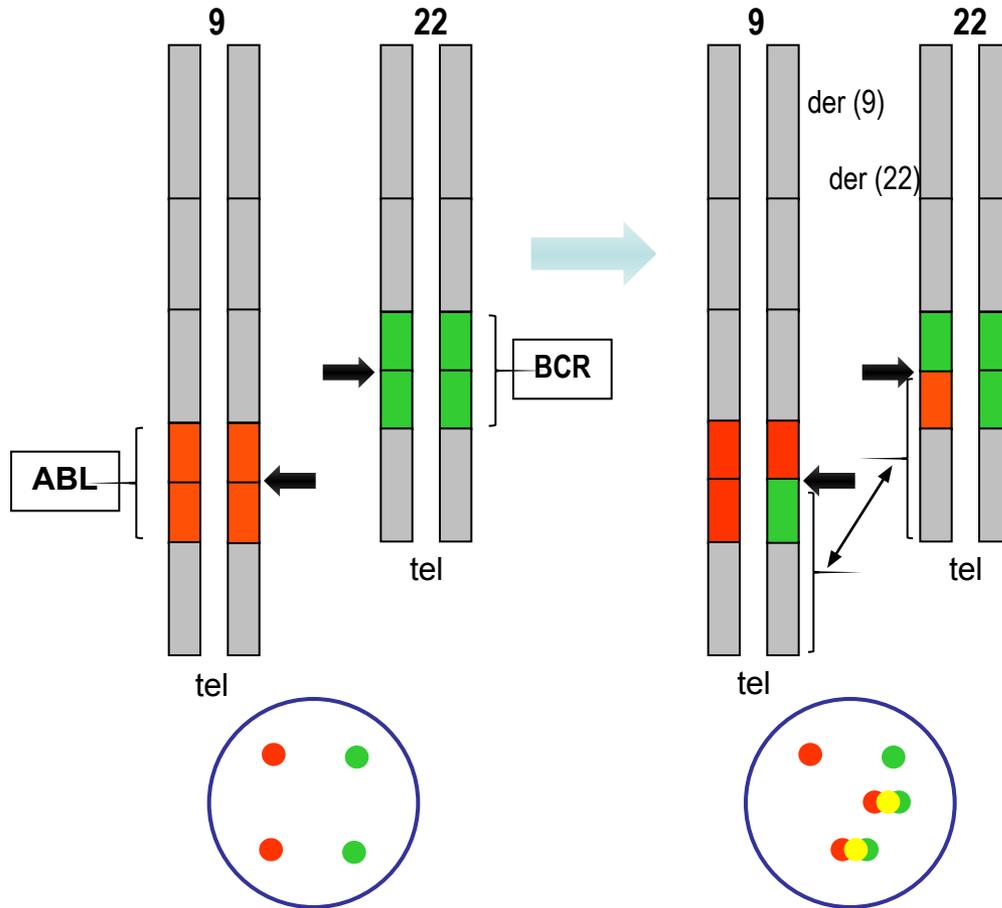
онкоген *BCR-ABL*
 $t(9;22)(q34;q11)$



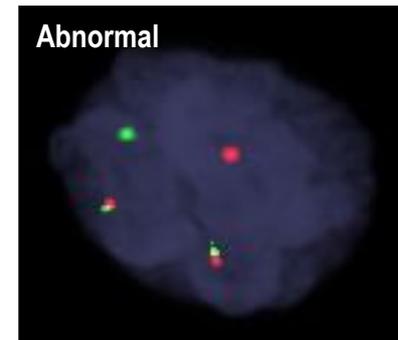
Протоонкоген *ABL1* (9q) соединяется с геном *BCR* (22q), образуя тирозинкиназу с высокой активностью

Транслокация BCR/ABL

(хронический миелоидный лейкоз)



○ Chromosome 9
○ Chromosome 22



○ Chromosome 9
● der (9): 1 fusion
○ Chromosome 22
● der(22): 1 fusion

- Probe designed to flank both sides of breakpoints on chromosome 9 and both sides of breakpoints on chromosome 22
- Used for diagnosis / prognosis, minimum residual disease detection or monitoring

← = Breakpoint

Злокачественные опухоли ЩЖ

- ***Папиллярная тиреокарцинома ~ 70-80%***
 - относительно благоприятная форма рака
 - возникает в результате радиоактивного загрязнения

- ***Фолликулярная тиреокарцинома ~ 10-20%***
 - агрессивная форма рака

- ***Медуллярная карцинома ~ 5-10%***
 - имеет С-клеточное (парафолликулярное) происхождение
 - составляют 20-30% всех случаев МРЩЖ
 - Наследственные формы, аутосомно-доминантный тип наследования
 - 3 клинических синдрома (МЭН-2А, МЭН-2Б, СМРЩЖ)

- ***Анапластическая тиреокарцинома ~ 5%***

МЭН 2А (Синдром Сиппла)

Синдром характеризуется наличием медуллярной карциномы щитовидной железы, феохромоцитомы (единичной, билатеральной или множественной) и гиперпаратиреоза. Описан в 1959 г. Джоном Сипплом.

Клиническая картина. Одним из первых проявлений синдрома МЭН 2А типа является **медуллярная карцинома** щитовидной железы, которая имеет длительный латентный доклинический период, характеризующийся С-клеточной гиперплазией с микроочагами медуллярного рака. Клинический период **медуллярной карциномы** при МЭН 2А типа варьирует у разных лиц от 3—5 до 10 лет. **Медуллярная карцинома** щитовидной железы — самая частая патология у больных с МЭН 2А типа. Соотношение лиц мужского и женского пола — 1:1. Возраст пациентов при установлении диагноза лежит в пределах 30—40 лет.

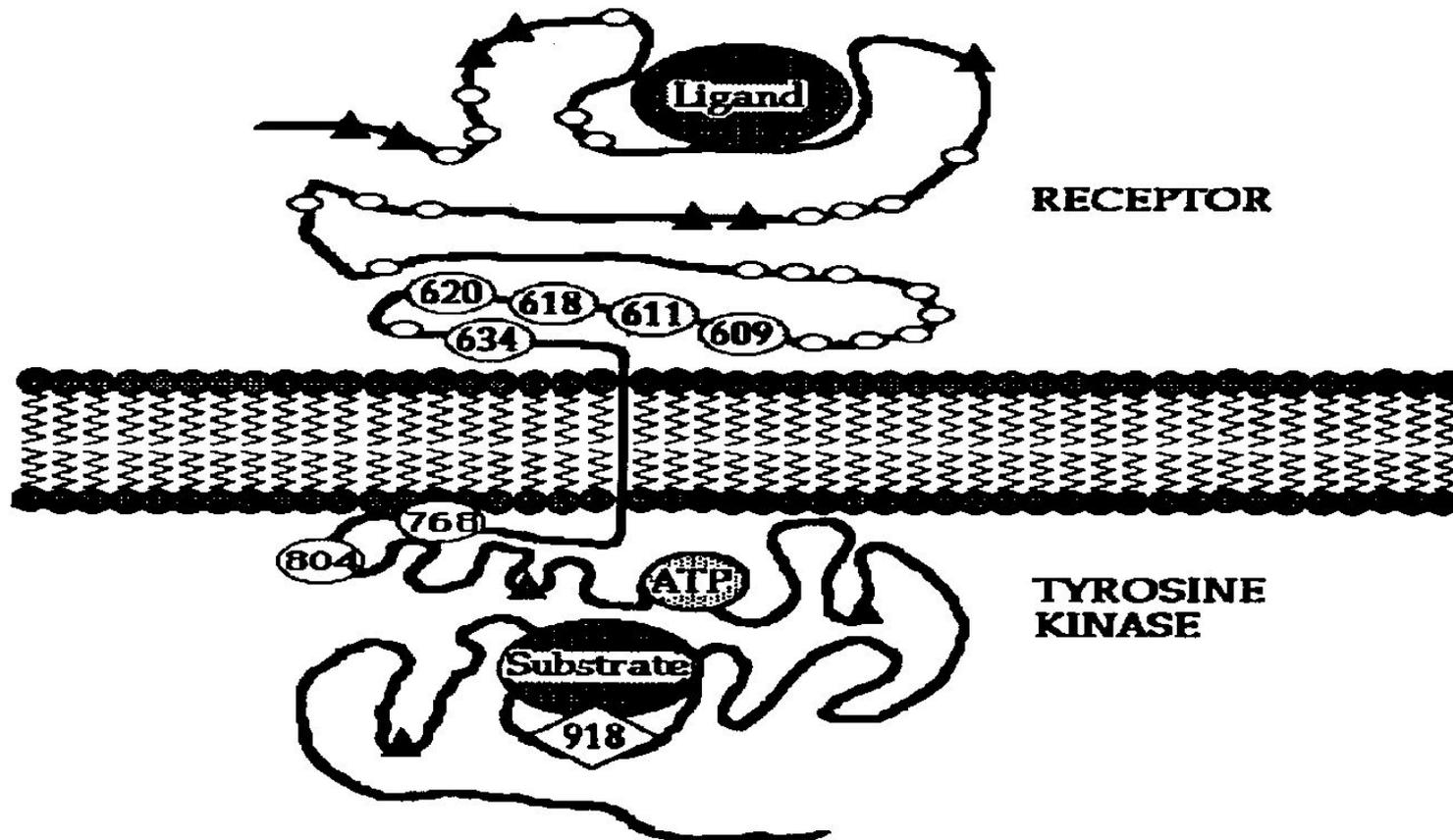
Следующей по частоте патологией при МЭН 2А типа является **феохромоцитома**, ранним клиническим проявлением которой может быть умеренная транзиторная или постоянная гипертензия. Возраст больных, у которых диагностировали ранние стадии опухолей из хромоффинной ткани коры надпочечников при МЭН 2А типа, в 62% случаев был менее 40 лет. Ранние клинические признаки **гиперпаратиреоза** при синдроме МЭН 2А типа заключаются в жалобах больных на отсутствие аппетита, незначительное снижение массы тела, подташнивание, неприятные ощущения в мезогастрии.

