

ОНКОГЕНЕТИКА

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ

Гилязова Ирина Ришатовна
к.б.н.

ОНКОГЕНЕТИКА



направление генетики, изучающее причины и законы возникновения и функционирования опухоли.

ОПУХОЛИ



Доброкачественные:

- Экспансивный медленный рост;
- Не прорастают в окружающие ткани;
- Имеют капсулу, отграничивающую опухоль от окружающих тканей;
- По гистологическому строению мало отличаются от тканей, из которых они произошли;
- Не метастазируют;
- Не рецидивируют после радикального удаления;
- Не влияют на общее состояние организма.

Злокачественные:

- Быстрый инфильтративный рост с прорастанием в окружающие ткани;
- Метастазируют;
- Рецидивируют;
- Вызывают интоксикацию.

ОПУХОЛЬ



Новообразование, неоплазма - патологическое образование, характеризующееся неконтролируемым размножением клеток с нарушением их роста и дифференцировки, обусловленным изменением их генетического аппарата.

Опухоли

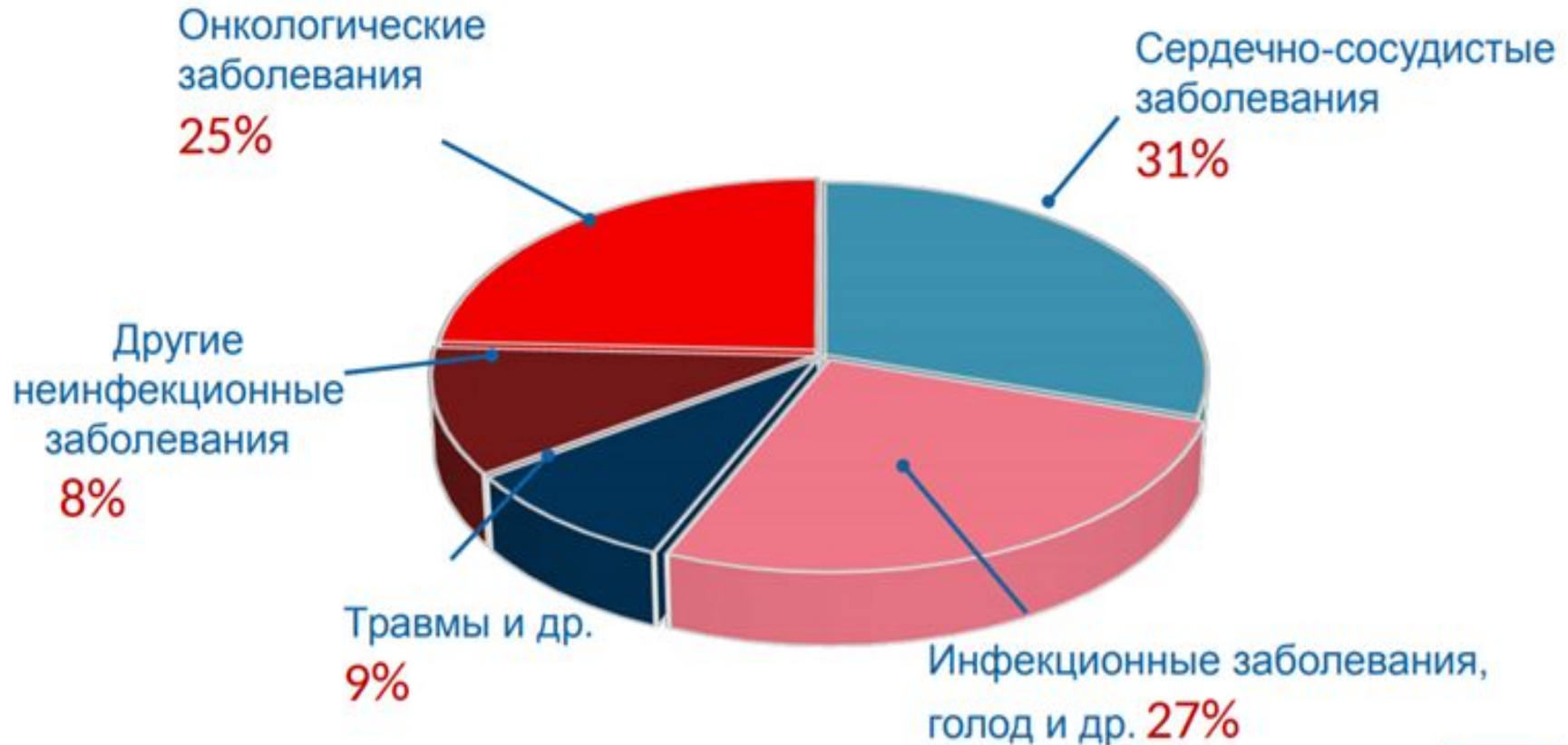


- **Саркомы** (опухоль возникает в мезенхимальной ткани, например в костях, мышцах, соединительной ткани или в тканях нервной системы)
- **Карциномы** (опухоль возникает в эпителиальной ткани - в эпителии клеток кишечника, бронхов или протоках молочных желез)
- **Злокачественные неоплазии гемopoэтической и лимфоидной ткани** (лейкозы и лимфомы, захватывающие костный мозг, лимфатическую систему и

Основные причины смерти в популяции (по данным ВОЗ)



ТРЕНД: Сердечно-сосудистые, онкологические и другие хронические неинфекционные заболевания – ведущая причина смерти и инвалидизации



КАНЦЕРОГЕНЫ



- **физические**

- ультрафиолетовое и ионизирующее излучение;

- **химические**

- асбест,
- компоненты табачного дыма,
- афлатоксины (загрязнители пищевых продуктов)
- мышьяк (загрязнитель питьевой воды);

- **биологические**

- вирусы
- бактерии
- паразиты

КАНЦЕРОГЕНЕЗ



Канцерогенез — сложный патофизиологический процесс зарождения и развития опухоли. (син. онкогенез).

Канцерогенез — сложный многоэтапный процесс, ведущий к глубокой опухолевой реорганизации нормальных клеток организма.

Из всех предложенных к настоящему моменту теорий канцерогенеза, **мутационная теория** заслуживает наибольшего внимания. Согласно этой теории, опухоли являются генетическими заболеваниями, патогенетическим субстратом которых является повреждение генетического материала клетки (точечные мутации, хромосомные aberrации и т. п.). Повреждение специфических участков ДНК приводит к нарушению механизмов контроля за пролиферацией и дифференцировкой клеток и, в конце концов, к возникновению опухоли.

Генетические аспекты канцерогенеза



- Генетический аппарат клеток обладает сложной системой контроля деления, роста и дифференцировки клеток
- **Протоонкогены**
- Протоонкогены это группа нормальных генов клетки, оказывающих стимулирующее влияние на процессы клеточного деления, посредством специфических продуктов их экспрессии.
- Превращение **протоонкогена в онкоген** (ген, определяющий опухолевые свойства клеток) является одним из механизмов возникновения опухолевых клеток.
- Это может произойти в результате мутации протоонкогена с изменением структуры специфического продукта экспрессии гена, либо же повышением уровня экспрессии протоонкогена при мутации его регулирующей последовательности (**точечная мутация**) или при переносе гена в активно транскрибируемую область хромосомы (**хромосомные aberrации**).

Генетические аспекты канцерогенеза

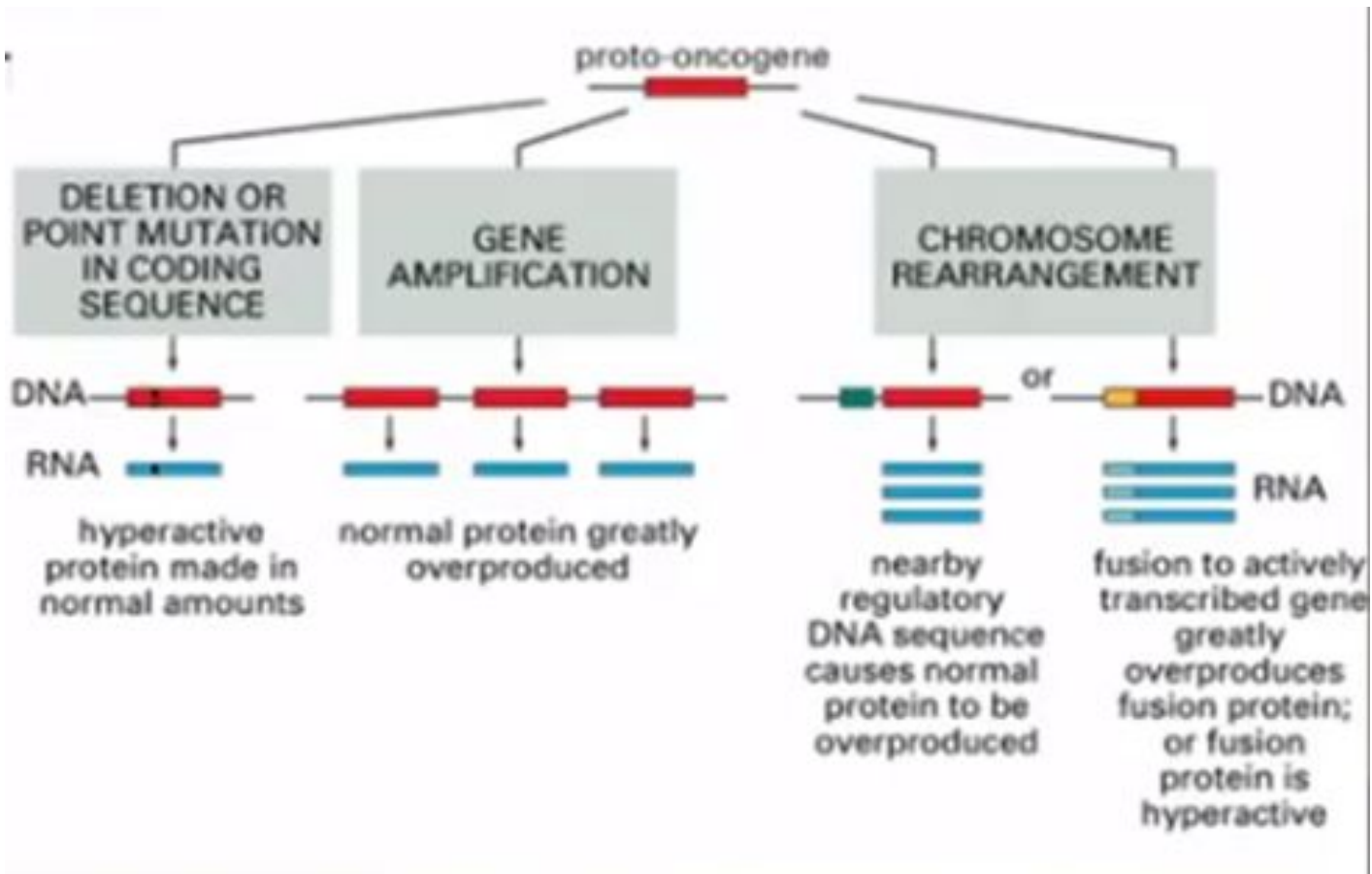


- **Гены-супрессоры опухолей**
- Функции **генов-супрессоров** противоположны функциям **протоонкогенов**. **Гены-супрессоры** оказывают тормозящее влияние на процессы клеточного деления и выхода из дифференцировки. Доказано, что в ряде случаев инактивация генов-супрессоров с исчезновением их антагонистического влияния по отношению к протоонкогенам ведет к развитию некоторых онкологических заболеваний.
- Таким образом, система **протоонкогенов** и **генов-супрессоров** формирует сложный механизм контроля темпов клеточного деления, роста и дифференцировки. Нарушения этого механизма возможны как под влиянием факторов внешней среды, так и в связи с геномной нестабильностью — теория, предложенная *Кристофом Лингауром* и *Бертом Фогельштейном*.
- По мнению некоторых ученых, ещё одной причиной возникновения опухолей мог бы быть врождённый или приобретённый дефект систем репарации клеточной ДНК. В здоровых клетках процесс репликации (удвоения) ДНК протекает с большой точностью благодаря функционированию специальной системы исправления пострепликационных ошибок. В геноме человека изучено, по крайней мере, 6 генов, участвующих в репарации ДНК. Повреждение этих генов влечёт за собой нарушение функции всей системы репарации, и, следовательно, значительное увеличение уровня пострепликационных ошибок, то есть мутаций (*Lawrence A. Loeb*).

Онкогены – мутировавшие протоонкогены



-Протоонкогены – в нормальных клетках стимулируют клеточное деление
Примеры.

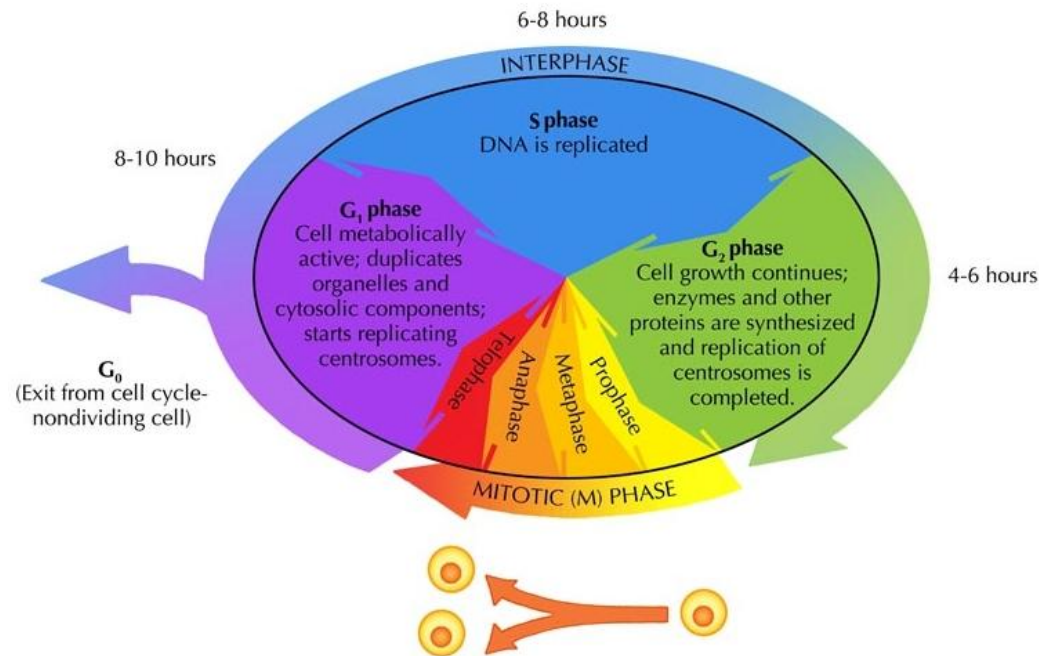


Протоонкогены	Опухолевые супрессоры (антионкогены)
<p>Являются регуляторами процессов роста, дифференцировки и размножения клеток . Позитивные регуляторы, способные индуцировать деление клетки</p>	<p>Ингибируют деление клеток. Негативные регуляторы, препятствующие делению клетки</p>
<p>В нормальных тканях имеют фоновый уровень экспрессии.</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>Активация</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Нарушение экспрессии <ul style="list-style-type: none"> - гиперэкспрессия; - эктопическая экспрессия - производство нового химерного белка с аномальной функцией 2. Механизм <ul style="list-style-type: none"> -- точковая активирующая мутация - амплификация гена - переход гена под более активный промотор, или активация промотора старого 	<p>Инактивация</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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

