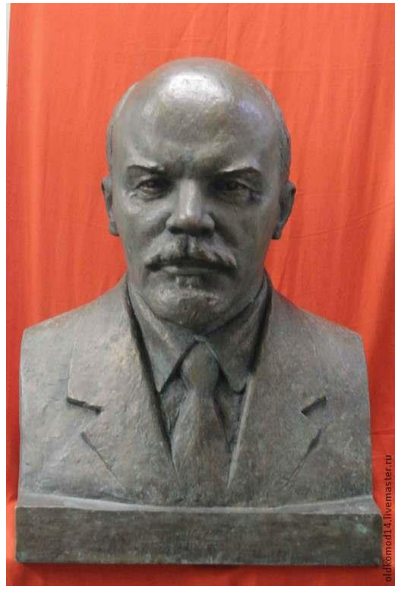


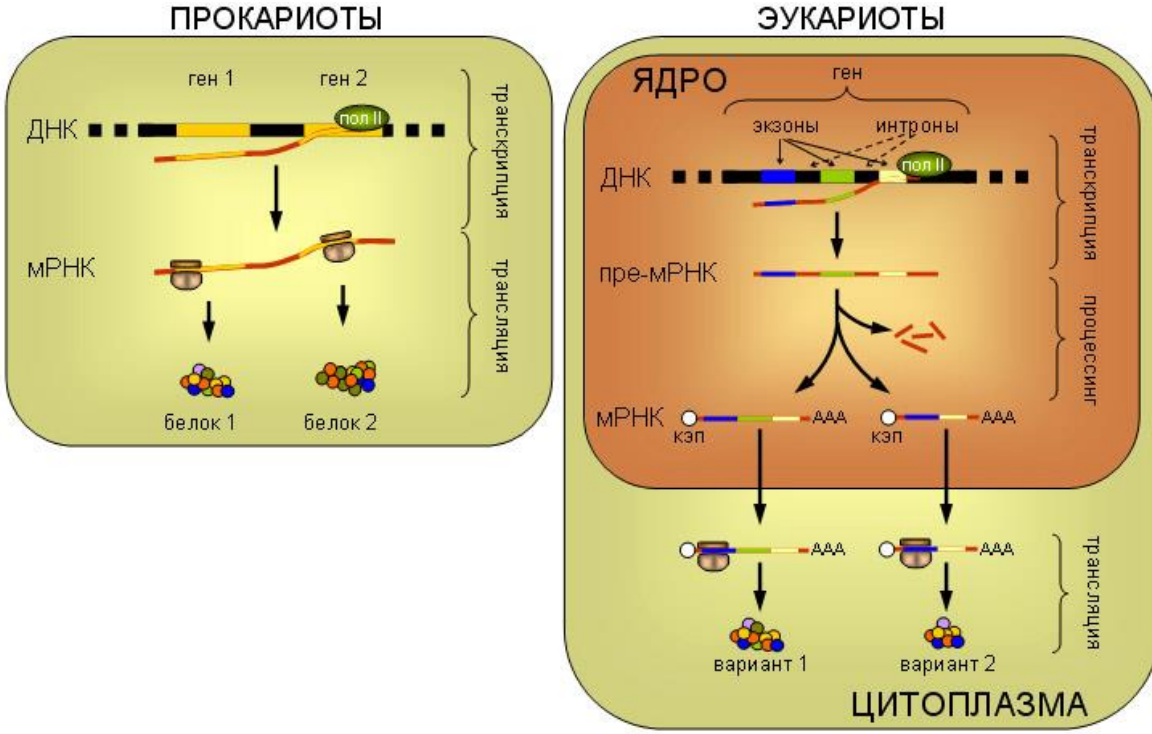
Нам надо, чтобы наука действительно входила в плоть и кровь, превращалась в составной элемент быта вполне и настоящим образом.

В. И. Ленин

Центральная догма молекулярной биологии — обобщающее наблюдаемое в природе правило реализации генетической информации:

информация передаётся от нуклеиновых кислот к белку, но не в обратном направлении.