При синдроме МЭН - 2Б, наряду с **медуллярной карциномой щитовидной железы и феохромоцитомой** наблюдаются **множественные ганглионейромы слизистой оболочки** всего желудочно-кишечного тракта, начиная от губ и слизистой полости рта, заканчивая анусом. Для большинства больных характерен **марфаноподобный внешний облик - удлиненные конечности и пальцы, чрезмерная подвижность суставов, тремы между зубами, деформация митрального клапана сердца**

Классификация опухолей щитовидной железы
и частота встречаемости генетических мутаций в опухолях человека [4; 5]

Тип опухоли	Мутации генов	Частота, %
Папиллярная карцинома (выделяют 12 гистопатологических вариантов, включая фолликулярный вариант)	BRAF (V600E) RET/PTC RAS NTRK1	40–45 20–30 10–20 10
Фолликулярная карцинома (различают две категории по степени инвазивности и два варианта по цитологическим критериям)	RAS PAX8/PPAR PIK3CA PTEN	40–50 35 < 10 < 10
Семейная медуллярная карцинома	RET	> 95
Спорадическая медуллярная карцинома	RET	50
Низкодифференцированная карцинома	RAS TP53 BRAF CTNNB1 AKT1 RET	35–55 20–38 12–20 20–25 15 13
Недифференцированная (анапластическая) карцинома	T53 CTNNB1 RAS BRAF PIK3CA PTEN	70–88 60–66 50–52 20–29 16–20 > 14
Фолликулярная аденома	RAS PAX8/PPAR	20–40 2–10

Структура белка, кодируемого *RET*-протоонкогеном



Точковые мутации в кодонах **609, 611, 618, 620, 634, 768, 804** (10 и 11 экзон) характерны для 98% синдрома **МЭН-2А** и 80% **СМРЩЖ**. Мутация в **918** кодоне (16 экзон) является маркером синдрома **МЭН-2В** в 95% случаев.

Пациент с МРЩЖ



Анализ герминальных мутаций протоонкогена *RET*



Мутация обнаружена = наследственная форма

Мутация не обнаружена

Анализ мутаций *RET* у всех ближайших родственников

Определение стимулированной секреции кальцитонина у родственников первой степени родства

Мутаций нет

Мутация обнаружена

Дальнейшее обследование не требуется

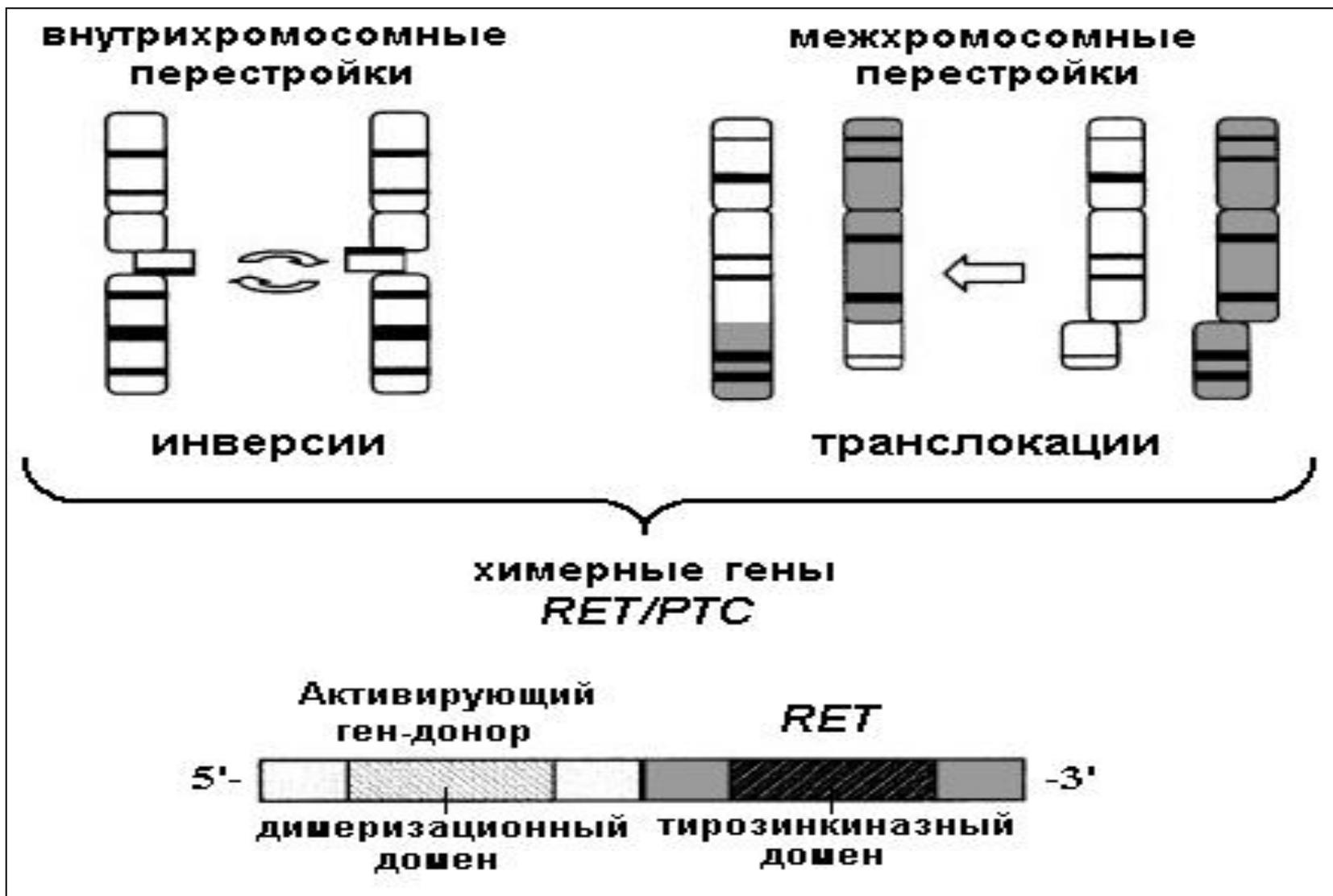
Операция

Отказ от операции

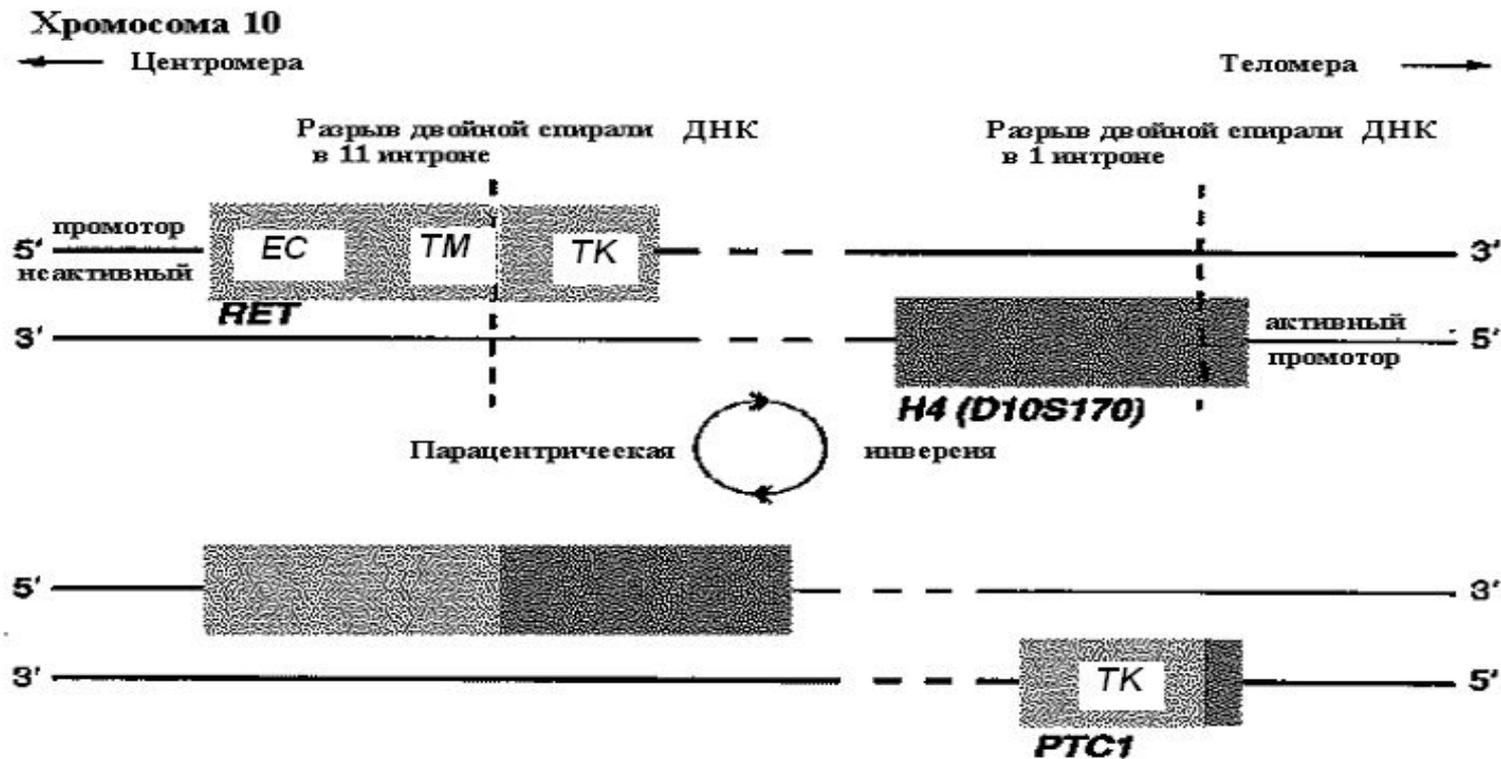
Кальцитониновый тест ежегодно

Тест отрицательный = вероятность МЭН-2 незначительна (спорадическая форма МРЩЖ)

Механизмы образования химерных генов, определяемых в папиллярном раке щитовидной железы



RET/PTC1



В результате парацентрической инверсии длинного плеча хромосомы 10, происходит слияние тирозинкиназного домена RET с 5'-последовательностью гена H4. Продуктом слияния является химерный трансформированный ген RET/PTC1. Экстрацеллюлярный домен (EC); трансмембранный домен (TM); тирозинкиназный домен (TK).

ОНКОГЕНЫ

Позитивные регуляторы, способные индуцировать деление клетки

ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ

Негативные регуляторы, препятствующие делению клетки

В нормальных тканях имеют фоновый уровень экспрессии

В норме экспрессируются почти во всех тканях

Действие проявляется в результате активации протоонкогена даже в гетерозиготном состоянии (достаточно активации одного аллеля)

Действие проявляется только при наличии повреждения обоих аллелей (полная инактивация функции)

Активация

1. Нарушение экспрессии

- гиперэкспрессия;
- эктопическая экспрессия
- производство нового химерного белка с аномальной функцией

2. Механизм

- точковая активирующая мутация
- амплификация гена
- переход гена под более активный промотор, или активация промотора старого

Инактивация

1. Мутации

гетерозиготы по мутантным аллелям генов-супрессоров имеют повышенную предрасположенность к опухолям

2. Потеря гетерозиготности

в опухолевых тканях - делеции районов локализации генов-супрессоров

3. Метилирование регуляторных районов, приводящее к отсутствию экспрессии гена

Ретинобластома



Лейкокория (белый цветовой рефлекс) в правом глазу.