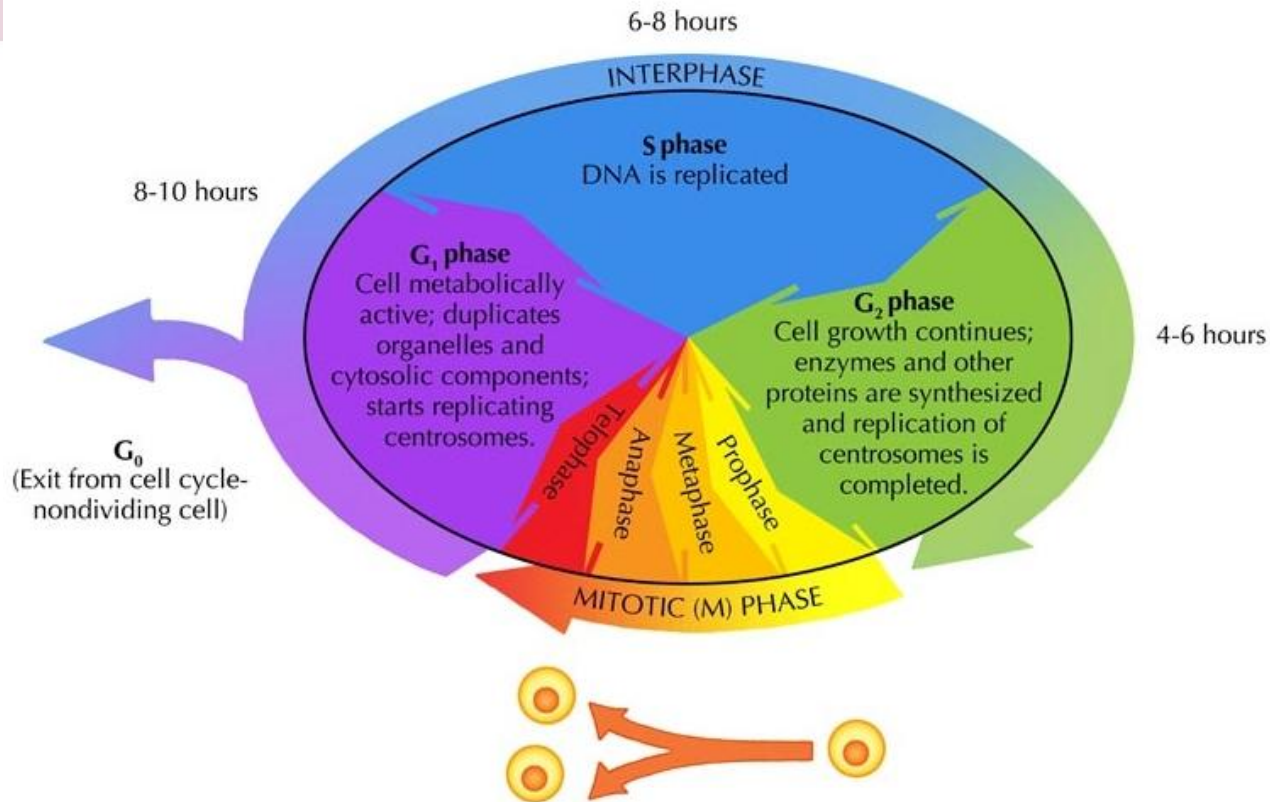
Опухолевые супрессоры



- **Gatekeepers (хранители клеточного цикла)**
 - Контролируют клеточный рост и деление, останавливая клеточный цикл, вызывают апоптоз
 - Примеры: p53, RB1, APC, PTEN
- **Gatetakers (гены общего контроля)**
 - Связаны с репарацией ДНК, поломка ведет к накоплению мутаций
 - Примеры: BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH1



Клеточный цикл



G₁ – пресинтетический период
S – синтетический период
G₂ – постсинтетический период

Автокаталитическая
интерфаза

Митотическая активность клеток различных тканей



1. Постоянно делящиеся в обновляющихся тканях (клетки базального слоя покровного эпителия, в том числе эпителия ротовой полости, клетки эпителия кишечника, кроветворные клетки костного мозга, рыхлая и плотная соединительная ткани).
2. Не размножающиеся в обычных условиях, но делящиеся при процессах репаративной регенерации или в культуре (клетки печени, лейкоциты).
3. Утратившие способность делиться (нейроны, эритроциты, мышечные).

АПОПТОЗ



генетически запрограммированная гибель клеток многоклеточного организма.

Роль апоптоза:

- необходим для нормального формирования органов в онтогенезе,
- контролирует число клеток,
- обеспечивает ликвидацию клеток с нарушениями структуры или функции генетического аппарата,
- обеспечивает аутопрофилактику онкологических заболеваний.

АПОПТОЗ



В норме апоптоз начинается с активации так называемых **«рецепторов смерти»** на поверхности мембраны клетки путем присоединения к ним специальных молекул, например, фактора некроза опухолей **TNF** (tumor necrosis factor).

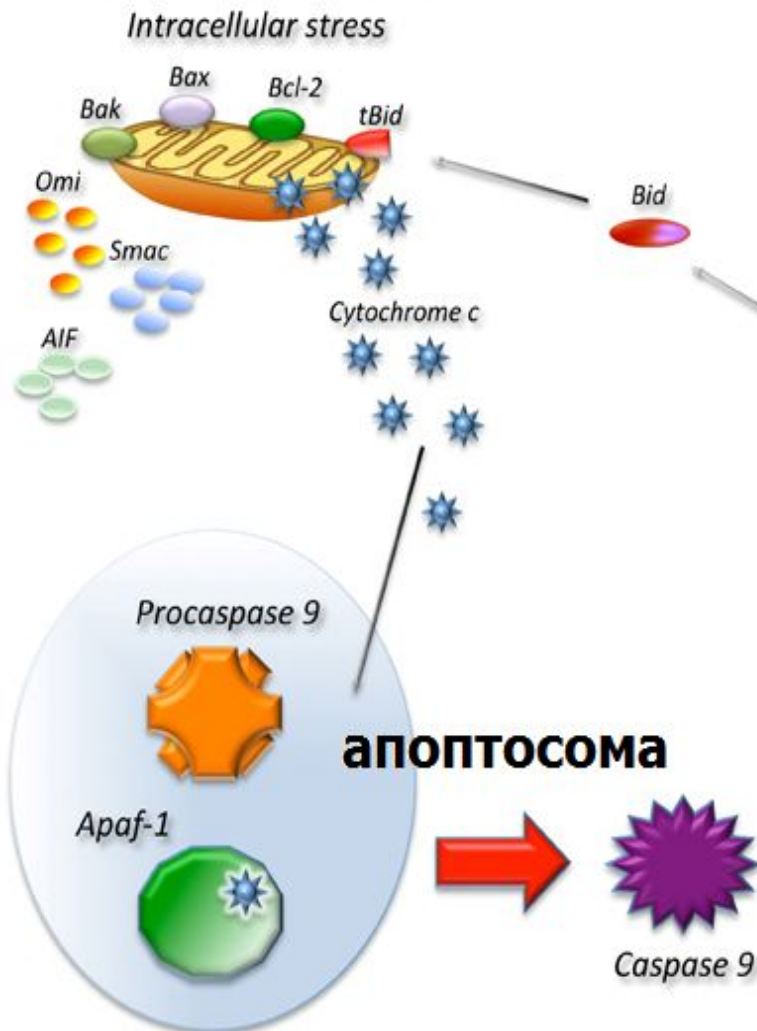
Сигналы выживания от окружения клетки и от внутренних сенсоров, контролирующих целостность клетки, в норме поддерживают механизм **апоптоза** в состоянии готовности.

Если клетка теряет контакт с окружением или в ней происходит невозстановимое внутреннее повреждение, клетка входит в **апоптоз**. Клетки, которые одновременно получают конфликтующие сигналы о продолжении или прекращении цикла деления также переходят в **апоптоз**.

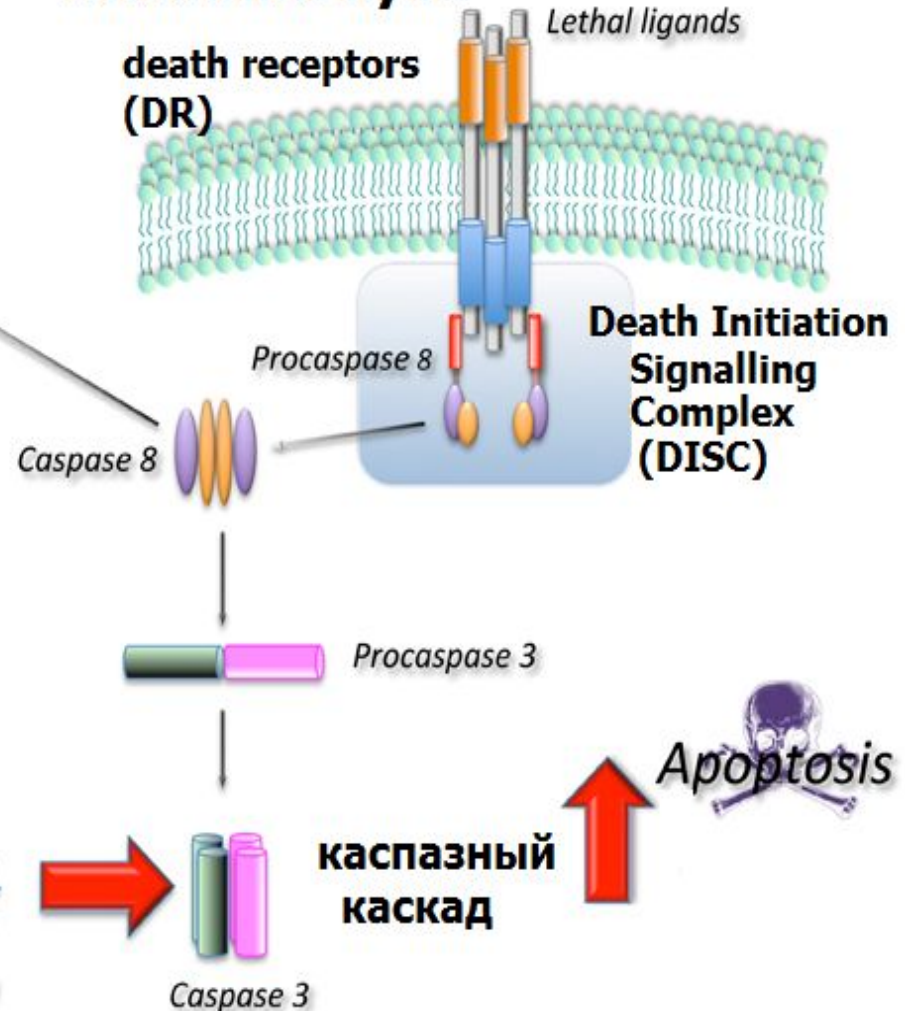
Индукция апоптоза



внутренний путь



внешний путь



Внешний путь активации апоптоза



Внешний путь начинается со связывания CD95 со своим лигандом, CD95L. В результате этого происходит димеризация рецептора и, соответственно, его цитоплазматических *доменов смерти*, которые активируют внутриклеточный адаптерный белок FADD. Этот белок активирует прокаспазу 8, которая формирует смерть-индуцирующий сигнальный комплекс (DISC). Прокаспаза 8 активируется путем расщепления на более мелкие субъединицы, высвобождая каспазу 8. Каспаза 8 затем активирует другие каспазы, такие как каспаза 3 (*исполняющая каспаза*), которая расщепляет ДНК и другие субстраты, вызывая гибель клетки.

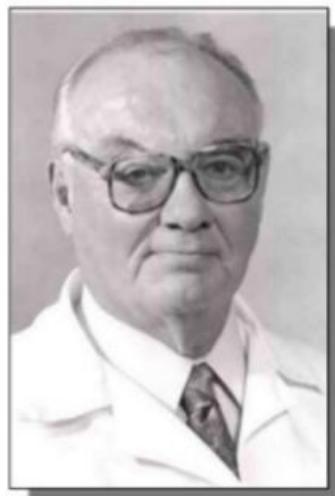
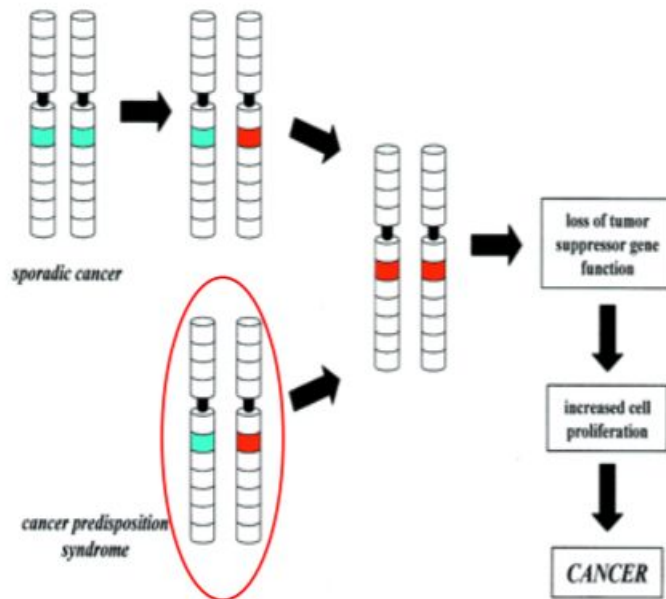
Внутренний путь активации апоптоза



Внутренний путь апоптоза запускается различными воздействиями (**отсутствие ростовых факторов, стресс и повреждение**). Активация этого пути ведет к **повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий** с последующим **выходом цитохрома С**, который инициирует апоптоз.

Целостность митохондриальной мембраны регулируется про- и антиапоптотическими белками семейства BCL2. Активность проапоптотических белков, BAX и BAK ингибируется антиапоптотическими белками семейства BCL2 и BCL-XL. Третья группа белков (т.н. BH3-only белки: BAD, BID и PUMA) регулируют баланс между про- и антиапоптотическими членами семейства BCL2. BH3-only белки стимулируют апоптоз, нейтрализуя действие антиапоптотических белков (BCL2, BCL-XL). Когда суммарный эффект всех экспрессируемых белков BH3 «перекрывает» антиапоптотическое действие белков BCL2/BCL-XL, белки BAX и BAK активируются и формируют поры в митохондриальной мембране. Цитохром С выходит в цитозоль, где

Альфред Кнудсон- автор «двухударной модели канцерогенеза» (1971 г.) на примере ретинобластомы 40% -наследственные формы



Dr Henry T Lynch
(1928 -)

Генри Линч – Аутосомно-доминантный тип наследования РМЖ и РЯ

Surq Gynecol Obstet. 1971 Oct;133(4):644-8.

Carcinoma of the breast and ovary in three families.