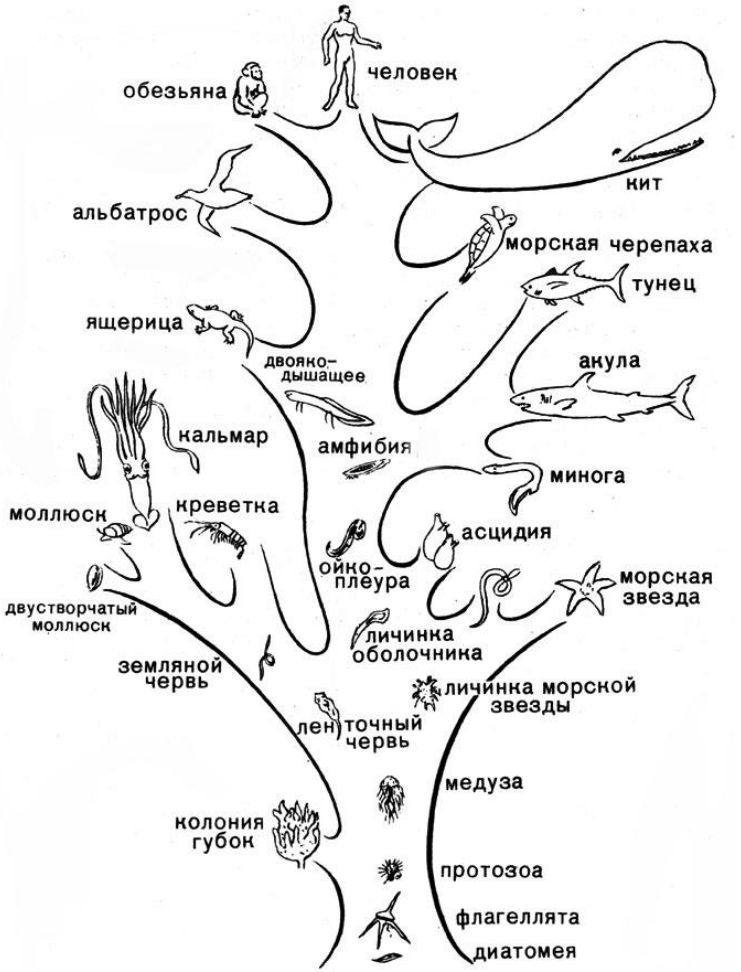
Правило было сформулировано Френсисом Криком в 1958 году и приведено в соответствие с накопившимися к тому времени данными в 1970 году. Переход генетической информации последовательно от ДНК к РНК и затем от РНК к белку является универсальным для всех без исключения клеточных организмов, лежит в основе биосинтеза макромолекул



Общие	Специальные	Неизвестные
ДНК → ДНК	РНК → ДНК	белок → ДНК
ДНК → РНК	РНК → РНК	белок → РНК
РНК → белок	ДНК → белок	белок → белок