Ретинобластома – злокачественная опухоль глаза, развивается преимущественно в детском возрасте из тканей эмбрионального происхождения. Пик заболевания приходится на 2 года. Почти все случаи заболевания выявляются до 5-летнего возраста. Распространенность ретинобластомы небольшая – примерно 1 случай на 20 000 новорожденных.

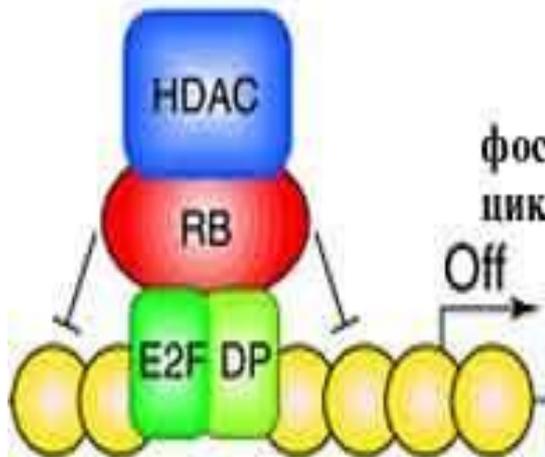
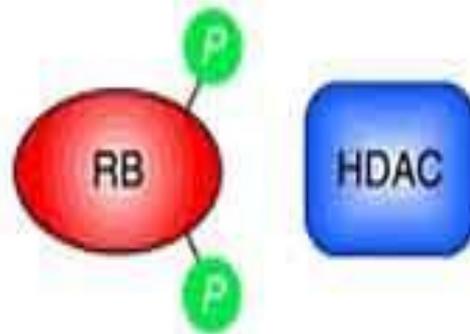
**односторонняя
двусторонняя**

**спорадическая форма
семейная форма**



Глазное дно при экзофитно растущей опухоли.

Регуляция экспрессии гена белком RB1



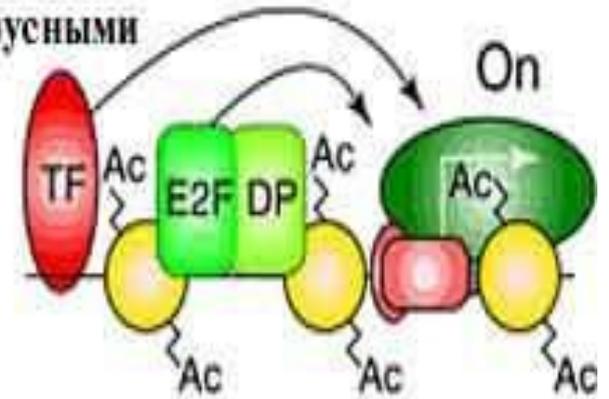
G1 фаза

фосфорилирование циклин-зависимой киназой

↑

связывание с вирусными онкопротеинами или мутации RB

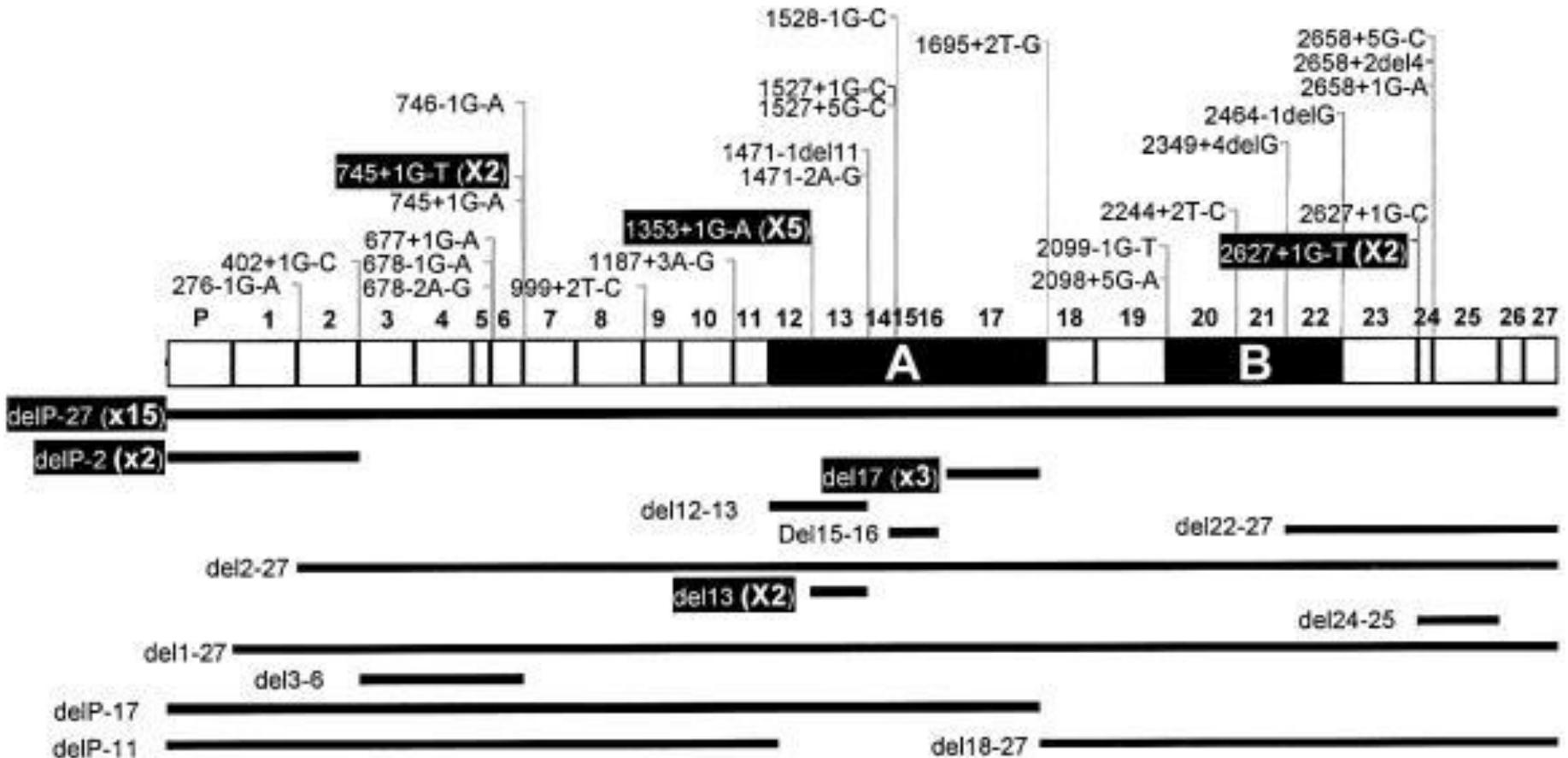
G1-S



S фаза

Ген RB1 расположен в проксимальном отделе длинного плеча хромосомы 13q14.1, и, занимает 180 т.п.н. геномной ДНК. Он включает промоторную область около 1,5 т.п.н. и состоит из 27 экзонов. Разброс размеров интронов от 80 п.н. (15 интрон) до 70,5 т.п.н. (17 интрон). Экзоны содержат от 31 нуклеотида (24 экзон) до 1889 оснований (27 экзон, содержащий стоп-кодон и сигнал к полиаденилированию). Ген кодирует мРНК длиной 4,7 тысяч нуклеотидов экспрессирующуюся в норме во всех клетках организма.

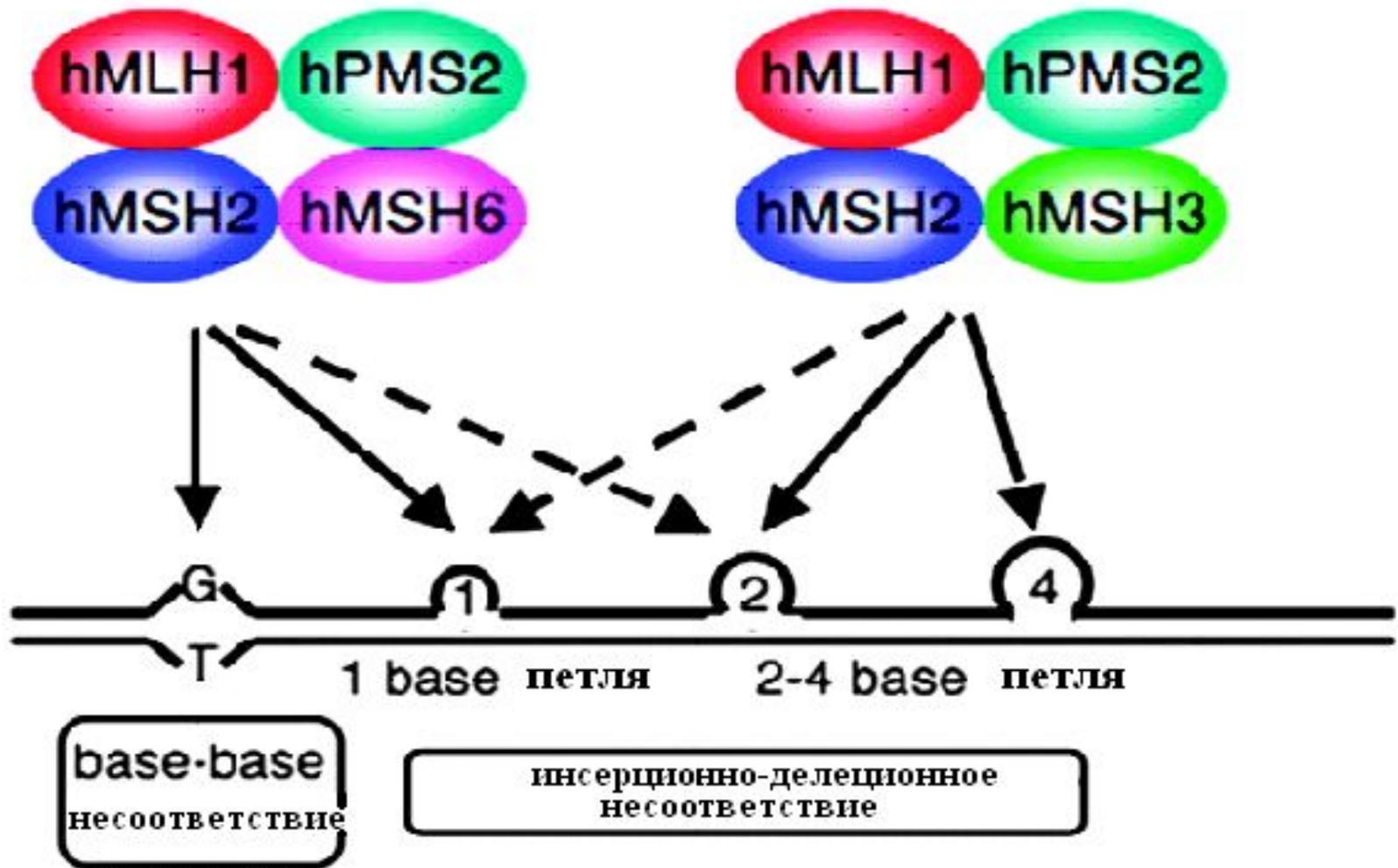
Структура гена RB1 и варианты его делеций.