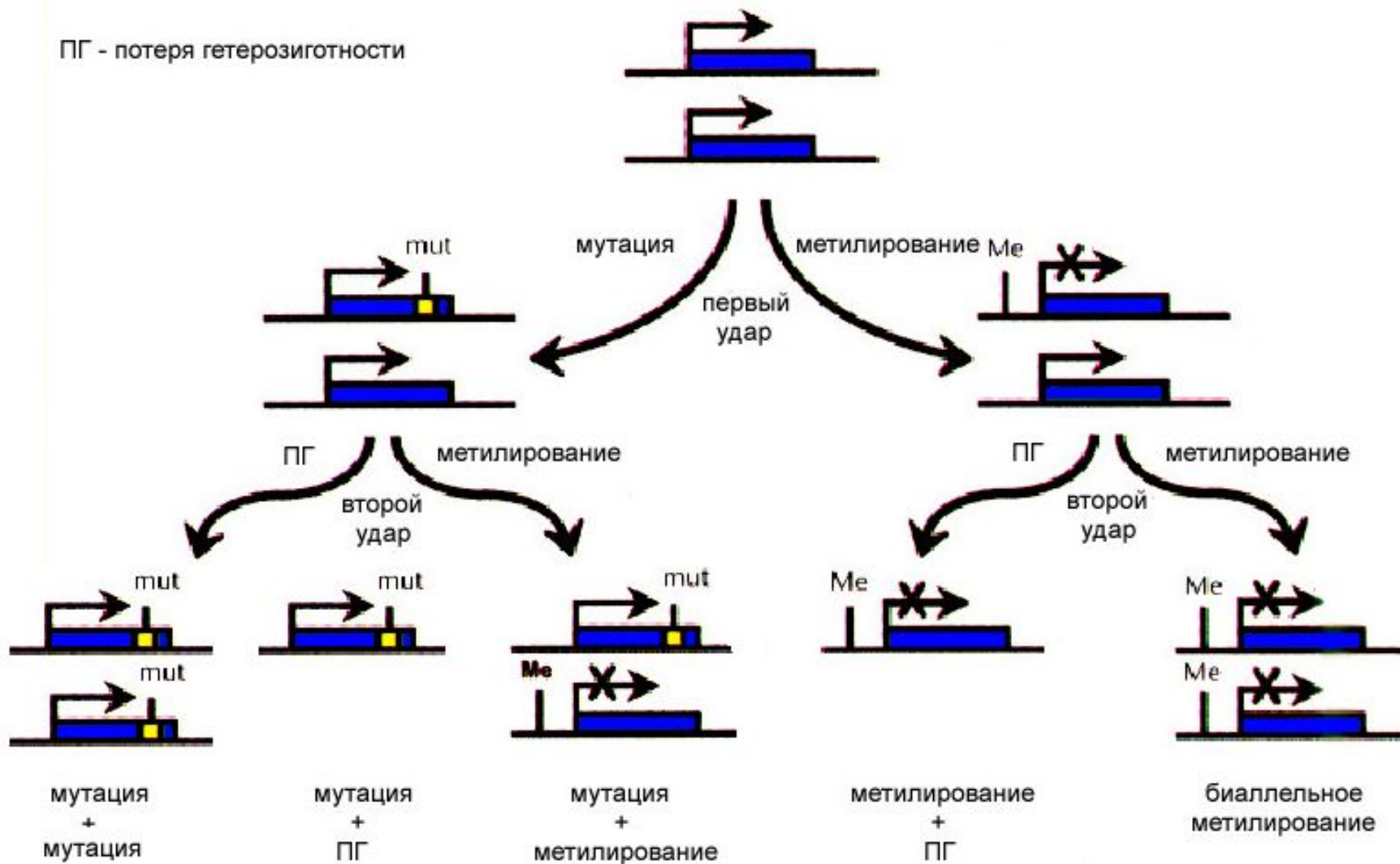
Lynch HT, Krush AJ.

PMID: 4328854 [PubMed - indexed for MEDLINE]

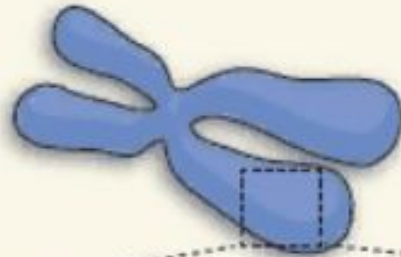
Современная двухударная модель канцерогенеза



ПГ - потеря гетерозиготности



Хромотрипсис



Original chromosome sequence



Catastrophic chromosome breakage



Rearranged chromosome



Lost chromosomal material



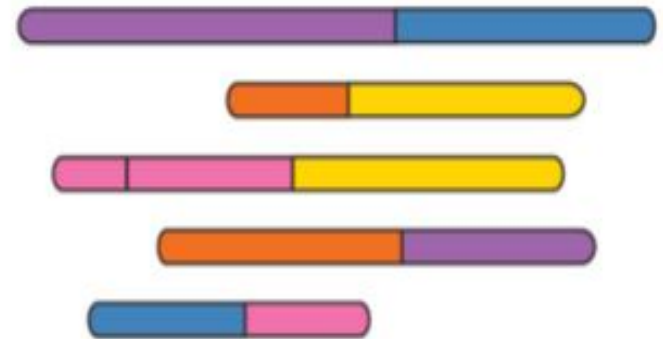
Хромоплексия



Normal

Tumor

Chromoplexy



 Deleted segments

Сравнение хромотрипсиса и хромоплексии



Normal

Tumor

Chromoplexy



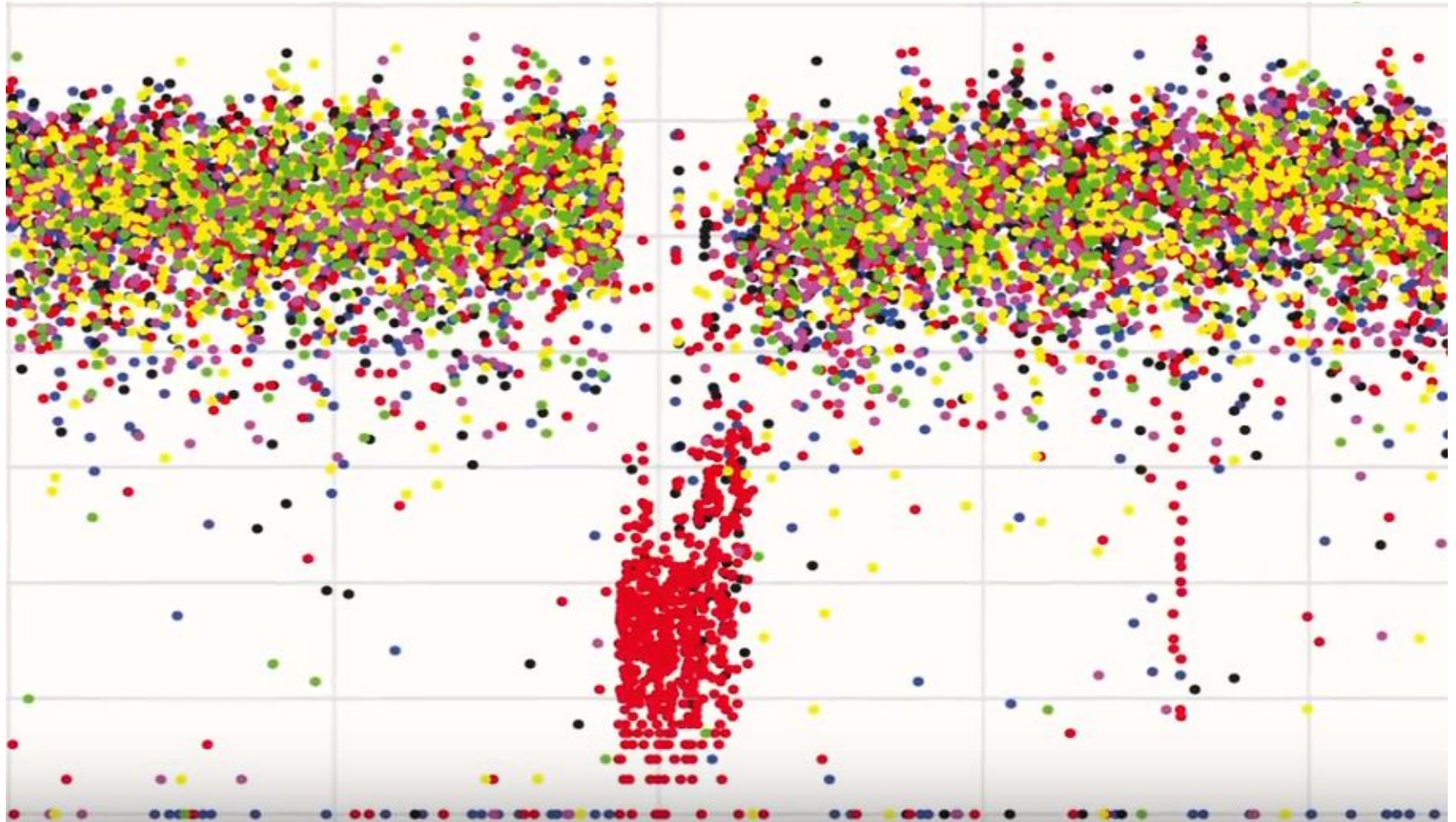
Deleted segments

Chromothripsis



Deleted segments

Категис



Эволюционная теория

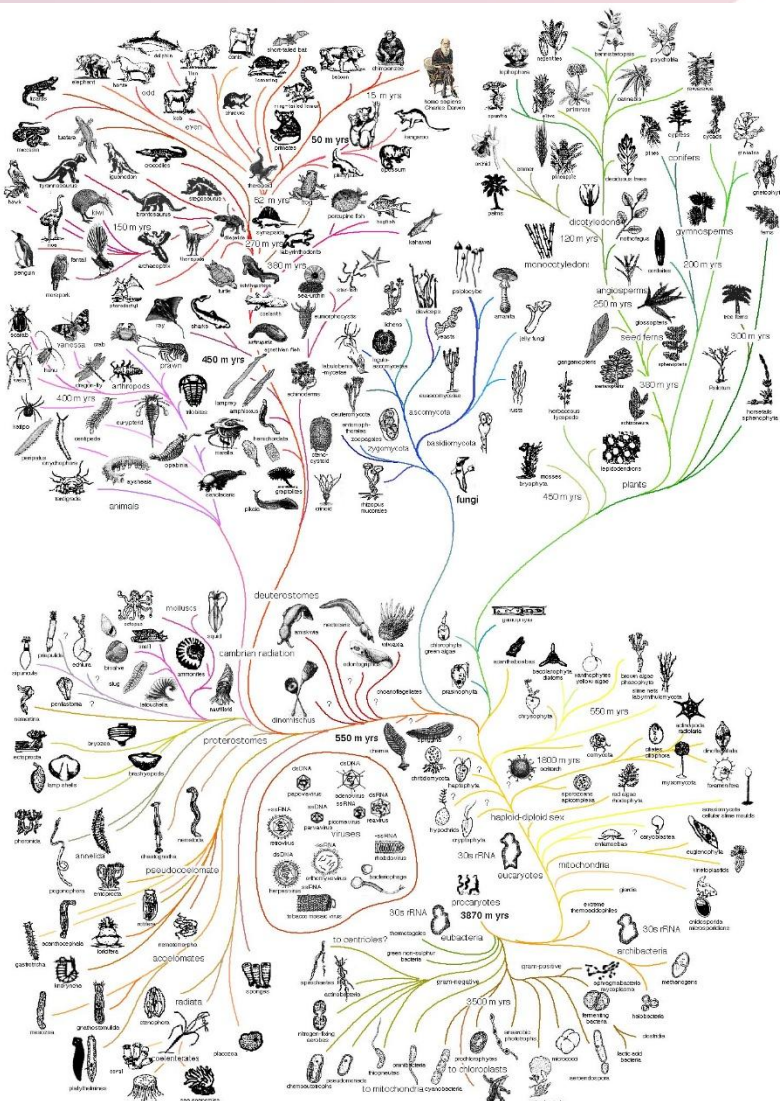
Ч.Дарвина



Раскрывает пути и закономерности эволюционного процесса видообразования

Впоследствии она оказалась применима для других биологических систем, включая процессы злокачественной трансформации. Согласно теории клональной эволюции опухолей (Novell 1976) изменчивость является ресурсом для образования новых опухолевых клонов, а естественный отбор – основой для выживания приспособленных агрессивных клонов опухолевых клеток

Следствием клональной эволюции опухоли является генерация внутриопулевого разнообразия или внутриопулевой гетерогенности, которая характерна для большинства



Гетерогенность опухолевых клеток



Существуют две основные гипотезы происхождения гетерогенности опухолевых клеток:

- различные субклоны опухолевых клеток возникают из различных тканевых стволовых клеток, каждая из которых имеет свой тренд трансформации (поликлональная концепция),
- различные клоны опухолевых клеток возникают из первоначального клона вследствие всевозможных генетических и/или эпигенетических изменений в процессе эволюции (моноклональная концепция)

Внутриопухолевая гетерогенность как следствие клональной эволюции объясняет определенные особенности опухолевого развития: наличие опухолевых клонов с индивидуальным набором признаков (например, варианты мутаций не одинаково распределены в опухолевых клетках), сосуществование морфологически различающихся структур в составе опухоли, наличие нейтральных отношений между опухолевыми клонами (без заметных фенотипических последствий), появление злокачественных клеток, устойчивых к лекарственному воздействию и, что самое главное, различный ответ опухолей на терапию. Эволюция и естественный отбор опухолевых клонов в процессе образования опухоли и последующий канцерогенез может быть назван естественной клональной

Гетерогенность опухолевых клеток

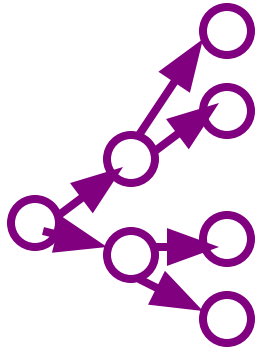


Естественная клональная эволюция происходит за счет внутренних механизмов и определяется драйверными мутациями (возникающими за счет ошибок репарации или репликации, под действием канцерогенов и др.), генетической нестабильностью и, главным образом, факторами микроокружения, формирующими среду для трансформации клеток и их выживания.

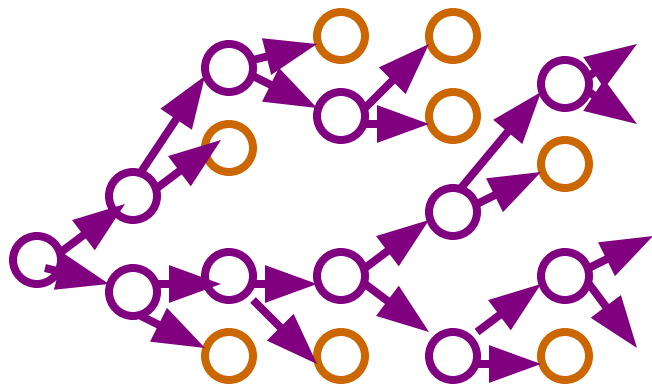
Следствием естественной клональной эволюции является формирование в опухоли пространственной внутриопухолевой гетерогенности, при которой морфологически слабо различающиеся опухолевые клетки могут образовывать различные морфологические структуры или представлять различные популяции, одни из которых могут получить селективное преимущество и привести к прогрессии опухоли. Приобретение клеточными популяциями новых генетических нарушений также может способствовать получению ими конкурентных преимуществ в условиях выборочного давления факторов стромального микроокружения.