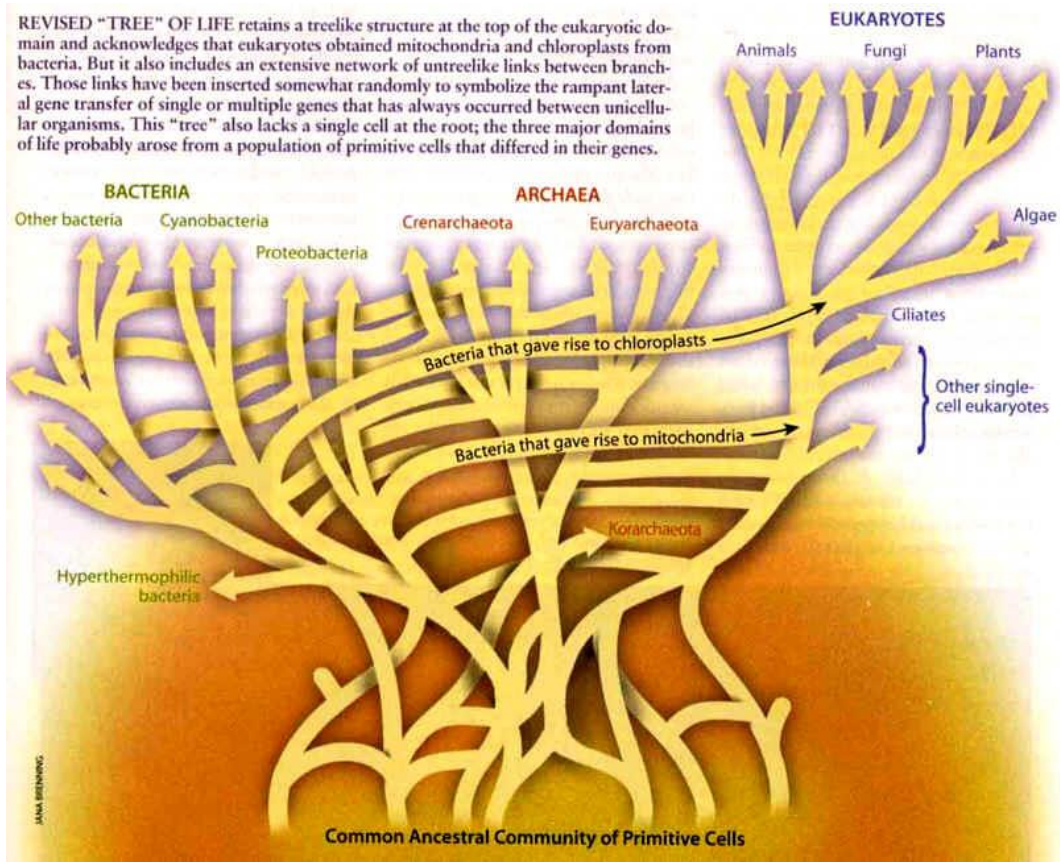
Революция в биологии

Было

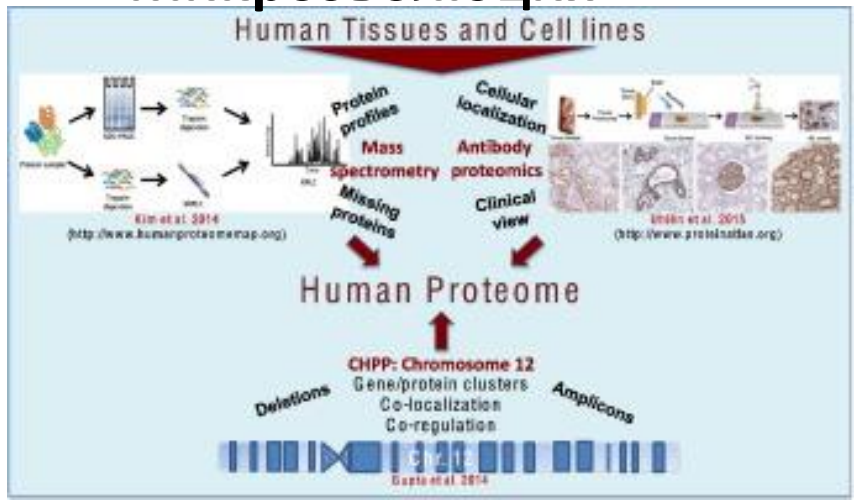


Эволюция

Стало



Микроэволюция



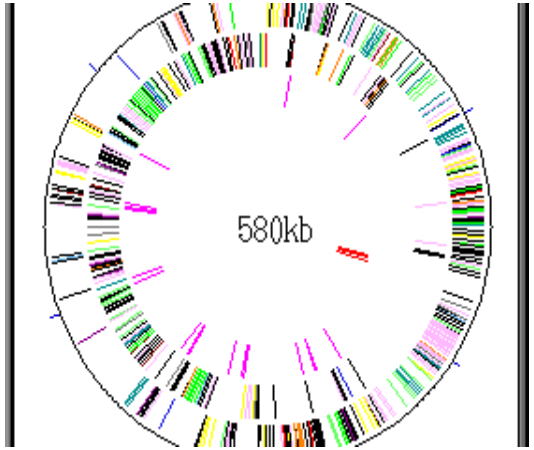
Mycoplasma genitalium

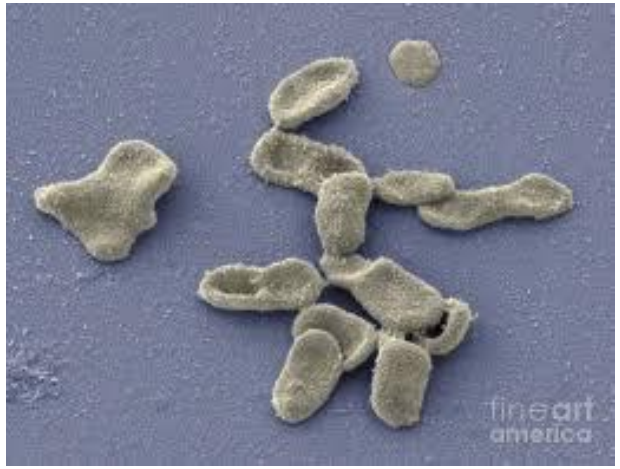
— вид паразитических бактерий, живущих в половых и дыхательных системах приматов.

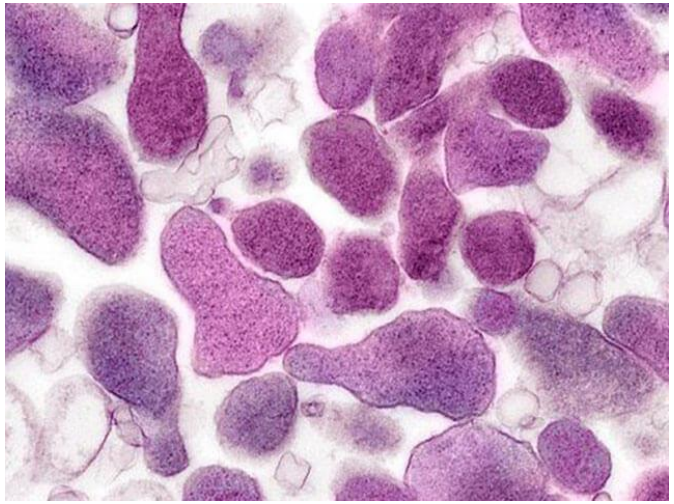
Ещё недавно считалась организмом с наименьшим известным размером генома (500 генов).