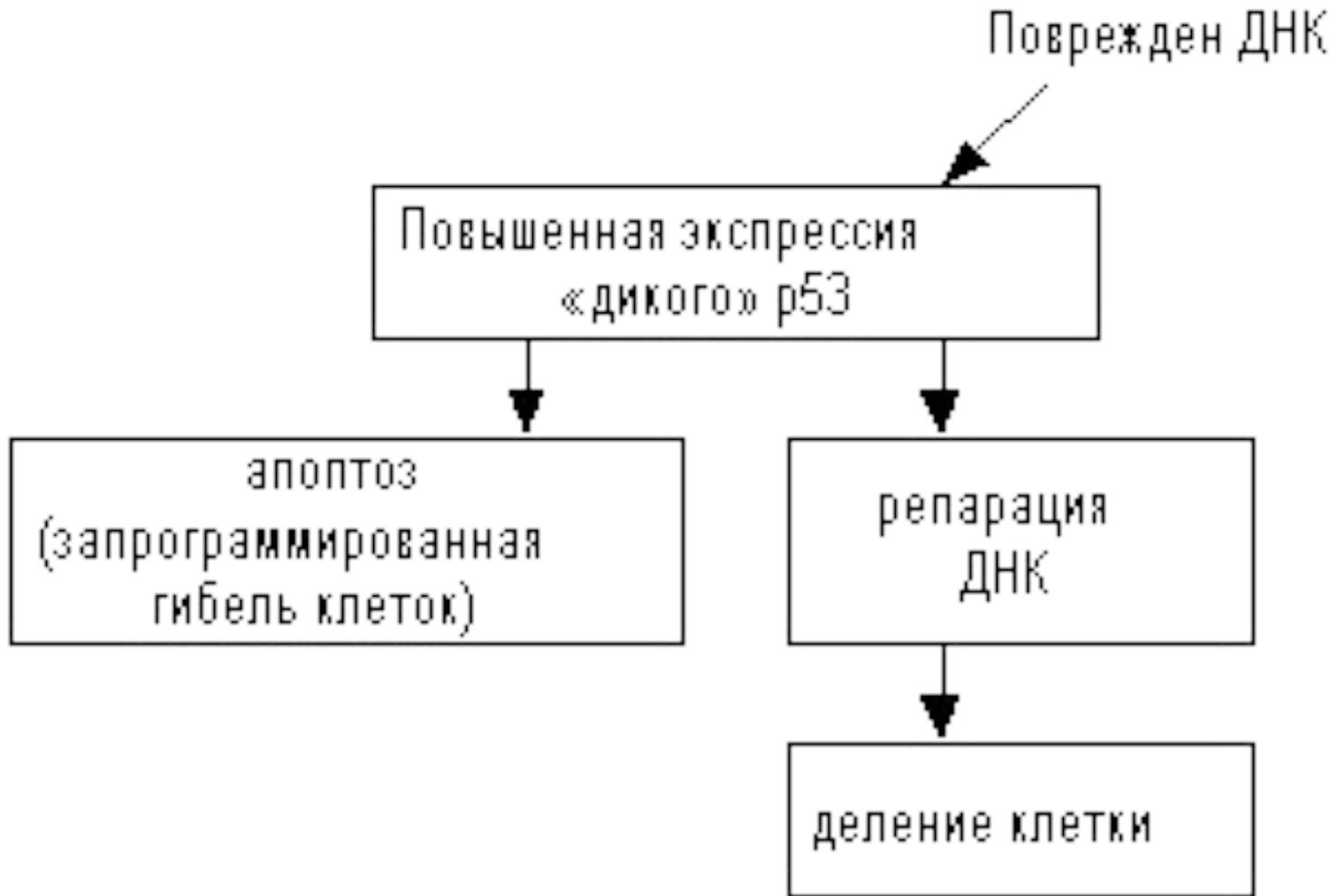


Модель репарации неспаренных оснований

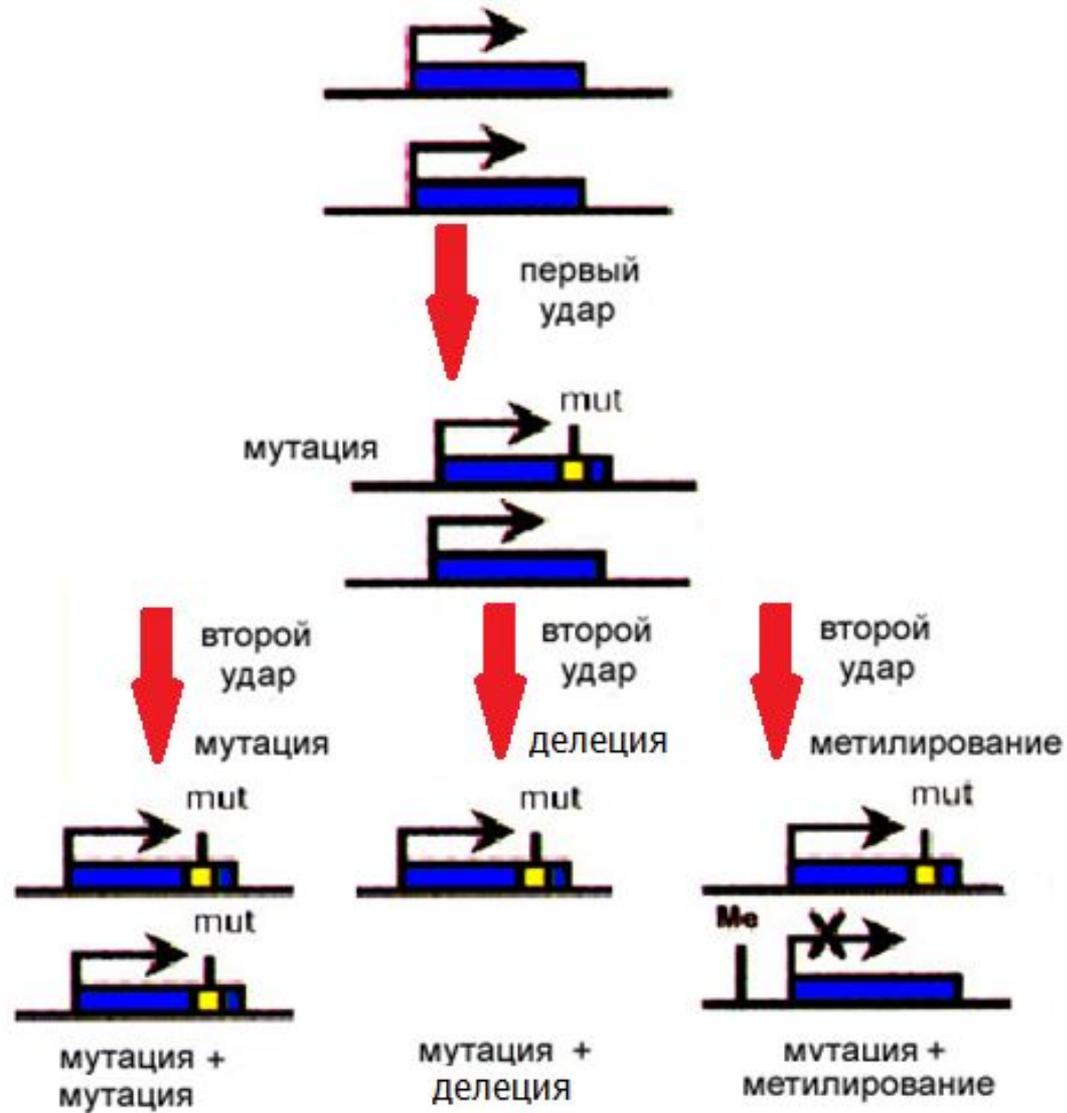
DNA mismatch repair (MMR) gene



Функция гена Р53



Современная двухударная модель канцерогенеза

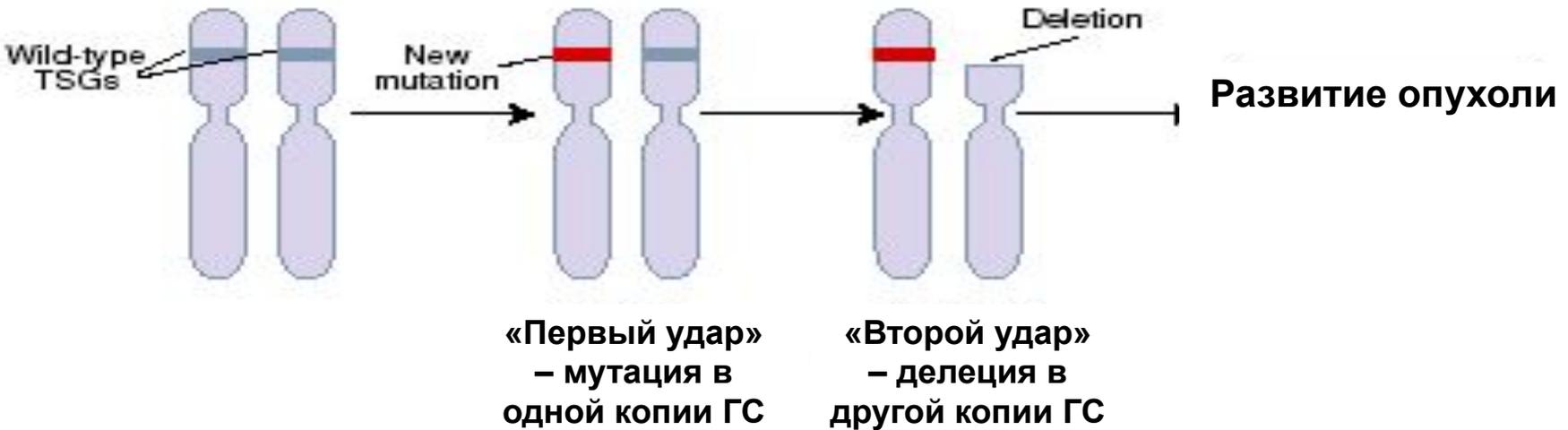


Пути инактивации генов- супрессоров опухолевого роста

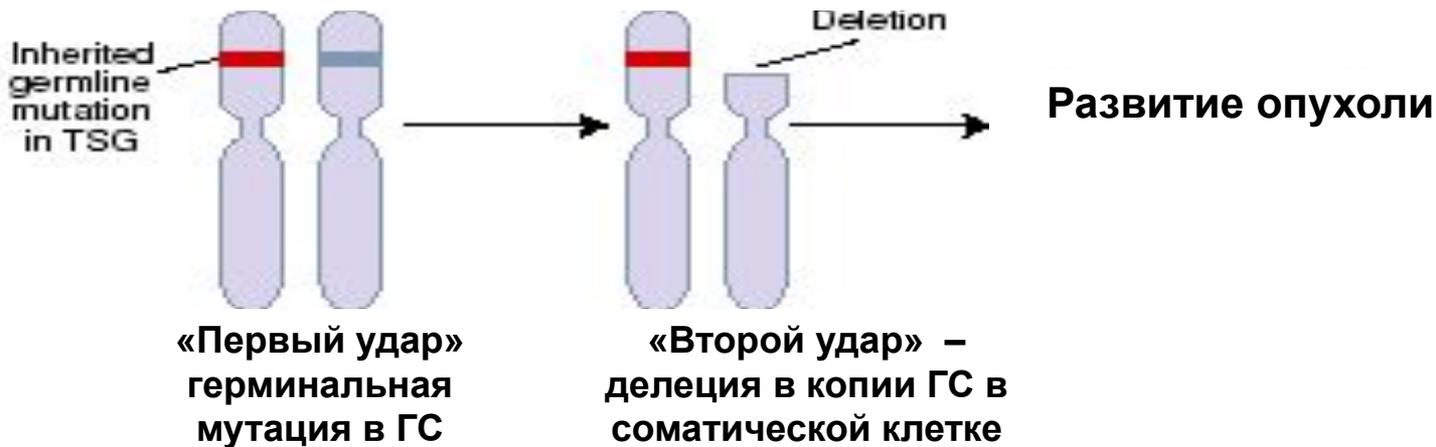
- 1) аллельные делеции районов локализации генов-супрессоров
- 2) аномальное метилирование промоторных и регуляторных элементов генов-супрессоров