Это преимущество может заключаться в увеличении скорости роста субпопуляции, приобретении способности к заселению новых ниш (инвазии и метастазированию) и «ускользанию» от действия противоопухолевых препаратов и иммунитета

Прогрессирование рака

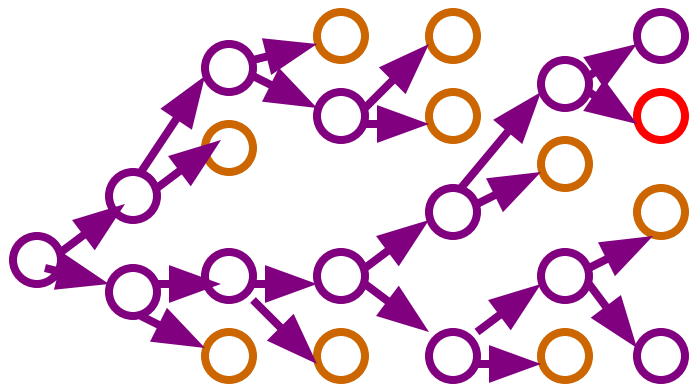


Прогрессирование рака



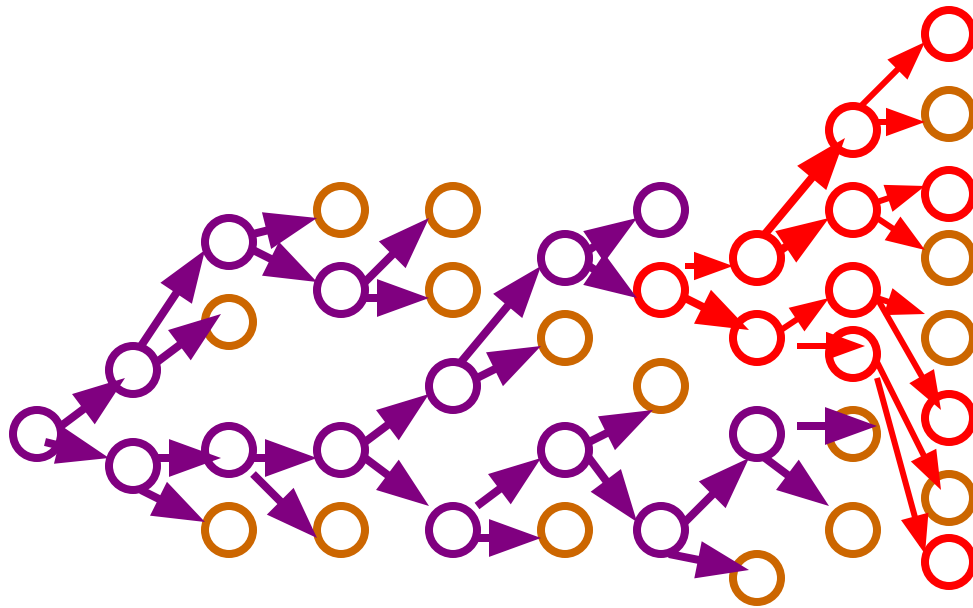
Constant population

Прогрессирование рака



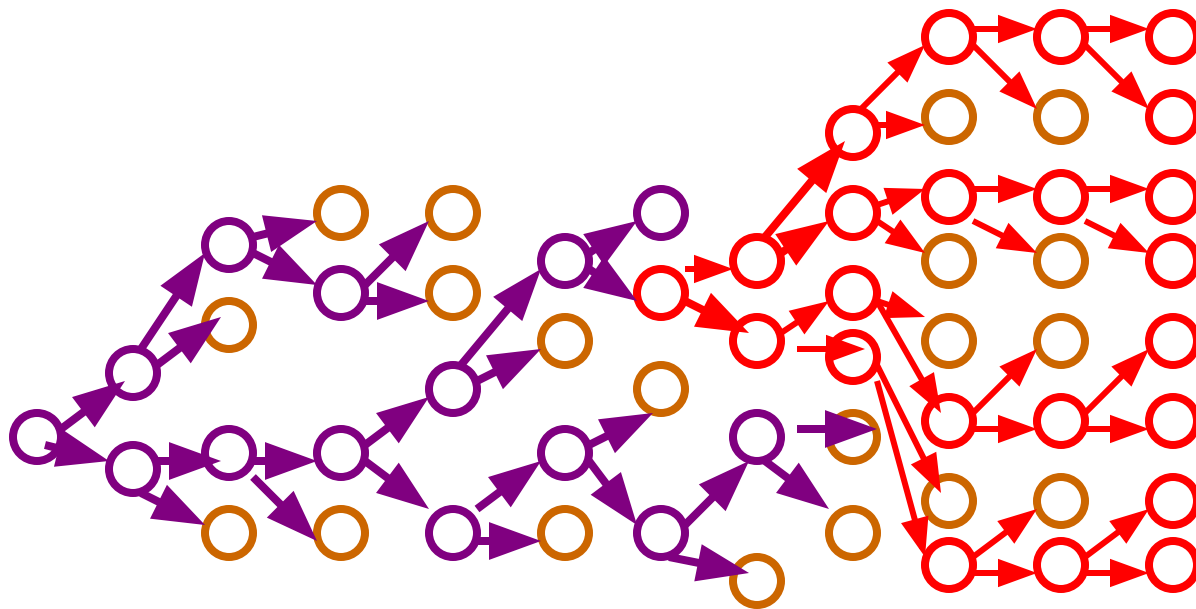
Advantageous mutant

Прогрессирование рака



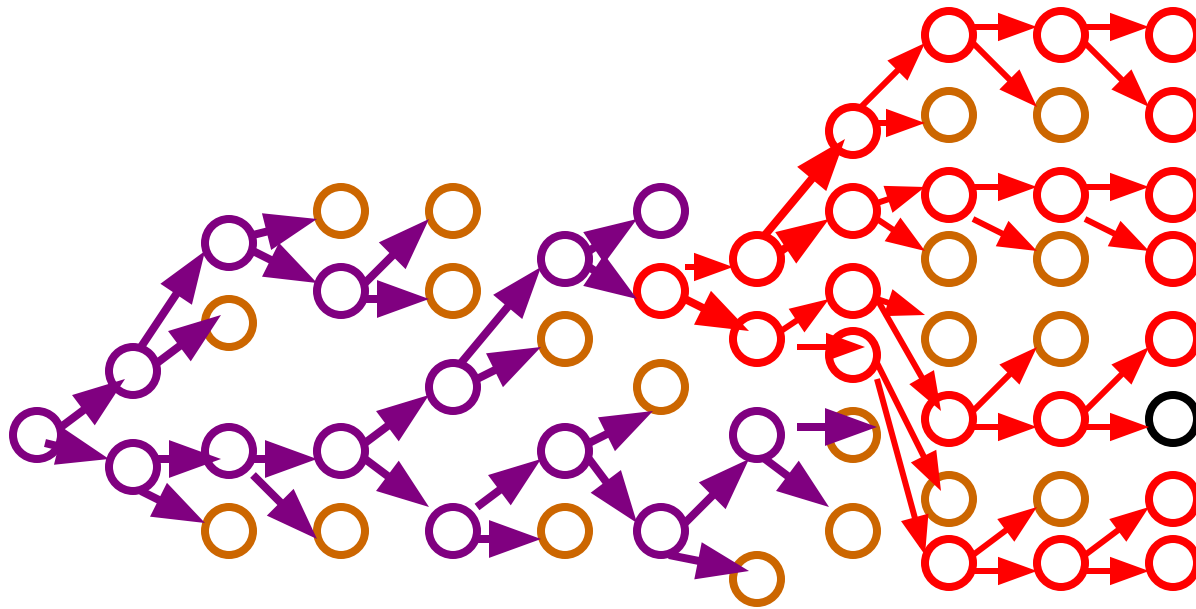
Clonal expansion

Прогрессирование рака



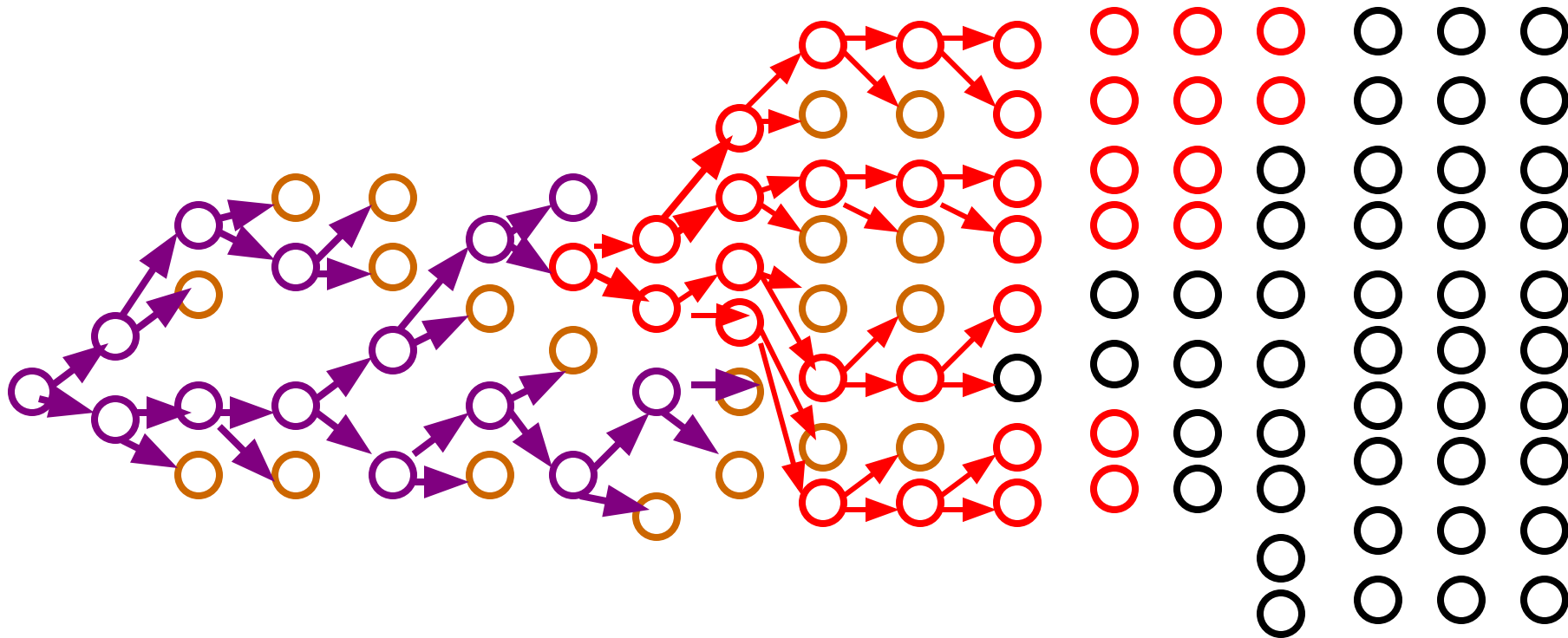
Saturation

Прогрессирование рака



Advantageous mutant

Прогрессирование рака

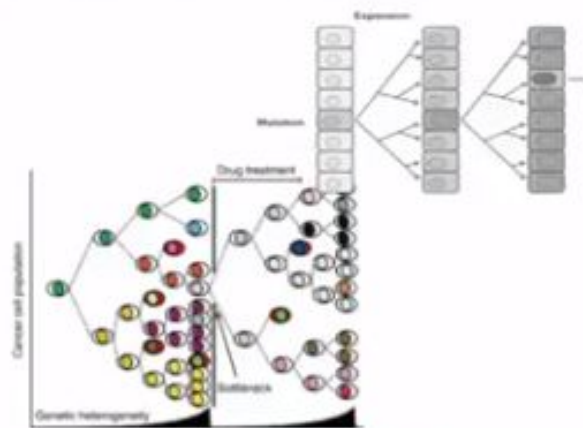


Wave of clonal expansion



Клональная эволюция раковых клеток

- Опухоль происходит из клеток, которые приобретают преимущество в скорости пролиферации.
- Дарвиновский отбор раковых фенотипов.
- Лечение – тоже фактор отбора резистентных опухолевых клеток
- Ветвящаяся эволюция. Новые клоны не полностью вытесняют прежние
- Гетерогенность – следствие эволюции клонов



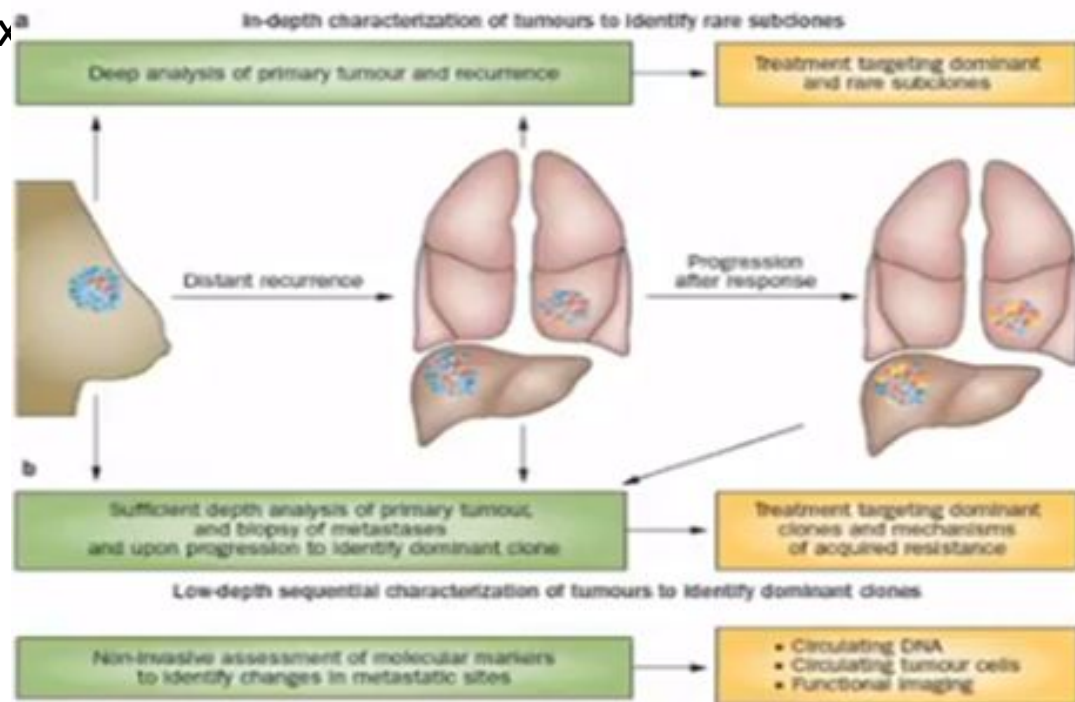
Nik-Zainal et al, Cell, 2012 May 25;149(5):994-1007

ПРОБЛЕМА: работать с разными субклонами опухоли

Борьба с гетерогенностью



- Найти (targetable) события, которые произошли на ранней стадии и поэтому есть у большинства клеток опухоли
- Ультраглубокое секвенирование для поиска редких клонов
- Определить доминантный клон. Биопсии рецидивов и метастазов. Повторные биопсии во время прогрессии, малоинвазивные методы диагностики (циркулирующие опу



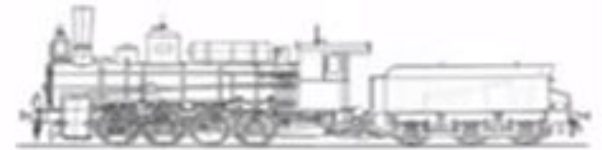
Meric-Bernstam & Mills, *Nat. Rev. Clin. Oncol*, 2012

Мутации драйверы и мутации пассажиры



Драйверы (driver mutations):

- Дают преимущество в росте клеток
- Находятся под положительным отбором в процессе эволюции раковых клеток
- Локализуются в 'раковых' генах. Таких генов ~300-500.
Очевидно – не любая мутация в таком гене будет драйверной
- Происходят на ранних этапах онкогенеза
- В опухоли в среднем от 2 до 8 драйверных мутаций



Пассажиры (passenger mutations):

- Возникают вследствие мутаторного фенотипа, не дают преимущества в скорости роста

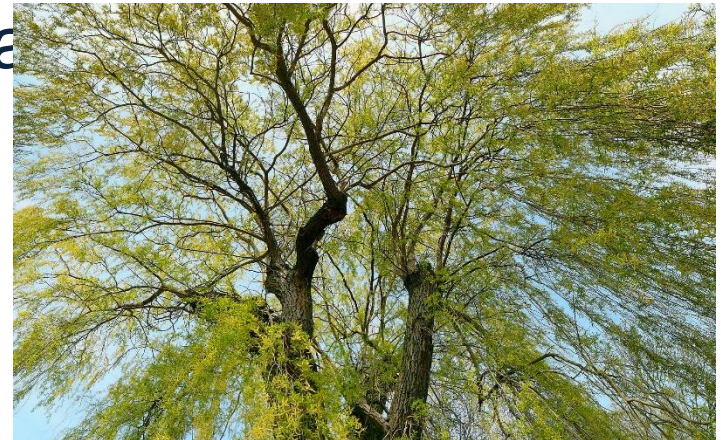
– Зачем искать драйверные мутации?

– Чтобы на них воздействовать!

Проблема: не любой ген-драйвер может быть мишенью для лекарства...



- Возникающие генетические изменения в опухолевых клетках не всегда приводят к функциональным последствиям, часть из них нейтральны. В этой связи важной является концепция первичных и вторичных «драйверных» мутаций и мутаций «пассажира», т.е. мутаций, повышающих приспособленность опухолевых клеток, и нейтральных или негативных мутаций, соответственно.