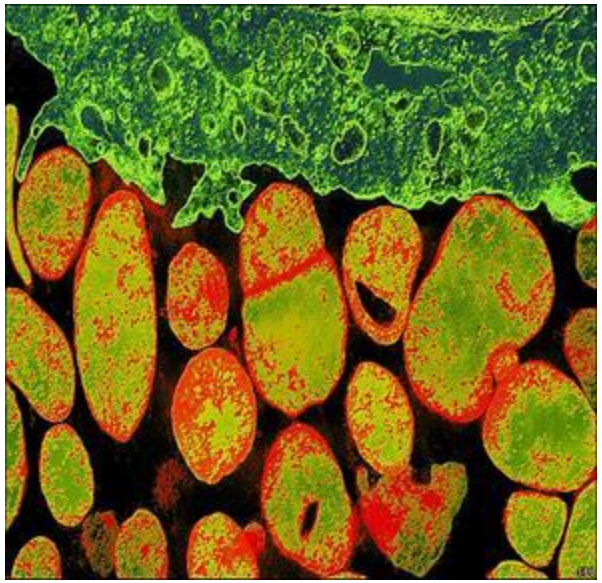
В 2002 году была открыта архея Nanoarchaeum equitans с ещё более коротким геномом. Из известных к настоящему моменту бактерий наименьший геном имеет Carsonella ruddii. Ещё меньший геном имеют вирусы, но они не являются независимыми организмами.

Mycoplasma genitalium была впервые выделена из образца отделяемого уретры пациентов с негонококковым уретритом. Она может быть найдена в реснитчатых клетках эпителия мочеполового и дыхательного трактов.