- 3) инактивирующие мутации

Что такое потеря гетерозиготности?

Мутации ГС в соматических клетках приводят к спорадическим ракам

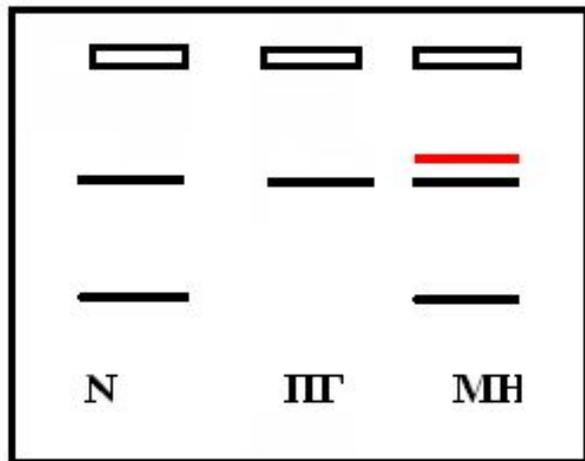
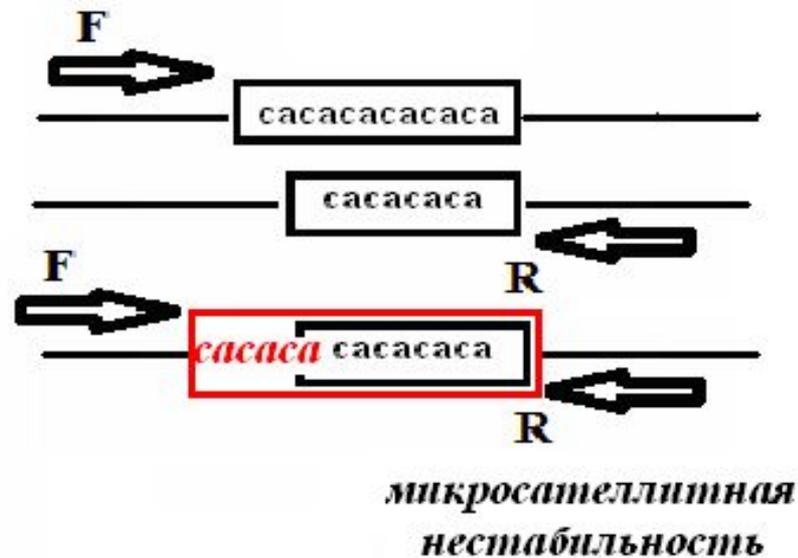
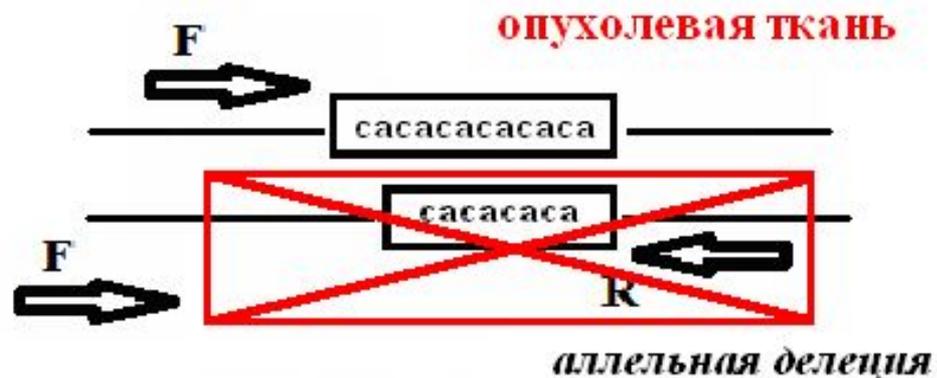


Герминальные мутации ГС в приводят к семейным ракам

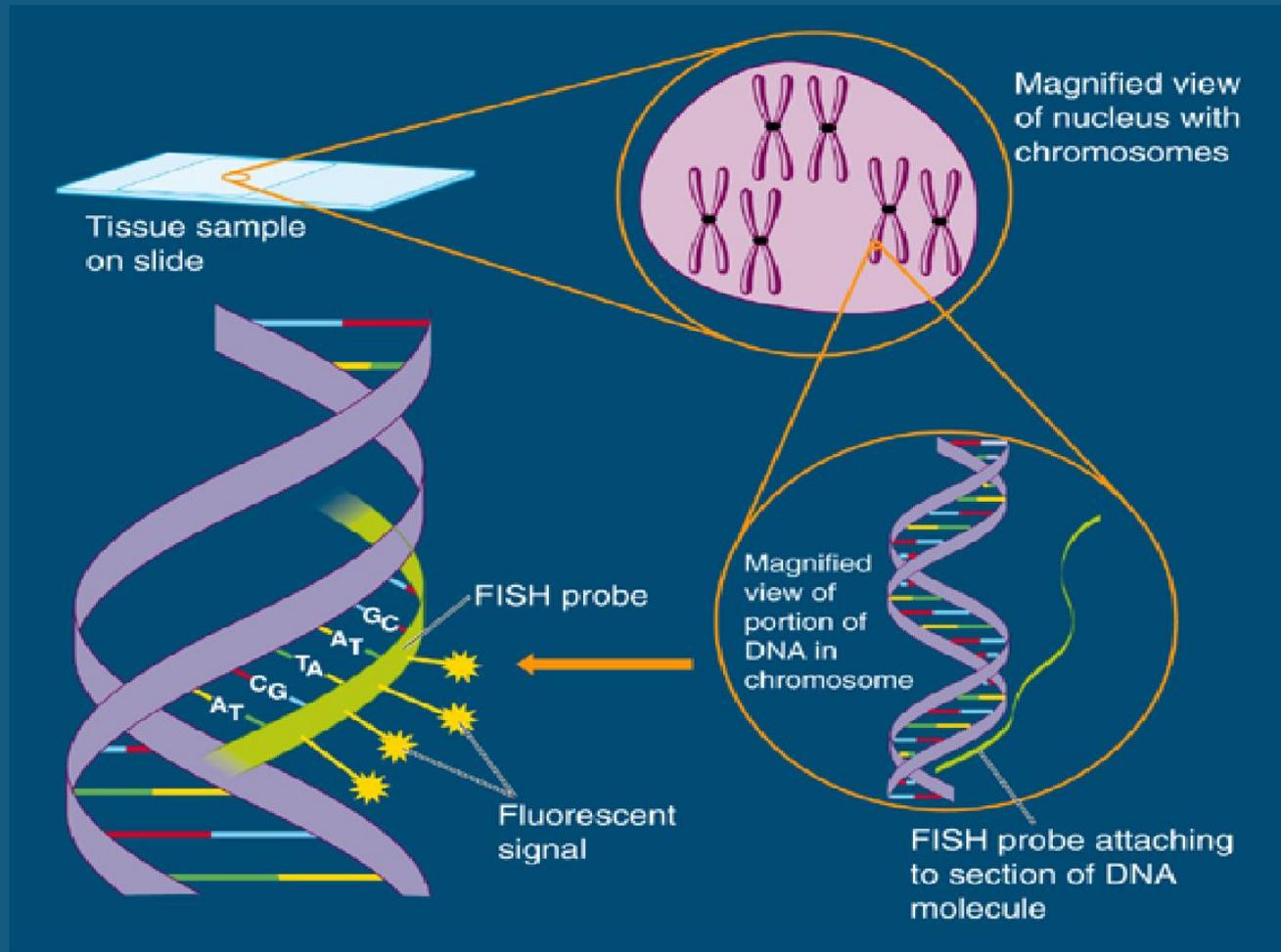


Knudson's two-hit hypothesis for tumourigenesis involving a tumour suppressor gene (TSG)

Образование аллельных делеций и микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани