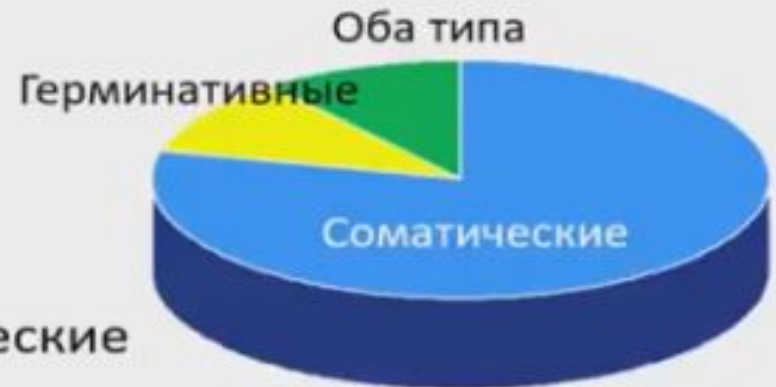
Типы мутаций

- **Соматическая**

- Возникает de novo в ДНК клеток сомы
- Не передается потомкам

- **Генеративная**

- в ДНК половых клеток
- Передается потомкам
- Увеличивается риск, но соматические мутации все равно нужны для возникновения опухоли (cancer family syndrome)
- синдром Ли-Фраумени, BRCA1/2 для РМЖ, ...

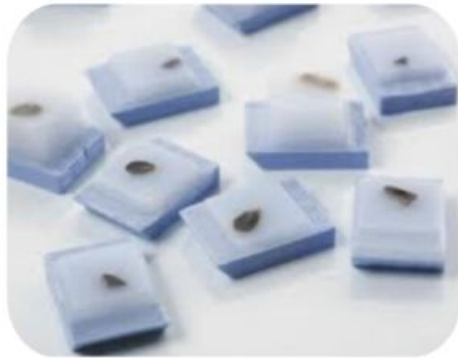


ПРОБЛЕМА: отличать соматические мутации от герминативных при секвенировании

Герминальные и соматические мутации

Соматические

- Парафиновые блоки
- Свежезамороженные ткани

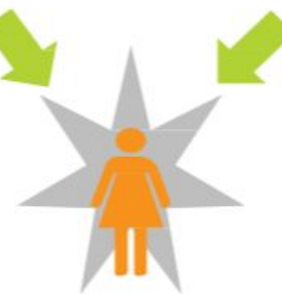


Герминальные

- Периферическая кровь
- Буккальный эпителий



- Не наследуются
- Определяют биологию клетки
- Предикторы эффективности ПХТ таргетной терапии



- Наследуются
- Определяют высокие риски развития ЗНО
- Предикторы эффективности ПХТ и таргетной терапии

Генетические нарушения



- Делеции целых хромосомных районов, содержащих гены супрессоры опухолевого роста (потеря гетерозиготности);**
- Дупликации или амплификации районов, содержащие клеточные протоонкогены, факторы роста и др.;**
 - Микросателлитная нестабильность;**
 - Транслокации, инверсии хромосомного материала, в результате которых могут образовываться химерные гены, имеющие онкогенные функции;**
 - Мутации, которые могут активировать протонкогены (100) или инактивировать гены –супрессоры (150).**

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ



наследственные и ненаследственные изменения в экспрессии конкретного гена без каких-либо соответствующих структурных изменений в его нуклеотидной последовательности.

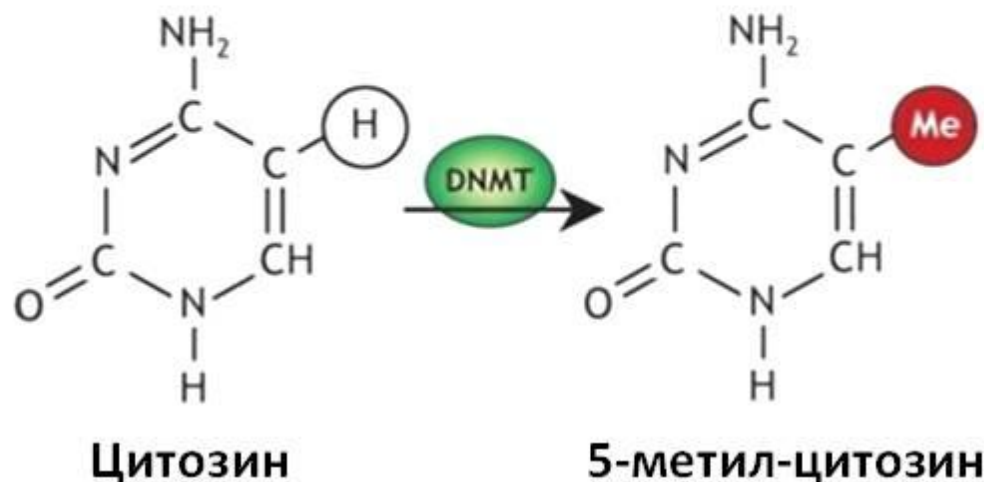
Основные эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов:

- Метилирование ДНК**
- Модификация гистонов**
- РНК-интерференция (изменение экспрессии микроРНК)**

Метилирование ДНК

Метилирование ДНК – это модификация молекулы ДНК без изменения самой нуклеотидной последовательности ДНК, что можно рассматривать как часть эпигенетической составляющей генома.

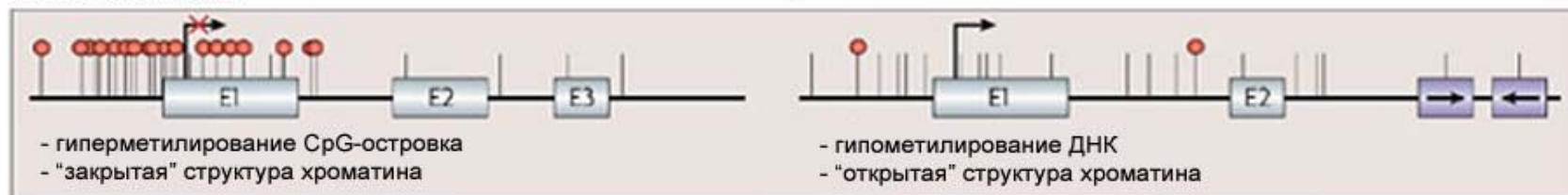
Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции С5 цитозинового кольца. Метилирование ДНК считается, в основном, присущим эукариотам. У человека метилированию подвергается около 1% геномной ДНК.



нормальная клетка



раковая клетка



канцерогенез

■ неметилированный CpG ● метилированный CpG

Аномально метилированные промоторные районы (CpG-островки) составляют 100-400 в каждой опухоли.

Метилирование ДНК является ценным биомаркером для диагностики рака



1. Целый ряд генов, прямо или косвенно вовлеченных в канцерогенез, инактивируется посредством метилирования;
2. Метилирование генов, вовлеченных в канцерогенез, не наблюдается в ДНК из нормальных тканей;
3. Метилирование генов, вовлеченных в канцерогенез, может быть определено в биологических жидкостях организма и соответствует профилю метилирования ДНК, выделенной из соответствующей опухоли;
4. Частоты аномального метилирования множества генов значительно превышают частоты структурных повреждений тех же генов при канцерогенезе;
5. Лабораторные исследования подтверждают, что метилирование является одним из наиболее ранних событий в канцерогенезе;
6. Многочисленные исследования показывают, что метилирование ДНК, как биомаркер, является высоко специфичным и чувствительным;
7. Разработаны методы, позволяющие проводить качественный и количественный анализ метилирования ДНК.

Частоты метилирования генов-супрессоров при раке почки



1. В опухолях метилирование *VHL* определено в 14.2%, *RASSF1* – 52.8%, *FHIT* – 54.3%, *SFRP1* – 33.1% и *CDH1* – 41.7% случаев.
2. Метилирование как минимум одного из исследованных генов обнаружено в 85.0%. Эти гены можно рассматривать в качестве компонентов системы маркеров метилирования при раке почки.

Методы анализа метилирования



1. Метилчувствительная ПЦР (NotI, EagI, SacII, HpaII, HhaI)
аналитическая чувствительность - 1: 2000
2. Метилспецифическая ПЦР
Трансформация цитозина в урацил бисульфитом Na
аналитическая чувствительность - 1: 1000
3. MethylLight – метилспецифическая ПЦР в реальном времени
аналитическая чувствительность - 1: 10000
4. Метилспецифическое секвенирование
5. Биологические микрочипы низкой и высокой плотности
(позволяют анализировать конкретные гены и искать новые дифференциально метилированные гены)
6. Высокотехнологичные методы анализа *in silico* (АИМС)
(позволяют искать новые дифференциально метилированные гены)


Системы молекулярных маркеров

метиляции



Гены	Чувствительность	Специфичность
<i>Рак шейки матки</i>		
<i>P16</i>	54%	93%
<i>MLH1</i>	45%	93%
<i>N33</i>	27%	100%
Панель из 3 маркеров	85%	85%
<i>Рак желудка (в сыворотке крови)</i>		
<i>CDH1</i>	57%	100%
<i>P16</i>	52%	100%
<i>P15</i>	56%	100%
<i>DAPK1</i>	48%	100%
<i>GSTP1</i>	15%	100%
Панель из 5 маркеров	83%	100%
<i>Рак мочевого пузыря (клетки эпителия в моче)</i>		
<i>DAPK</i>	67%	100%
<i>RARβ2</i>	71%	100%
<i>CDH1</i>	49%	100%
<i>P16</i>	76%	100%
Панель из 4 маркеров	91%	100%

Метилирование позволяет прогнозировать течение заболевания и эффективность терапии.



Метилирование промоторных районов генов *RASSF* и *p16* достоверно чаще происходит в клетках уротелиальных карцином с инвазией в подслизистый слой (pT1) и может рассматриваться как маркер инвазивного роста опухоли. Аномальное метилирование промоторного района гена *p14* ассоциировано с полифокальным ростом опухоли.

Метилирование *CDH1* ассоциировано с прорастанием опухолью капсулы почки ($P = 0.024$) и наличием метастазов на момент постановки диагноза ($P = 0.001$). Метилирование *RASSF1* чаще встречается в умеренно-, чем в высокодифференцированных первичных опухолях ($P = 0.047$). Метилирование *RASSF1* и *CDH1* может рассматриваться в качестве неблагоприятного прогностического маркера на различных стадиях рака почки.

Метилирование *RASSF1A*, определенное в сыворотке крови пациентов с РМЖ во время терапии томоксифеном, свидетельствует о наличии метастазов, неэффективности лечения и крайне неблагоприятном прогнозе заболевания.

Метилирование *MGMT* коррелирует с успешным лечением глиом Темодалом.

Метилирование генов *N33*, *CDH1*, *DAPK* при раке желудка определяется во всей слизистой желудка, что свидетельствует о ее вовлеченности в опухолевый процесс.

Метилирование позволяет предсказать поведение опухоли (эффективность терапии, метастазирование):



- метилирование *WIT1* коррелирует с **хеморезистентностью** при ОМЛ;
- метилирование *MGMT* коррелирует с **успешным лечением** глиом

кармустином, а В-клеточных лимфом – циклофосфамидом;

- метилирование *DAP*-киназы свидетельствует о **благоприятном**


прогнозе при немелкоклеточном раке легкого;

- метилирование *APC* в плазме крови пациентов с аденокарциномами свидетельствует о **коротком сроке выживаемости**;

- метилирование *RASSF1A*, определенное в сыворотке крови пациентов с РМЖ во время терапии томоксифеном, свидетельствует о **наличии метастазов, неэффективности лечения и крайне неблагоприятном прогнозе** заболевания;

- метилирование генов-супрессоров, в том числе *PCDH9* и *BLU*,

ассоциировано с **плохой выживаемостью** пациентов с нейробластомой, вне зависимости от амплификации *N-тус*.



Метилирование ДНК, как диагностический маркер онкологического заболевания, имеет ряд преимуществ перед другими маркерами

Мы определяем положительный сигнал – гиперметилирование ДНК в опухолевой клетке.

Потерю гетерозиготности или изменения в экспрессии гена в опухолевой клетке определить сложнее при наличии большого количества нормальной ДНК и РНК.

ДНК, содержащая метилированные районы, более стабильна, чем РНК и легко выделяется из большинства биологических жидкостей организма и фиксированных тканей.

Возникнув в опухоли однажды, метилирование поддерживается в течение жизни этой опухоли.

Молекулярные маркеры, определяемые на ранних стадиях канцерогенеза.



Злокачественная опухоль	Молекулярные маркеры
Рак простаты	Метилирование <i>GSTP1</i>, <i>N33</i>, <i>SFRP1</i>
Колоректальный рак	Метилирование <i>p16</i>, <i>MLH1</i>, <i>APC</i>, микросателлитная нестабильность
Рак желудка	Метилирование <i>p16</i>, <i>MLH1</i>
Рак пищевода	Метилирование <i>p16</i>, <i>APC</i>, наличие HPV 16, 18
Рак мочевого пузыря	Метилирование <i>p16</i>, <i>DAPK1</i>, <i>RAR-β</i>
Рак печени	Метилирование <i>p16</i>, <i>p15</i>
Рак поджелудочной железы	Метилирование <i>p16</i>
Немелкоклеточный рак легкого	Метилирование <i>p16</i>, <i>MGMT</i>, <i>DAPK1</i>, мутации <i>KRAS</i>
Рак шейки матки	Метилирование <i>p16</i>, <i>HIC1</i>, <i>MLH1</i>, <i>RBI</i>, наличие HPV 16, 18
Рак молочной железы	Метилирование <i>p16</i>, <i>CCND2</i>, <i>TWIST</i>, <i>RAR-β</i>

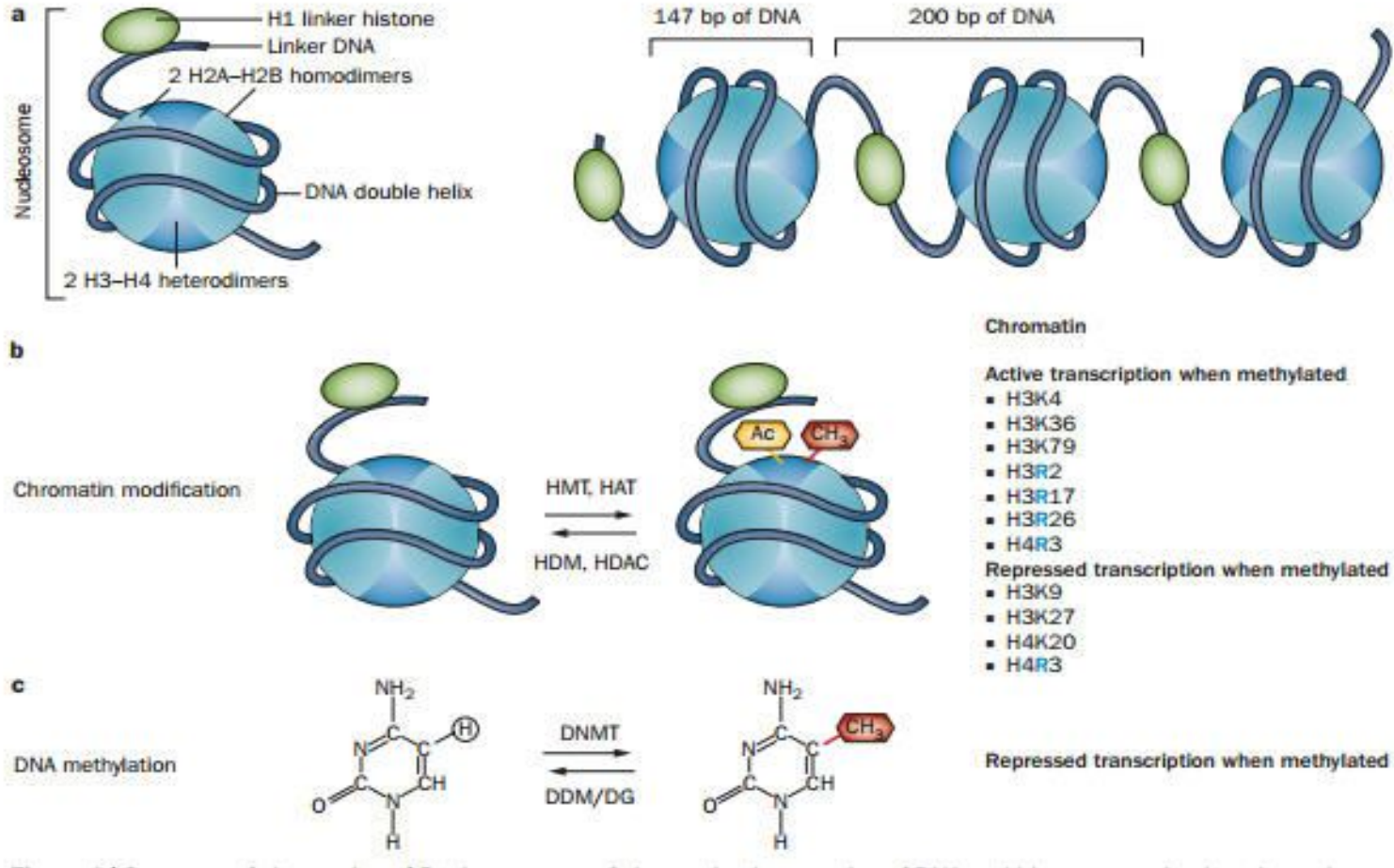


Метилирование позволяет более точно классифицировать типы и подтипы опухолей:

- гиперметилирование *BRCA1* обнаружено при раке молочной железы и яичников, но его нет в колоректальных раках и при лейкозах;
- гиперметилирование *VHL* обнаружено только в светлоклеточных карциномах почки;
- гиперметилирование *p15* обнаружено при ОМЛ и ОЛЛ, *p16* – не метилирован;
- гиперметилирование *p16* обнаружено при Ходжкинской лимфоме, *p15* - не метилирован.