Прочитана последовательность нуклеотидов, собранных у человека в 25 томов – 22 аутосомы, X- иY-хромосомы и M-хромосома

В геноме человека 3,5 млрд пар нуклеотидов

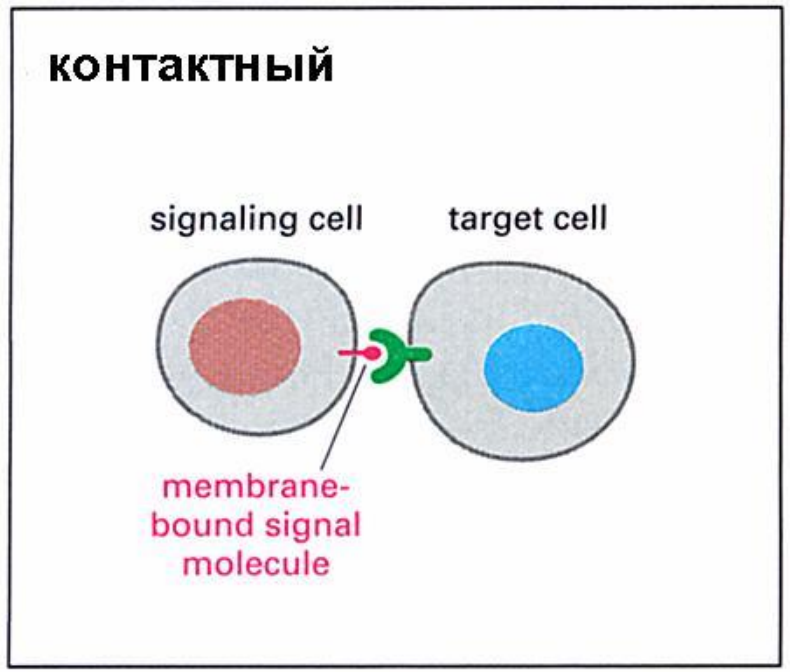
С-парадокс – у человека ДНК в геноме столько же, сколько у гороха и кукурузы, но в 5 раз меньше, чем у репчатого лука и в 20 раз меньше, чем у сосны

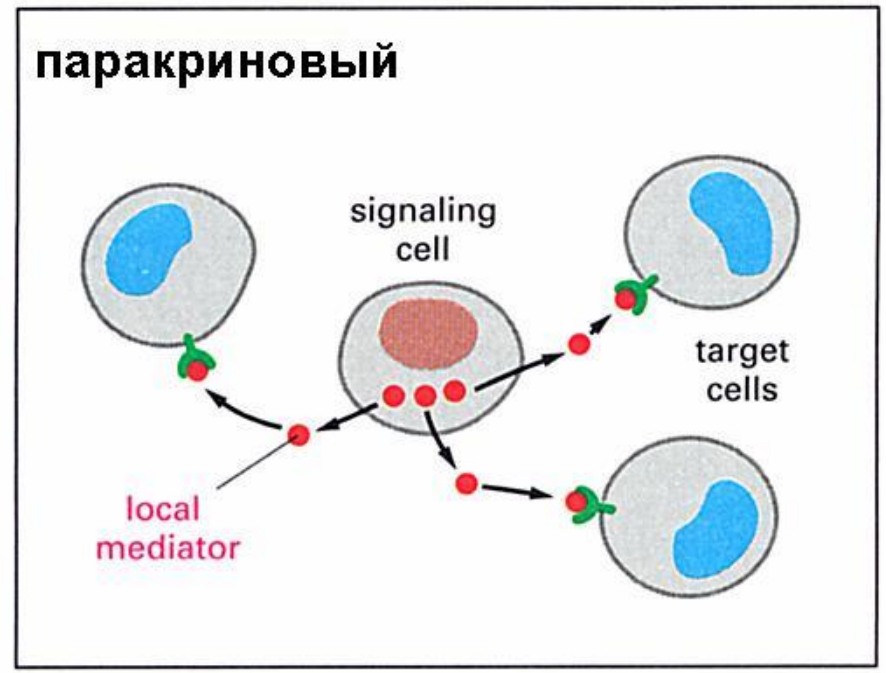
Лягушки, жабы и тритоны – чемпионы по содержанию ДНК в геноме, у них ДНК приблизительно в 25 раз больше, чем у любого из видов млекопитающих