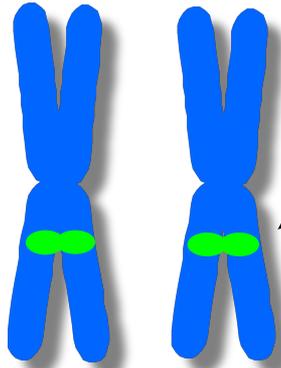


FISH – флуоресцентная гибридизация in situ

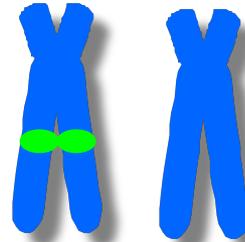


Анализ числа копий гена

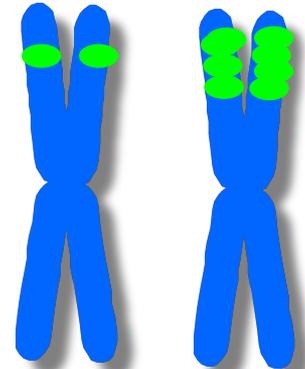
Локусный зонд LSI



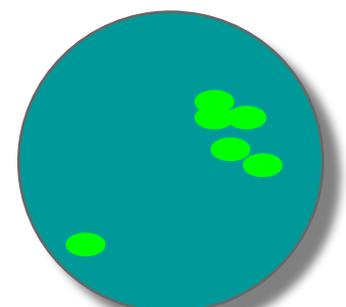
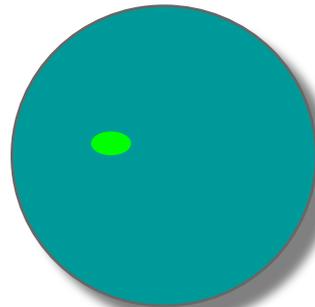
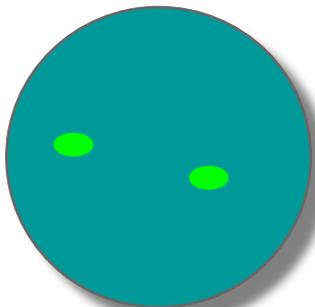
Норма



Делеция



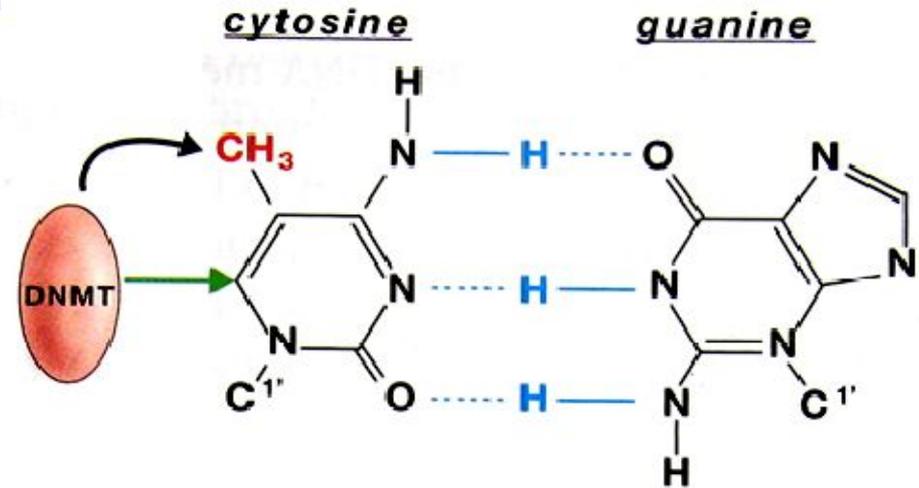
Амплификация



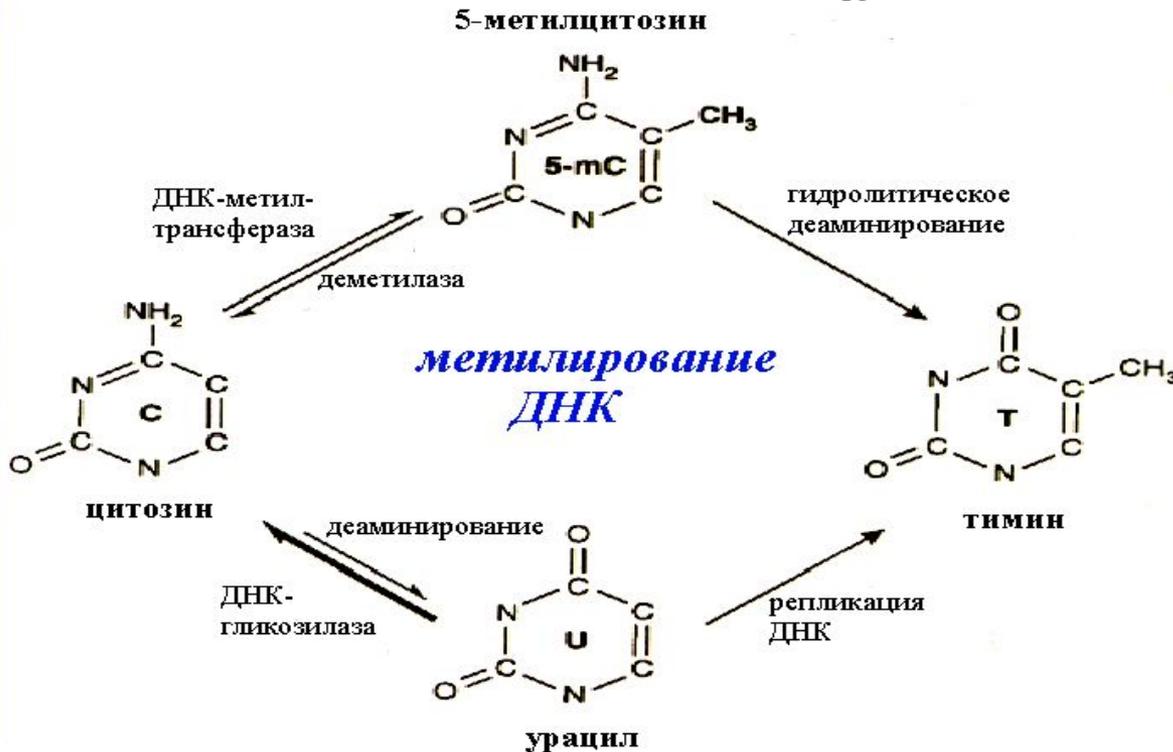
Метилирование у млекопитающих

1. Поддержание структуры хроматина и стабильности хромосом
2. Инактивация повторов и интегрированной чужеродной ДНК
3. Формирование тканеспецифичного паттерна экспрессии генов
4. Тканеспецифичное подавление генной экспрессии

a



b



Гиперметилованы:

- сателлиты и рассеянные повторы
- провирусные копии и транспозоны
- транскрипционно неактивные гены

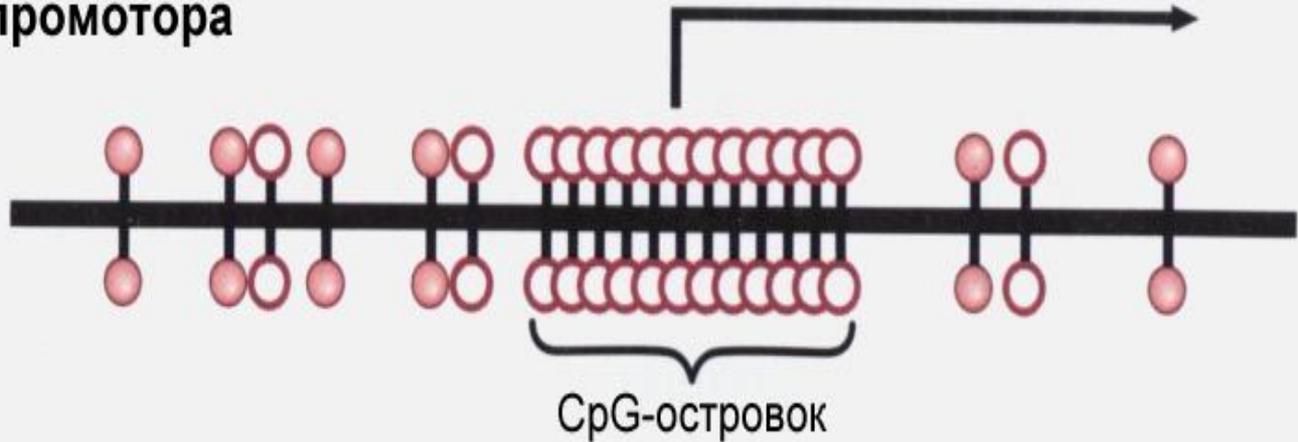
Гипометилованы:

- транскрипционно активные гены

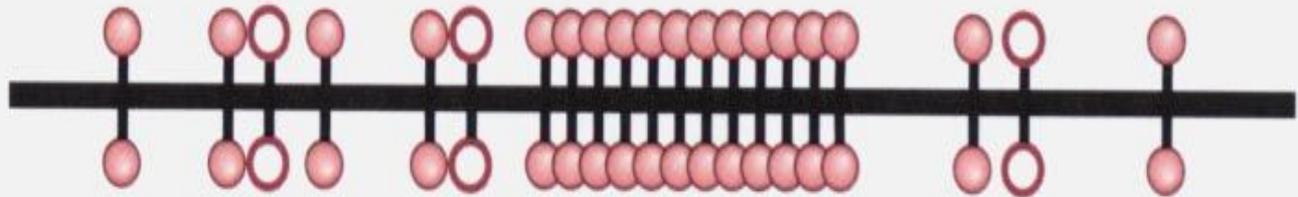
Аномальное метилирование промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста приводит к их инактивации.

СрG-островок промотора

экспрессия



инактивация

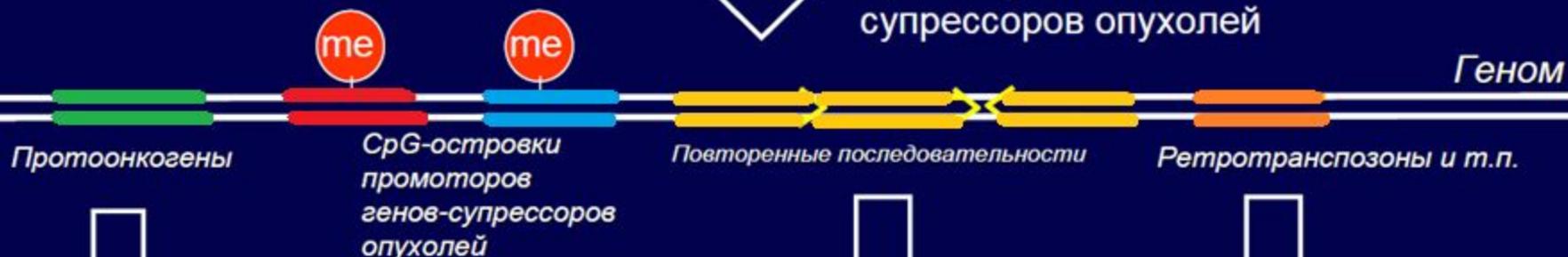


Метилирование и канцерогенез

нормальная клетка



опухолевая клетка



Активация

стимуляция роста и пролиферации

Репрессия

уход от апоптоза, изменение клеточного цикла, нарушение репарации, стимуляция инвазии и метастазирования

Активация

Высокая частота рекомбинации
Нарушения сегрегации хромосом

точковые мутации в генах

Молекулярные маркеры, определяемые на ранних стадиях канцерогенеза.