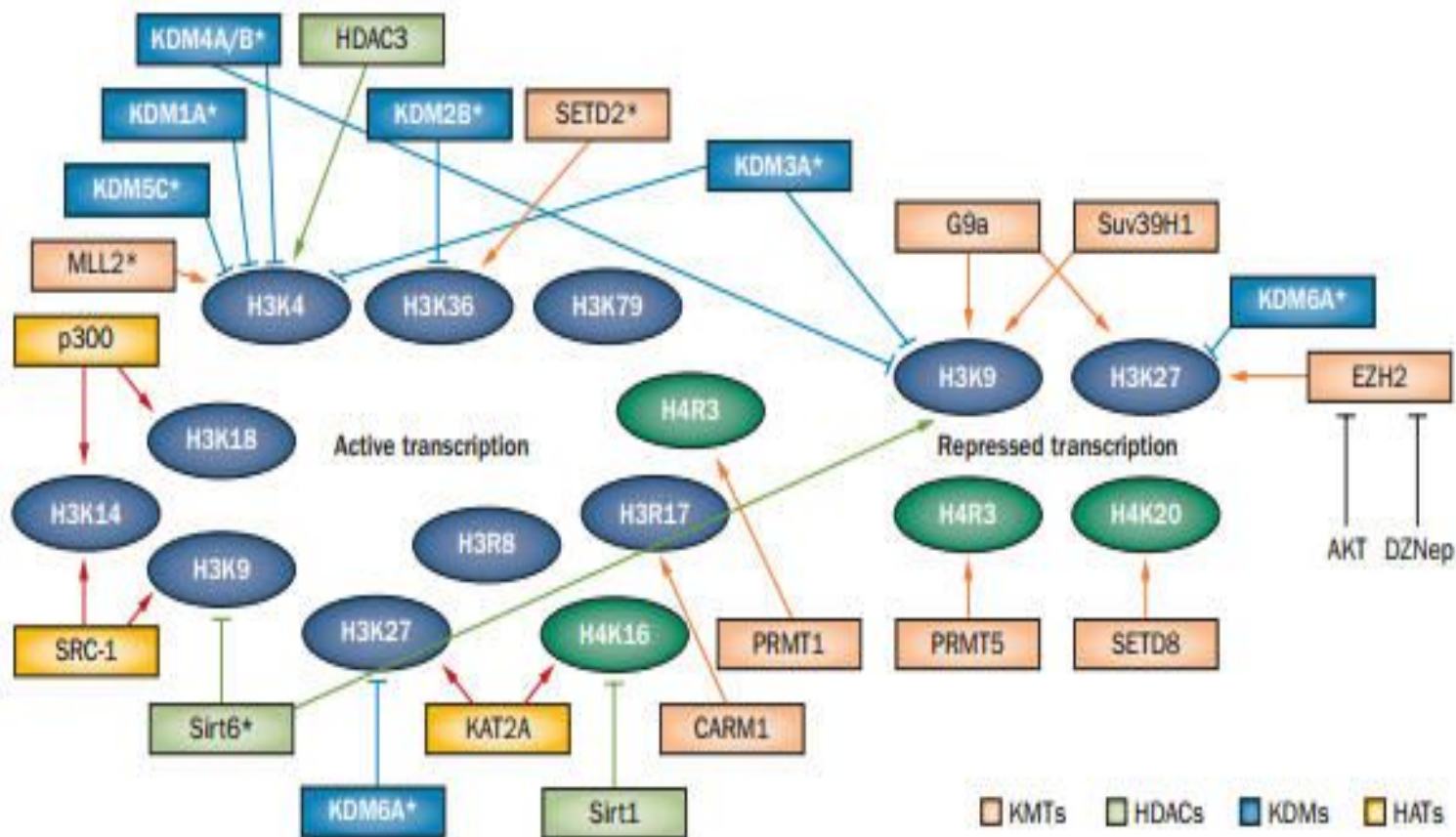
При ХМЛ метилирование обоих генов не выявлено.

Структура хроматина и модификация гистонов (James L. Watson et al., 2012)



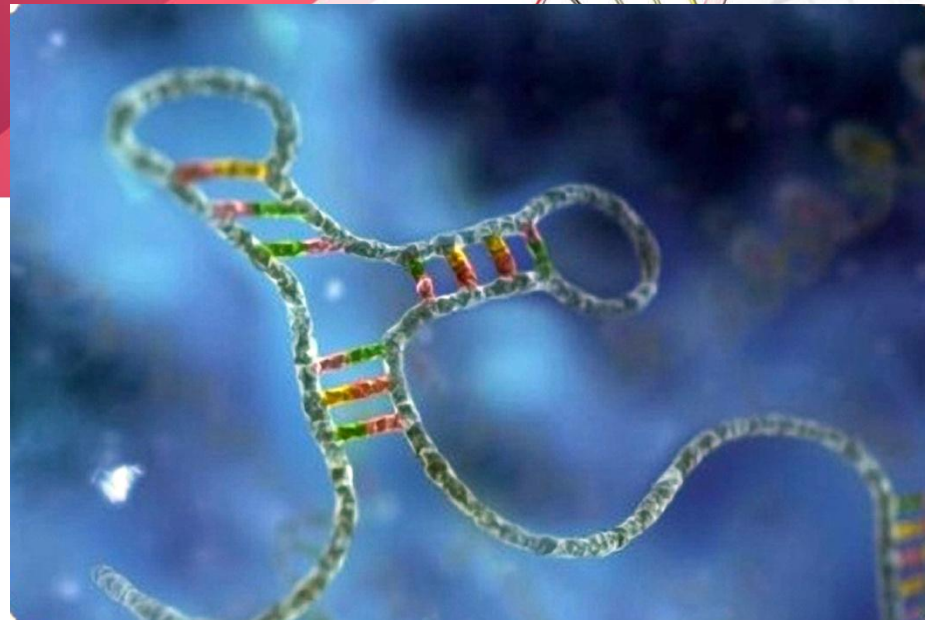
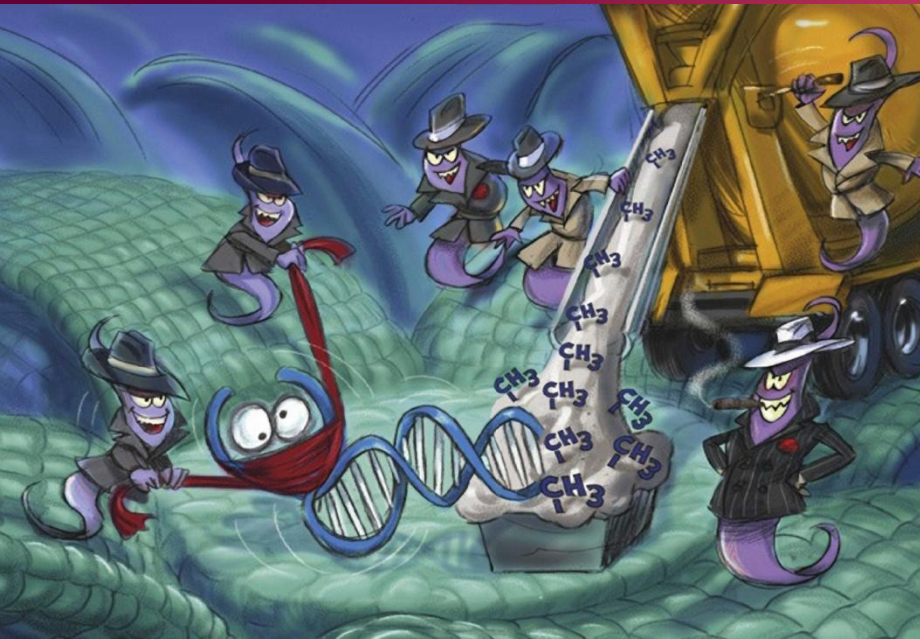
Карта метилирования и ацетилирования гистонов при почечно-клеточном раке

(James Larkin et al., 2011)





РНК-интерференция: процесс подавления экспрессии гена на стадии транскрипции, трансляции, деаденилирования ил деградаци мРНК при помощи малых молекул РНК – микроРНК (miРНК) и коротки интерфирирующие РНК (siРНК)

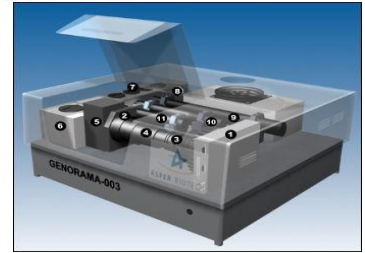
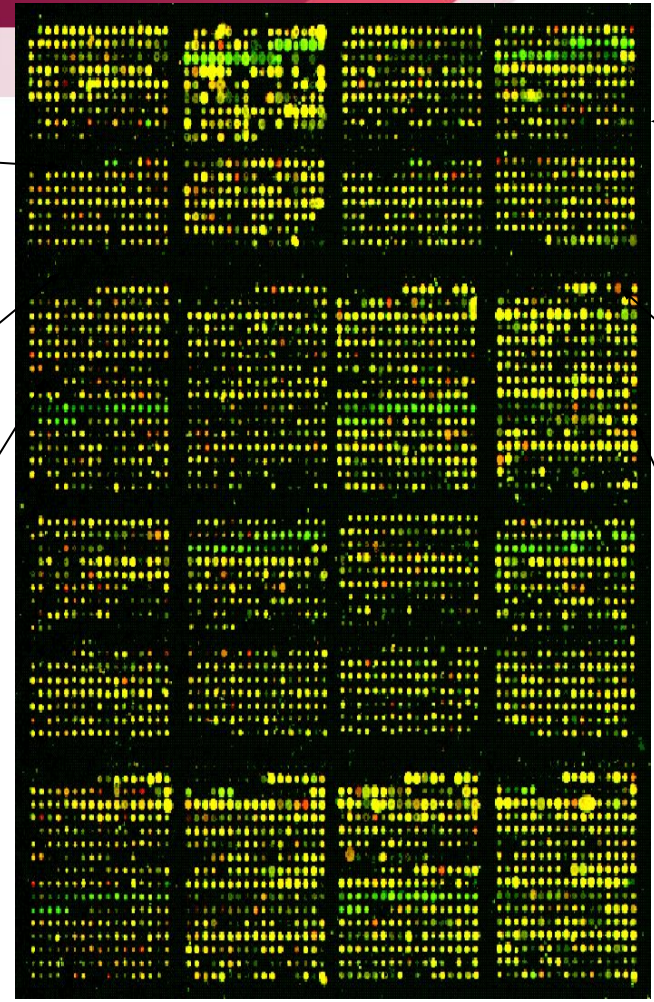


- МикроРНК - некодирующие РНК, состоящие из 18-24 нуклеотидов и регулирующие экспрессию до 30% генов человека.
- Микро РНК экспрессируются во всех тканях и органах и участвуют в процессах канцерогенеза как в качестве онкогенов, так и генов-супрессоров опухолевого роста.

Чиповые технологии для высокопроизводительного геномирования



Affymetrix



Белок p53



- Фактор **апоптоза**
- **p53** определяет повреждения ДНК
- останавливает синтез ДНК до тех пор, пока не произошла репарация ДНК
- если репарации ДНК не происходит, то запускается каспазный путь



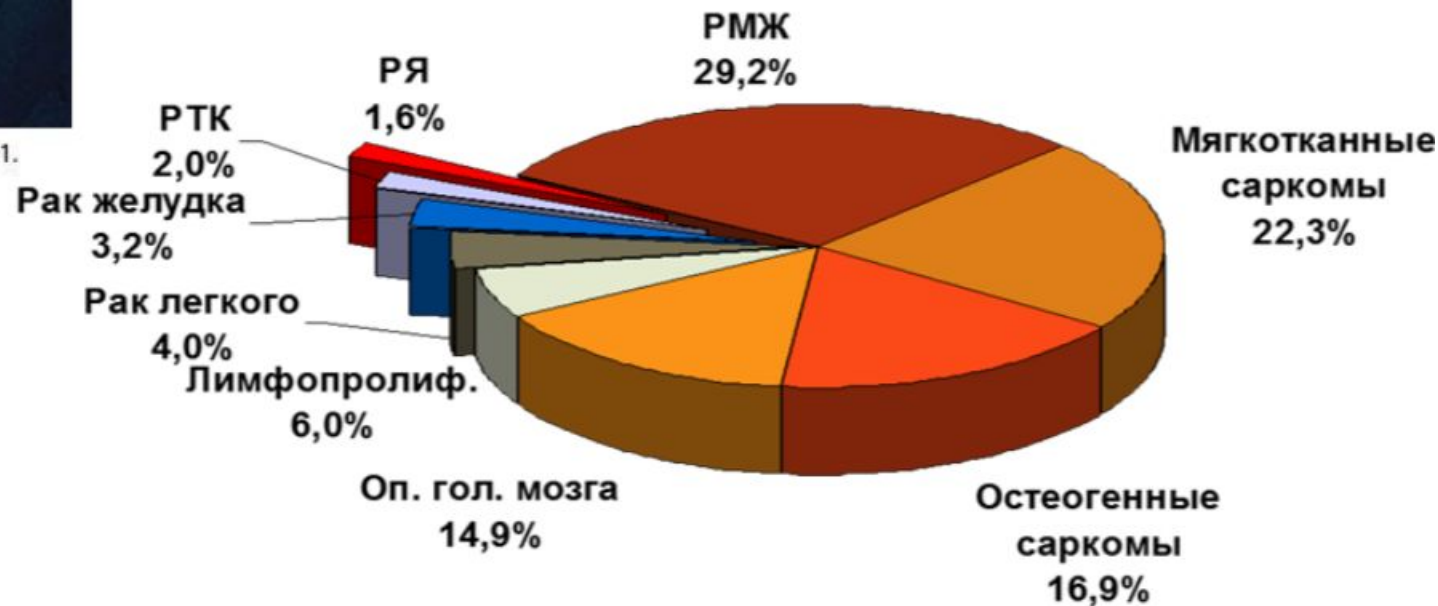
Синдром Ли-Фраумени (1961 г.)



Frederick Li and Joseph Fraumeni, 1991.

Soft-Tissue Sarcomas, Breast Cancer, and Other Neoplasms: A Familial Syndrome?

FREDERICK P. LI, M.D.; and JOSEPH F. FRAUMENI JR., M.D., F.A.C.P.