Злокачественная опухоль	Молекулярные маркеры
Рак простаты	Метилирование GSTP1
Колоректальный рак	Метилирование p16, MLH1, APC, микросателлитная нестабильность
Рак желудка	Метилирование p16, MLH1
Рак пищевода	Метилирование p16, APC, наличие HPV 16, 18
Рак мочевого пузыря	Метилирование p16, DAPK1, RAR- β
Рак печени	Метилирование p16, p15
Рак поджелудочной железы	Метилирование p16
Немелкоклеточный рак легкого	Метилирование p16, MGMT, DAPK1, мутации KRAS
Рак шейки матки	Метилирование p16, HIC1, наличие HPV 16, 18
Рак молочной железы	Метилирование p16, CCND2, TWIST, RAR- β

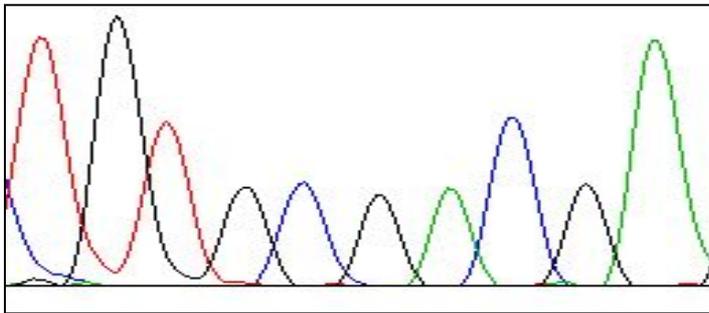
Под **мутацией** понимают все изменения в нуклеотидной последовательности ДНК, независимо от их локализации и влияния на жизнеспособность особи.

Аномалии последовательности ДНК, не приводящие к заметным нарушениям функции, рассматриваются, как нейтральные мутации или **полиморфизмы**.



Пример выявления миссенс мутации (замена аминокислот в белке) методом прямого секвенирования

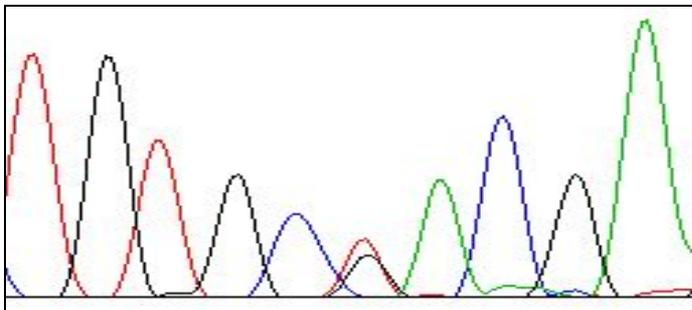
T G T G C G A C G A



Нормальная последовательность:

628	629	630	<u>631</u>	632	633	634
CCA	CTG	TGC	<u>GAC</u>	GAG	CTG	TGC
Pro	Leu	Cys	<u>Asp</u>	Glu	Leu	Cys

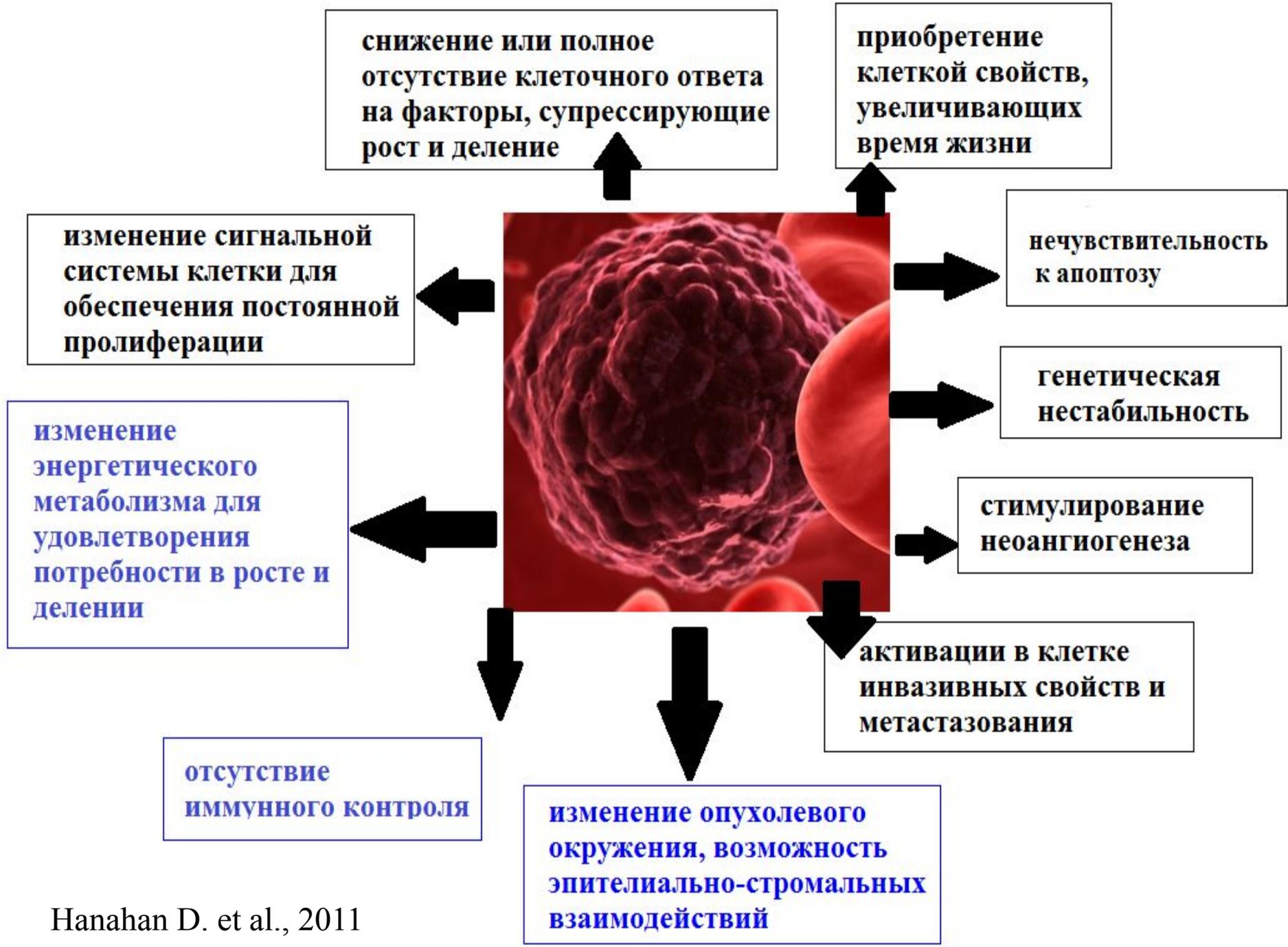
T G T G C N A C G A



Мутантная последовательность:

628	629	630	<u>631</u>	632	633	634
CCA	CTG	TGC	<u>TAC</u>	GAG	CTG	TGC
Pro	Leu	Cys	<u>Tyr</u>	Glu	Leu	Cys

<p style="text-align: center;">ОНКОГЕНЫ</p> <p>Позитивные регуляторы, способные индуцировать деление клетки в отсутствие внешнего стимула</p>	<p style="text-align: center;">ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ</p> <p>Негативные регуляторы, препятствующие делению клетки</p>
<p>В нормальных тканях имеют фоновый уровень экспрессии в качестве протоонкогенов</p>	<p>В норме экспрессируются почти во всех тканях</p>
<p>Действие проявляется в результате активации протоонкогена даже в гетерозиготном состоянии (достаточно активации одного аллеля)</p>	<p>Действие проявляется только при наличии повреждения обоих аллелей (полная инактивация функции)</p>
<p style="text-align: center;">АКТИВАЦИЯ</p> <p>Нарушение экспрессии по типу гиперэкспрессии или эктопической экспрессии («не в то время, и не в том месте»)</p> <p>Механизм</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ точковая активирующая мутация ➤ амплификация гена ➤ переход гена под более активный регулятор, или активация промотора старого 	<p style="text-align: center;">ИНАКТИВАЦИЯ</p> <p>Нарушение экспрессии по типу отсутствия или снижения</p> <p>Механизм</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Мутации - гетерозиготы по мутантным аллелям генов-супрессоров имеют повышенную предрасположенность к опухолям ➤ Делеции в опухолевых тканях районов локализации генов-супрессоров ➤ Гиперметилирование регуляторных районов



В норме активные процессы ангиогенеза (формирования новых кровеносных сосудов) отмечаются только в период формирования эмбриона, а потребности в них взрослого организма ограничиваются лишь определенными ситуациями (беременность, заживление ран).

В здоровом взрослом организме лишь 0,01% эндотелиальных клеток находится в состоянии деления, в среднем происходит одно деление в 10 лет.

Инвазия и метастазирование опухоли



1. Наиболее сильным стимулятором опухолевого ангиогенеза является **ГИПОКСИЯ**, которую постоянно испытывают клетки растущего новообразования, находясь в условиях недостаточного кровоснабжения.