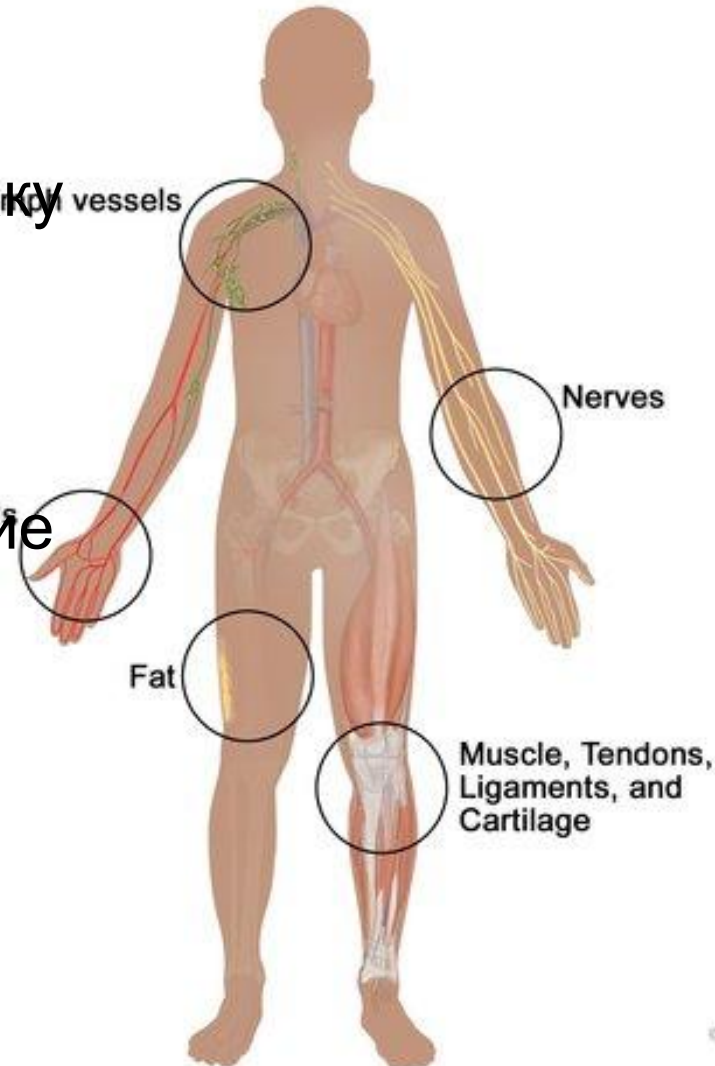
Ген *TP53* – «guardian of the genome» (*Lane D. Nature 1992*)

Белок p53



- **Синдром Ли Фраумени**
- Наследственная предрасположенность к раку с вероятностью 90% до возраста 60 лет
- Мутация в **p53**
- p53 – димер (частое явление для транскрипционных факторов)
- Мутантный продукт одного аллеля связывает и инактивирует нормальный продукт другого аллеля

Soft Tissue Sarcoma



Ретинобластома

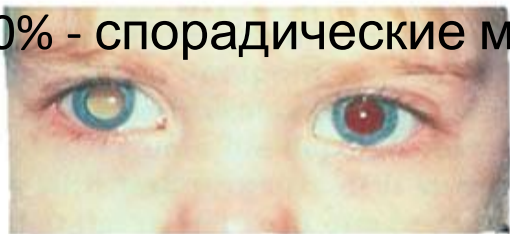


Злокачественная опухоль глаза, развивается преимущественно в детском возрасте из тканей эмбрионального происхождения. Диагностируется в возрасте 1-3 лет

Распространенность

ретинобластомы небольшая – примерно 1 случай на 20 000 новорожденных.

40% заболевания наследуются по **аутосомно-доминантному** типу
60% - спорадические мутации

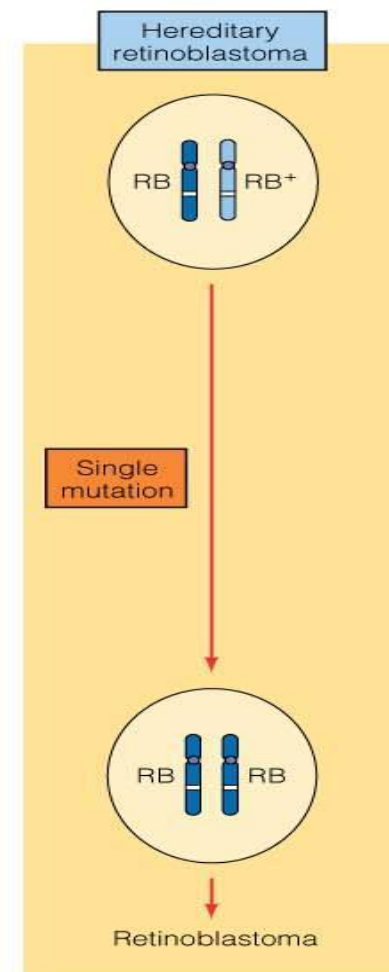


Ретинобластома



Наследственная:

- Аутосомно-доминантный тип наследования
- У носителей гена *RB* 90% шанс развития ретинобластомы
- Опухоли в обоих глазах
- Высокий риск остеосаркомы и фибросаркомы



(a)

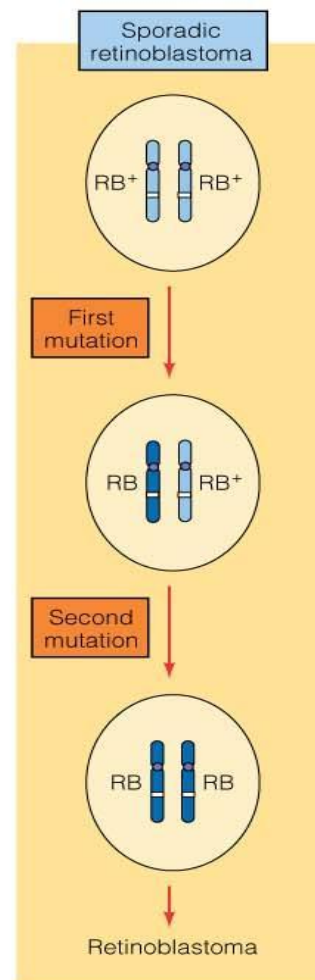
Fig. 12.7

Ретинобластома



Спорадическая:

- Мутации в обеих копиях гена *RB1*
- Опухоль поражает только один глаз
- Риск опухолей другой локализации отсутствует

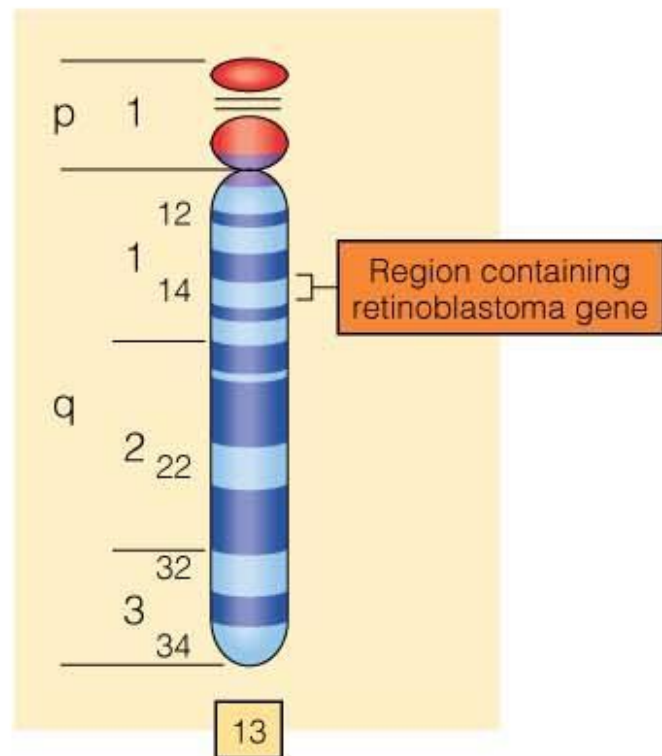


(b)

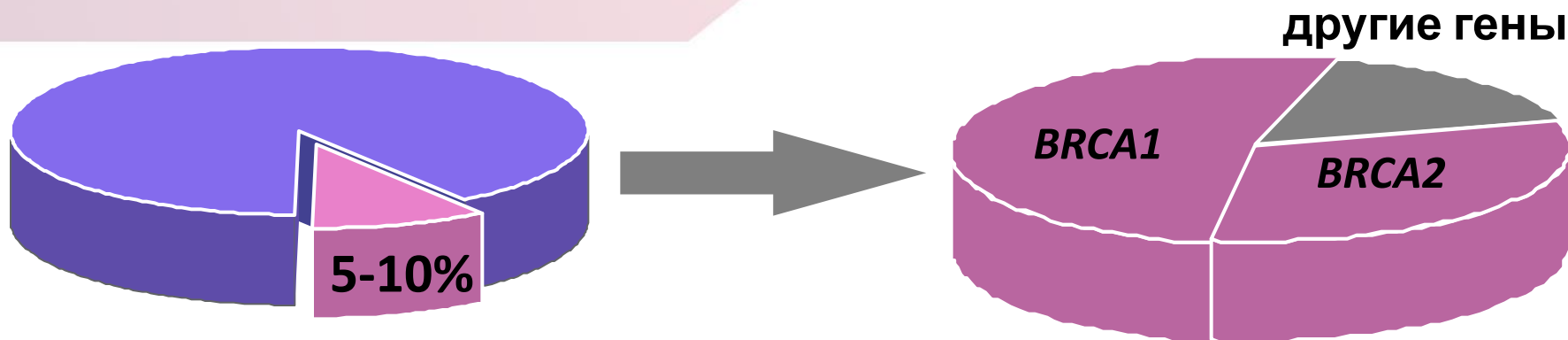
Ген *RB1*



- Расположен на хромосоме 13q14 и кодирует белок pRB
- **pRB – негативный регулятор клеточного цикла**
 - Активированный pRB предотвращает переход клетки из фазы G1 в фазу S
- Если обе копии гена *RB1* мутированы или отсутствуют, начинается неконтролируемый рост клеток



Рак молочной железы



- Sporadически
- Наследственные

В Европе ежегодно диагностируется 430000 новых случаев рака груди

~5% у лиц с мутациями в генах *BRCA1* или *BRCA2*

Известно >3000 различных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*

У женщин с мутациями гена *BRCA1* риск рака груди составляет 50% (в норме 13%), и 16% риск рака яичников к 70 годам (в норме 1.6%).

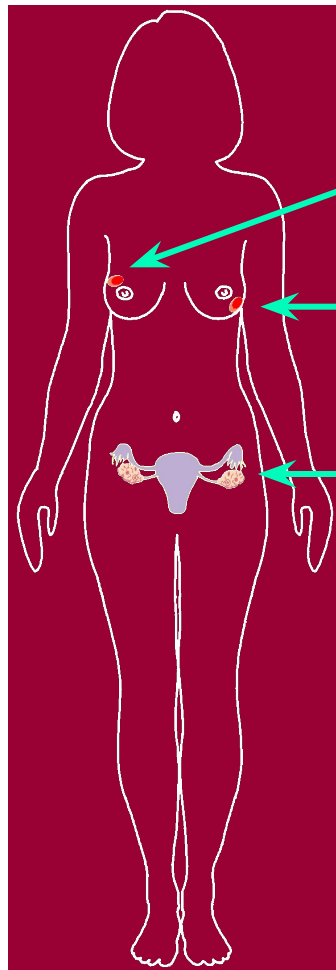
Также повышает риск рака простаты у мужчин (у 1 из 6 мужчин с мутацией в гене *BRCA1*)

Критерии для постановки диагноза наследственного рака



- молодой возраст возникновения онкологического заболевания;
- Наследственный анамнез (наличие в семье 1 и более родственника I степени родства, страдающих злокачественным новообразованием);
- накопление в семье злокачественных опухолей различной локализации и наличие первично-множественных опухолей у пациента и его родственников;
- двухстороннее поражение парных органов;
- Особый фенотип опухоли (трижды-негативный рак молочной железы, медуллярный рак щитовидной железы):

BRCA1



Рак груди 56%-87%

(часто с ранним

началом)

Второй первичный рак груди

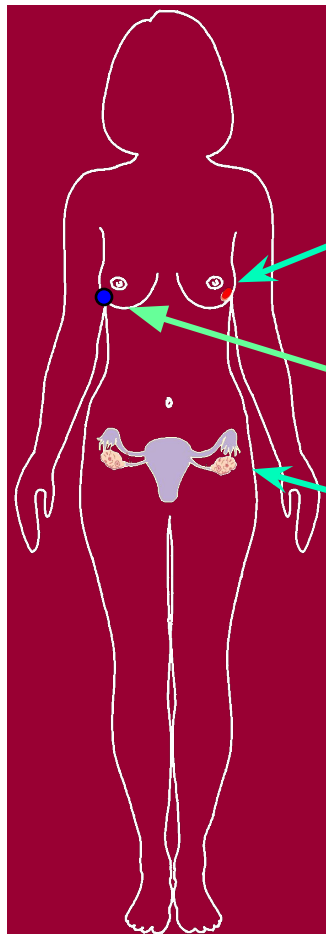
64%

Рак яичников

16%-44%

Повышенный риск других видов рака

BRCA2



Рак груди
(50%-80%)

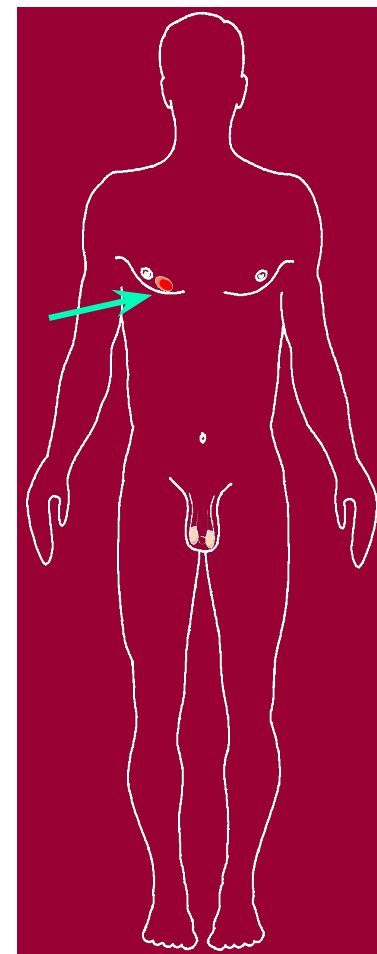
Первичный повторный
рак груди (50%)

Рак яичников
(15-27%)

Рак груди
(7%)

Рак
простаты
(~30%)

Другие виды рака:
поджелудочной железы,
меланома



BRCA1 и BRCA2



- Экспрессия повышена в точке перехода из фазы G1 в фазу S и в течение фазы S
- Белки BRCA активируются, когда ДНК повреждена
- Участвуют в репарации двухцепочечной ДНК
- Относятся к **онкосупрессорам**



Скрининговые обследования:

- Маммография/МРТ
- Профилактическая мастэктомия
 - ~90% снижение риска
- Профилактическая двусторонняя сальпингоофория
 - ~96-98% снижение риска рака яичников
 - ~50% снижение риска рака груди



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

FEDERAL SERVICE ON SURVEILLANCE IN HEALTHCARE AND SOCIAL DEVELOPMENT (ROSZDRAVNADZOR)

Серия АА 0000792

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

РАЗРЕШЕНИЕ

НА ПРИМЕНЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

ФС № 2011/009 от «03» февраля 2011 г.

«Профилактическая мастэктомия с одномоментной реконструкцией»

Разрешение выдано на имя: Учреждения Российской академии медицинских наук Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН (115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23).

Показания к использованию медицинской технологии:

- Наличие мутаций генов BRCA1 и BRCA2.
- Наличие у пациентки впервые выявленного гистологически верифицированного одностороннего рака молочной железы, либо рака молочной железы в анамнезе.