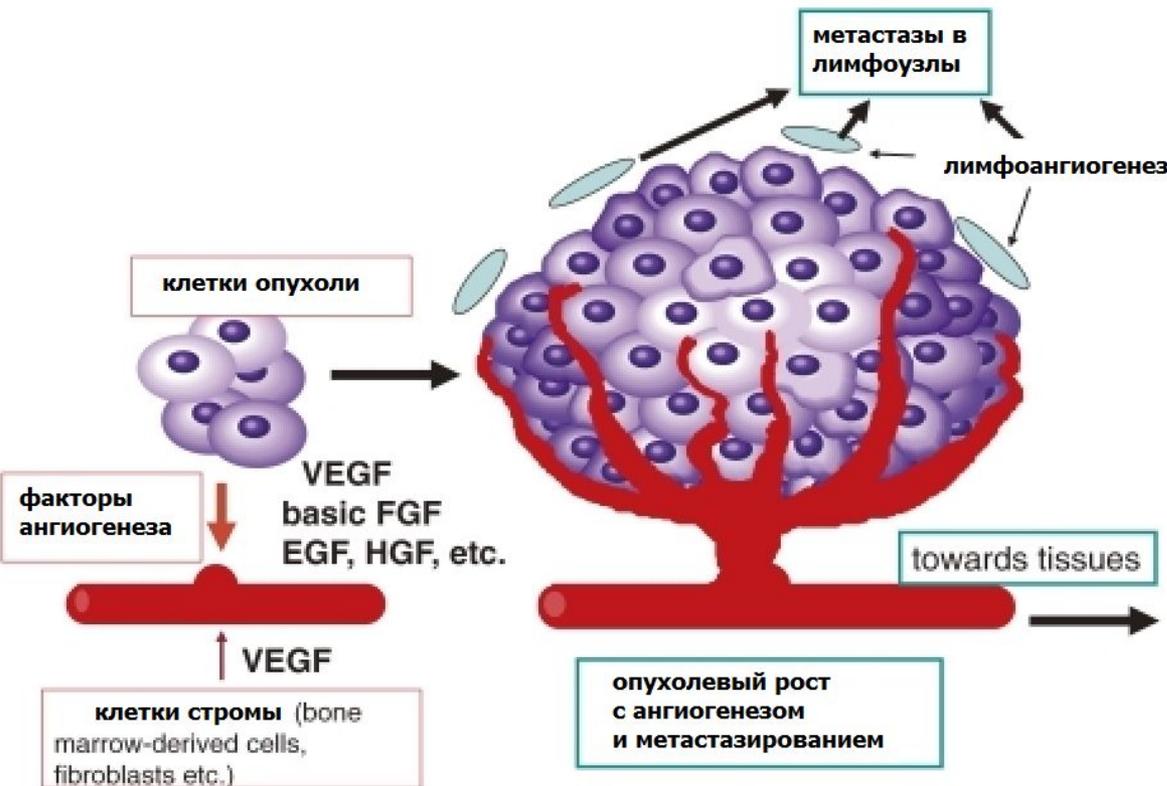
2. Способностью стимулировать ангиогенез обладают и различные вещества: **VEGF-вакculo эндотелиальный фактор роста** ; фактор роста, выделяемый тромбоцитами (**PDGF**); фактор роста фибробластов (**FGF-1, FGF-2**); ангиопоэтин-1 (**ang-1**) и т.д., которые могут вырабатываться опухолевыми клетками, клетками стромы и эндотелия, а также экстрацеллюлярным матриксом

Опухолевый ангиогенез

Ангиогенез важен для роста и распространения опухоли. Опухоли способны индуцировать пролиферацию проксимальных капилляров. Новые сосуды возникают, в основном, из

Индукторы

Ростовые факторы
FGF
VEGF
HGF
TGF β
TNF
IL-1, 4, 6, 8
Ангиогенин
Простагландины E₁, E₂
Активаторы плазминогена
Эстроген
Ангиотензин
Субстанция P
Липополисахарид
Тимидинфосфорилаза (эндотелиальный
ростовой фактор тромбоцитов)
E- и P-селектины
Ганглиозид GD3
Полиамины
Катепсин B
Молекулы клеточной адгезии
Рецепторы интегринов



- В маленькие опухоли питательные вещества и кислород поступают путем диффузии или через соседние капилляры.
- Клетки опухолей более крупного размера приобретают способность к сосудодообразованию и выделяют фактор, потенцирующий вращание капилляров в опухолевую ткань из прилежащей сохранной ткани. Этот полипептид называется **фактором Фолькмана**.
- Процесс опухолевого ангиогенеза происходит в условиях взаимодействия между опухолевыми клетками, эндотелиальными клетками и экстрацеллюлярным матриксом.

Выделяют три этапа опухолевого ангиогенеза:

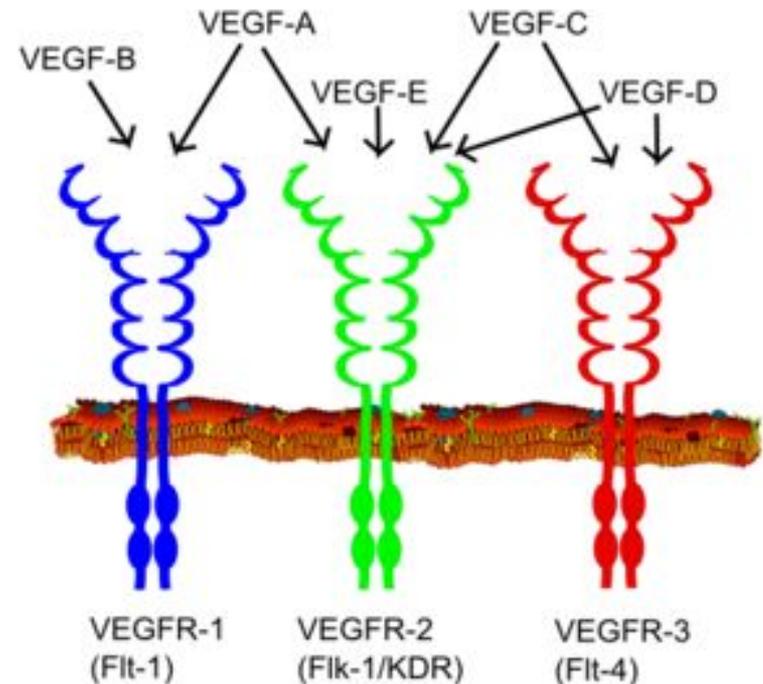
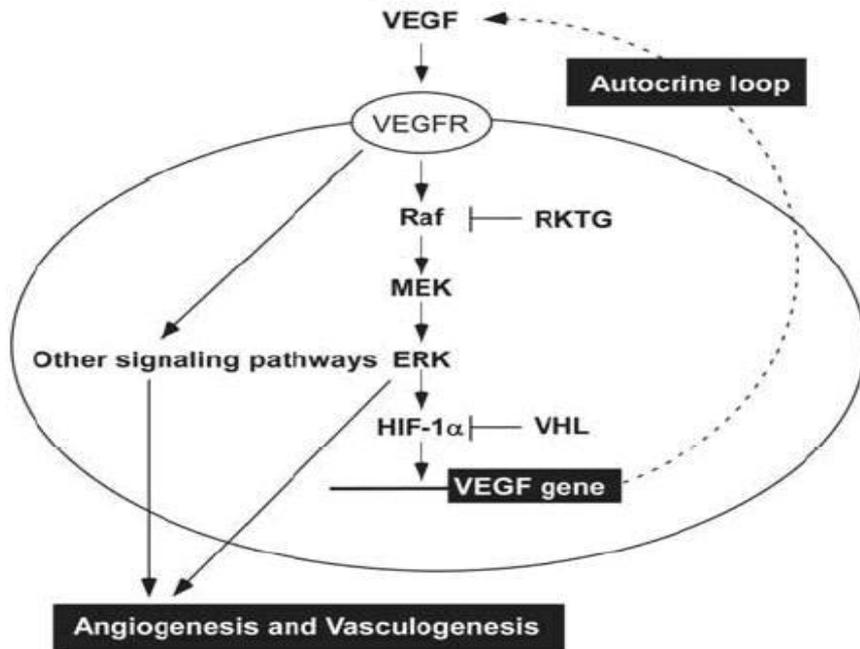
1. пролиферацию эндотелиальных клеток;
2. разрушение окружающего экстрацеллюлярного матрикса;
3. миграцию эндотелиальных клеток.

Ангиогенез в опухоли происходит на фоне измененного экстрацеллюлярного матрикса в условиях нарушенных межклеточных и паренхиматозно-стромальных взаимоотношений. Это приводит к развитию **неполноценных сосудов преимущественно капиллярного типа, часто имеющих прерывистую базальную мембрану с нарушенной эндотелиальной выстилкой.**

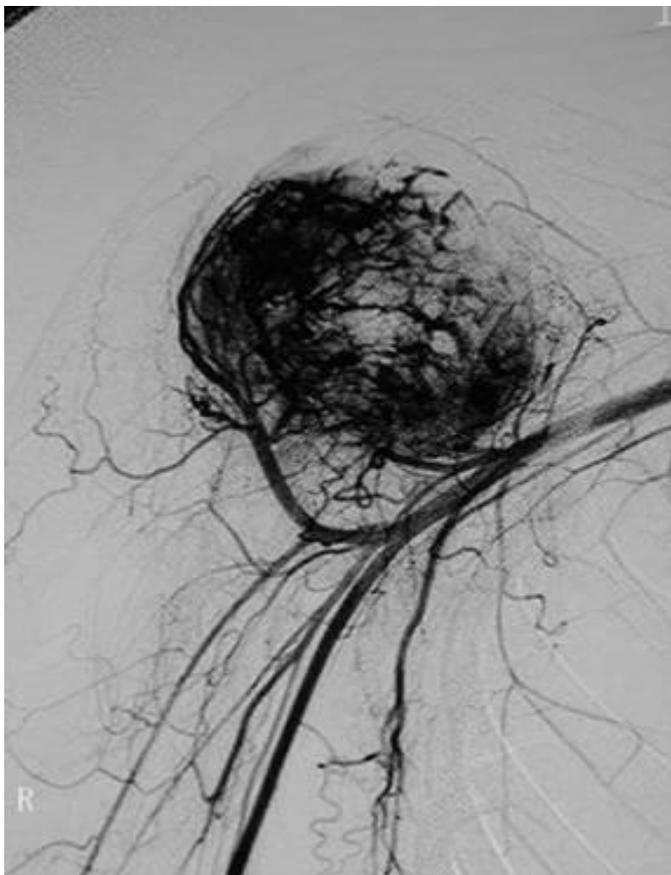
VEGF

Эндотелиальный сосудистый фактор роста (VEGF – vascular endothelial growth factor) – основной индуктор пролиферации эндотелиальных клеток.

Идентифицированы 4 изоформы VEGF, которые кодируются одним геном *VEGF*: VEGF121, VEGF165, VEGF180 и VEGF206. Основная изоформа – VEGF121. VEGF взаимодействует с рецепторами трех типов VEGFR1-3.



Гиперваскуляризация – диагностический признак злокачественных опухолей



Злокачественная
гигантоклеточная
опухоль
проксимального отдела
правой плечевой кости.



НОВОСТИ ЛУЧЕВОЙ ДИАГНОСТИКИ

Закономерности между ангиографической семиотикой почечно-клеточного рака и морфологическим строением опухоли.

Акинфеев В. В.

Рис. 2. Рак правой почки. T1 N0 M0. Гиперваскулярная опухоль округлой формы с чётким контуром в форме «пылающего» шара. Выступает за пределы контура почки менее чем на 1 см.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