Противопоказания к использованию медицинской технологии:

- Возраст старше 60 лет.
- Ожирение II-III степени.
- Артериальная гипертония с высоким риском 3, очень высоким риском 4.
- Инсулинозависимый сахарный диабет.
- Декомпенсированные пороки сердца.
- Ишемическая болезнь сердца (постинфарктный кардиосклероз, мерцательная аритмия, стенокардия I и 2 функционального класса).
- Инфекционно-аллергическая бронхиальная астма (без длительной ремиссии).
- Тиреотоксический зоб.
- Посттравматическая эпилепсия.
- Острые инфекционные заболевания, респираторные и психические заболевания.

Профилактическая мастэктомия с одномоментной реконструкцией внесена в Перечень медицинских технологий, разрешенных к применению в медицинской практике на 18 марта 2011

www.roszdravnadzor.ru



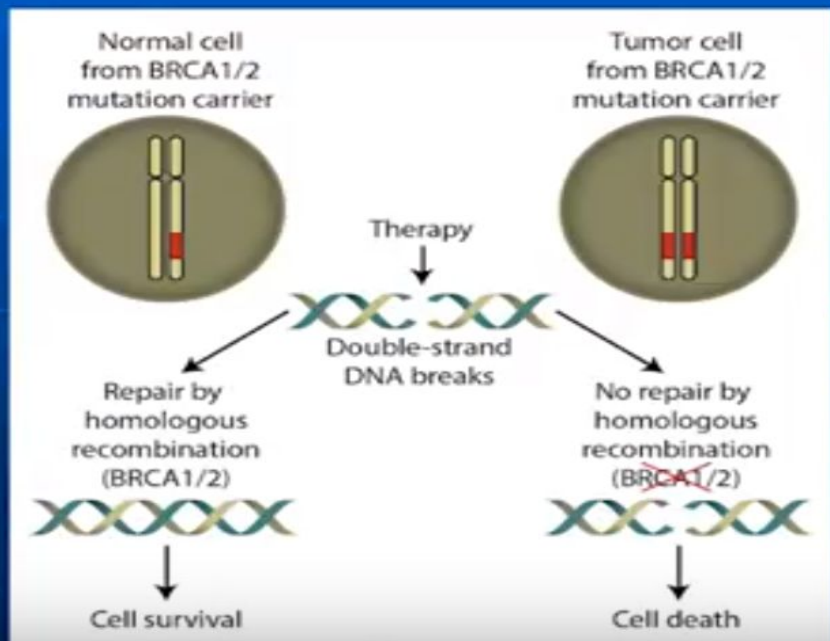
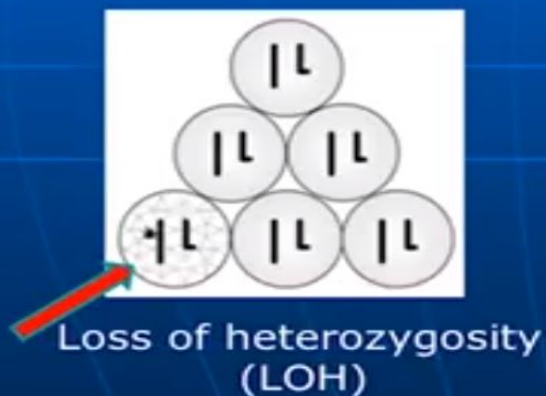
Показания:

- 2 родственников первой или второй степени с раком груди в возрасте до 50 лет
- 3 родственников первой или второй степени с раком груди в возрасте до <60 лет
- 4 с раком груди в любом возрасте
- 1 с раком яичников в любом возрасте + 1 с раком груди < 50 лет
- 1 с раком яичников + 2 с раком груди < 60 лет
- 2 с раком яичников в любом возрасте

BRCA1 – ассоциированные опухоли – подходы к терапии



- Опухоль-специфическая утрата оставшегося аллеля BRCA1/2



- Пациенты хорошо отвечают на лечение фармакологическими ингибиторами PARP1 (поли(АДФ-рибоза)-полимераза (PARP), которая представляет собой фермент, играет многофункциональную роль во многих клеточных процессах, включая репликацию ДНК, репарацию, рекомбинацию, генную транскрипцию, клеточную пролиферацию и гибель. Благодаря своей роли в стабилизации генома, PARP функционирует как кофактор, подавляющий канцерогенез)

- Опухоли реагируют на химио-терапию, основанную на препаратах платины



База
данных



наследственной предрасположенностью к РМЖ и/или РЯ

**BRCA-генотипированные
больные РМЖ/РЯ
N~6 500**

Динамическое
наблюдение
(ММГ, УЗИ, МРТ)

В 32% случаях выявлен КРМЖ



Профилактическая
хирургия



Выбор тактики
лечения
PARP-ингибиторы



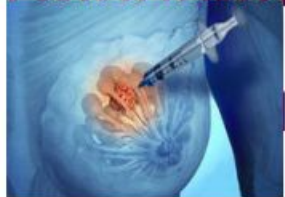
В «РОНЦ им.Н.Н. Блохина»
выполнено 110 ПКМ при
BRCA-ассоциированном РМЖ.
В 10% случаев диагностирован
РМЖ.



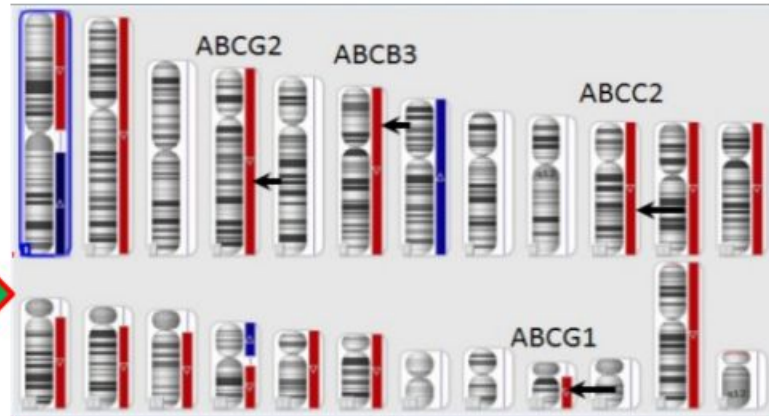
ТОМСКИЙ НИМЦ

ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО НАЗНАЧЕНИЯ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Биопсия



Микроматричное исследование



При делеции хотя одного из генов ABC-транспортеров в опухоли

Опухоль очень хорошо отвечает на химиотерапию

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, Vol. 7, No. 7

Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy

Nikolai V. Litviakov^{1,2}, Nadezhda V. Cherdyntseva^{1,2}, Matvey M. Tsyganov^{1,2}, Elena M. Slonimskaya¹, Marina K. Ibragimova¹, Polina V. Kazantseva¹, Julia Kzhyskowska^{1,2}, Eugeny L. Choinzonov¹

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОобрЕТЕНИЕ
№ 2594251

Патент RU 2594251
от 10 августа 2016 г.

СПОСОБ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО НАЗНАЧЕНИЯ ПЕЧАТЪЮБИВАТИВНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ ДОМИНАЛЬНЫМ В РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Томский научно-исследовательский институт онкологии" (Томский НИИ онкологии) (RU)

Адрес: г. Томск, ул. Обуховская

Заявка № 2013128744

Дата подачи заявки: 14 июля 2013 г.

Дата публикации в Бюллетене: 20 июля 2016 г.

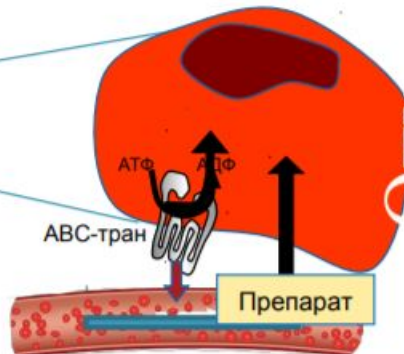
Информация о публикации: 20 июля 2016 г.

Срок действия патента: 14 июля 2033 г.

Регистратор: Федеральное государственное учреждение "Федеральный институт промышленной собственности"



Опухоль



Наследственный рак предстательной железы



- генетическое заболевание с аутосомно-доминантным характером наследования
- 43% пациентов моложе 55 лет

Генетические факторы

- **HOXB13** – транскрипционный фактор. Мутация G84E (OR 1/4 4.07, 95% CI: 3.05– 5.45). Частота 1,5%.
- **BRCA2** - ген системы репарации. Мутации 999del5, 6174delT (RR 1/4 7.8, 95% CI: 1.8–9.4). Частота 2%.
- **RNASEL** - эндорибонуклеаза. Мутации D541E, R462Q, I97L. Частота 1,4%.
- **ELAC2** – тРНК эндорибонуклеаза. Мутации Ser217Leu,

Ключевые молекулярные маркеры рака предстательной железы



Хромосомные транслокации

**Экспрессия
химерных онкогенов**
TMPRSS2/ERG4,
TMPRSS2/ETV1,
TMPRSS2/ETV4

Делеции

**Анализ потери гетерозиготности
и микросателлитной
нестабильности локусов 8p22,
16q23 и 13q14**

Эпигенетические изменения

**Метилирование
генов *p16*, *HIC1*, *N33* и
GSTP1 в ткани
предстательной железы и
микродиссекционных
образцах**

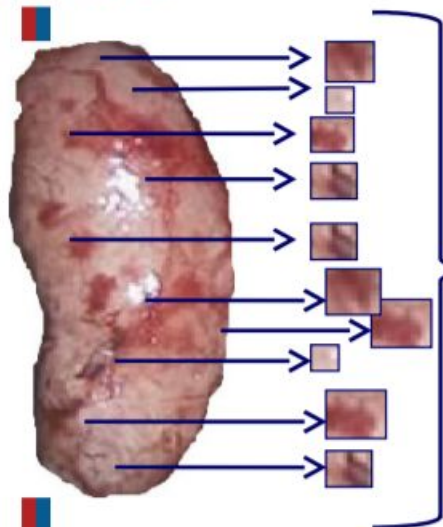


Что дальше?...

ТОМСКИЙ НИМЦ

ПРЕЦИЗИОННАЯ МЕДИЦИНА,
направленная на решение
проблемы гетерогенности
внутриопухолевой

Определение естественной эволюции
опухоли у каждого пациента
доминантных и минорных клонов
выделение опухолевых клонов

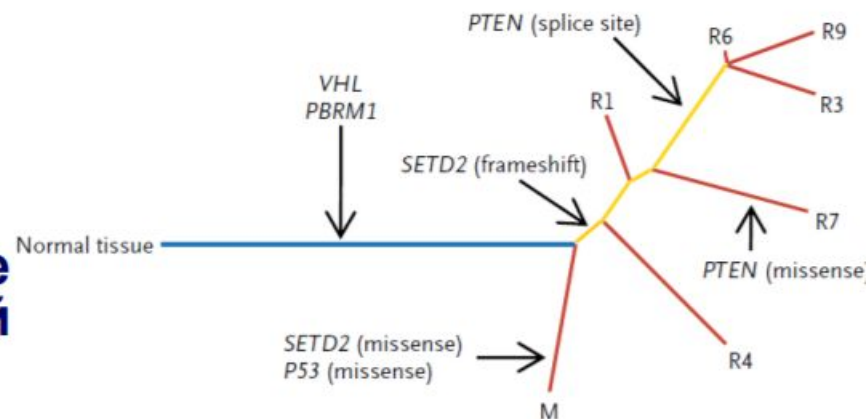
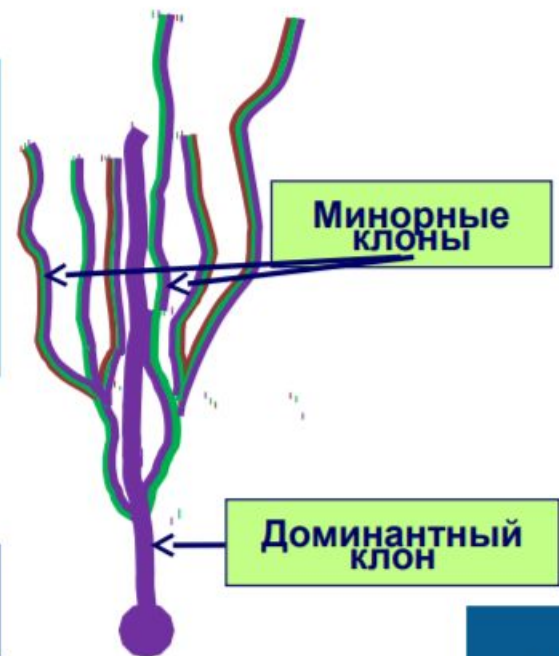


Секвенирование различных частей опухоли



Построение дерева клональной эволюции опухоли в процессе канцерогенеза

Выделение доминантного и минорных клонов, подбор таргетных препаратов на доминантный клон



Gerlinger M., et al., / *New England Journal of Medicine.* – 2012. – V. 366, N 10. – P. 883-892.



Предсказание риска заболевания (первичная профилактика – изменение образа жизни, ранняя диагностика, эффективное лечение)

Персонализированное назначение лекарственной терапии на основе изучения предикторов чувствительности, резистентности и токсичности к отдельным препаратам

Предсказание эффективности хирургических вмешательств и физических методов лечения

Прогноз прогрессирования заболевания

Что должен сделать Врач, чтобы терапия была эффективной и безопасной?

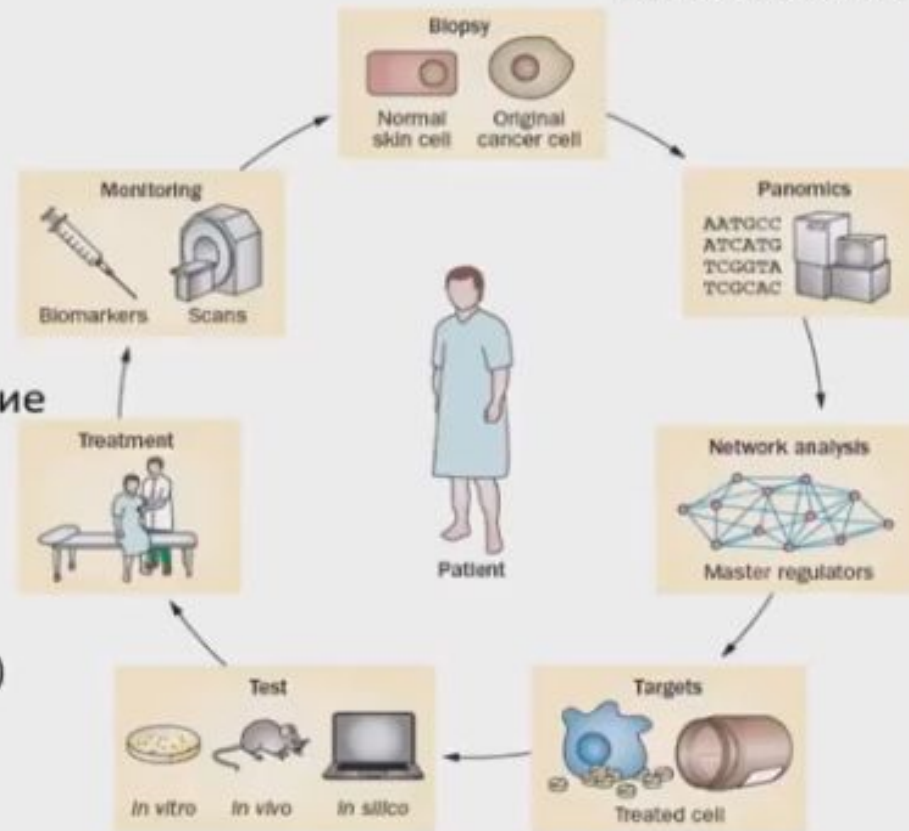
Он должен овладеть методологией персонализированной медицины.



Завтра: персональная онкология 3.0!

Nat Rev Clin Oncol, 2014

- Максимально подробная молекулярная картина опухоли
- Омиксные технологии
- Определение сигнальных каскадов 'драйверов' онкогенеза
- Продвинутое математические алгоритмы для анализа данных
- Опора на существующие молекулярные данные (например, exceptional responders)
- Мониторинг изменений в организме пациента (работает ли терапия?)
- Борьба с гетерогенностью опухоли



Наиболее информативный и эффективный подход!