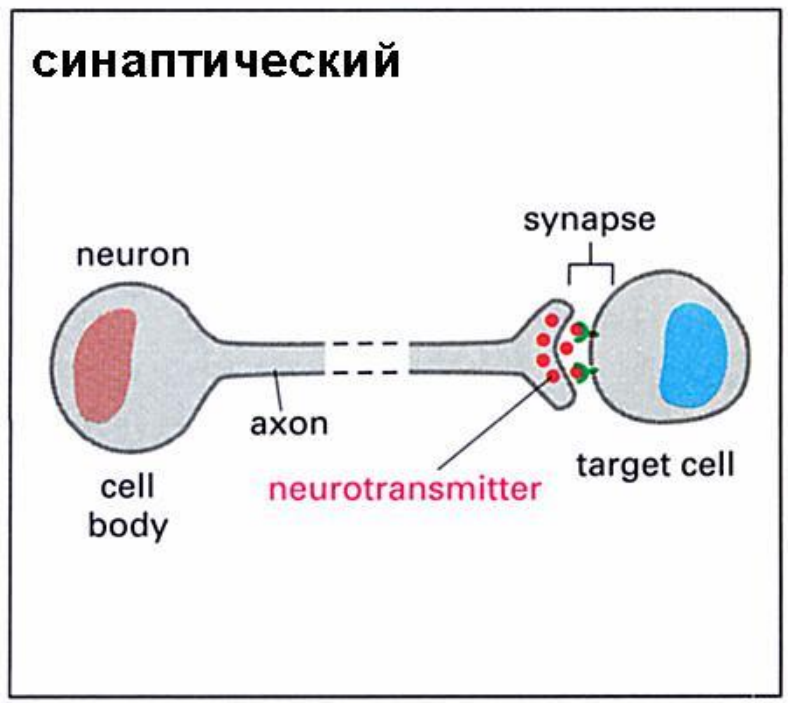
У C.Elegans 1 тыс клеток и 40 тыс генов, у человека 10 в 14 степени клеток и 25 тыс генов

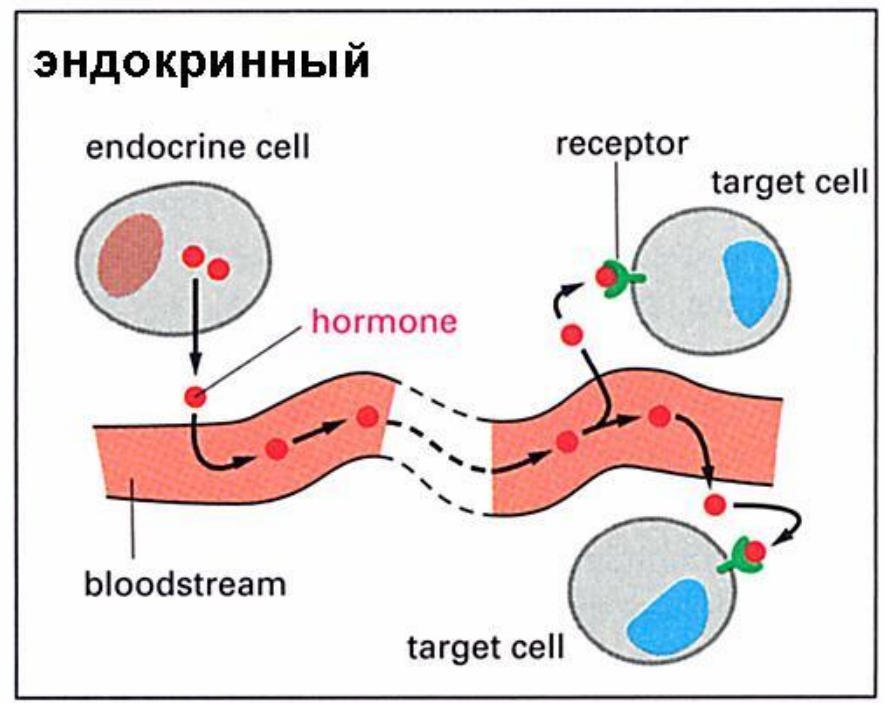
Экономичность в использовании генов достигается альтернативным сплайсингом

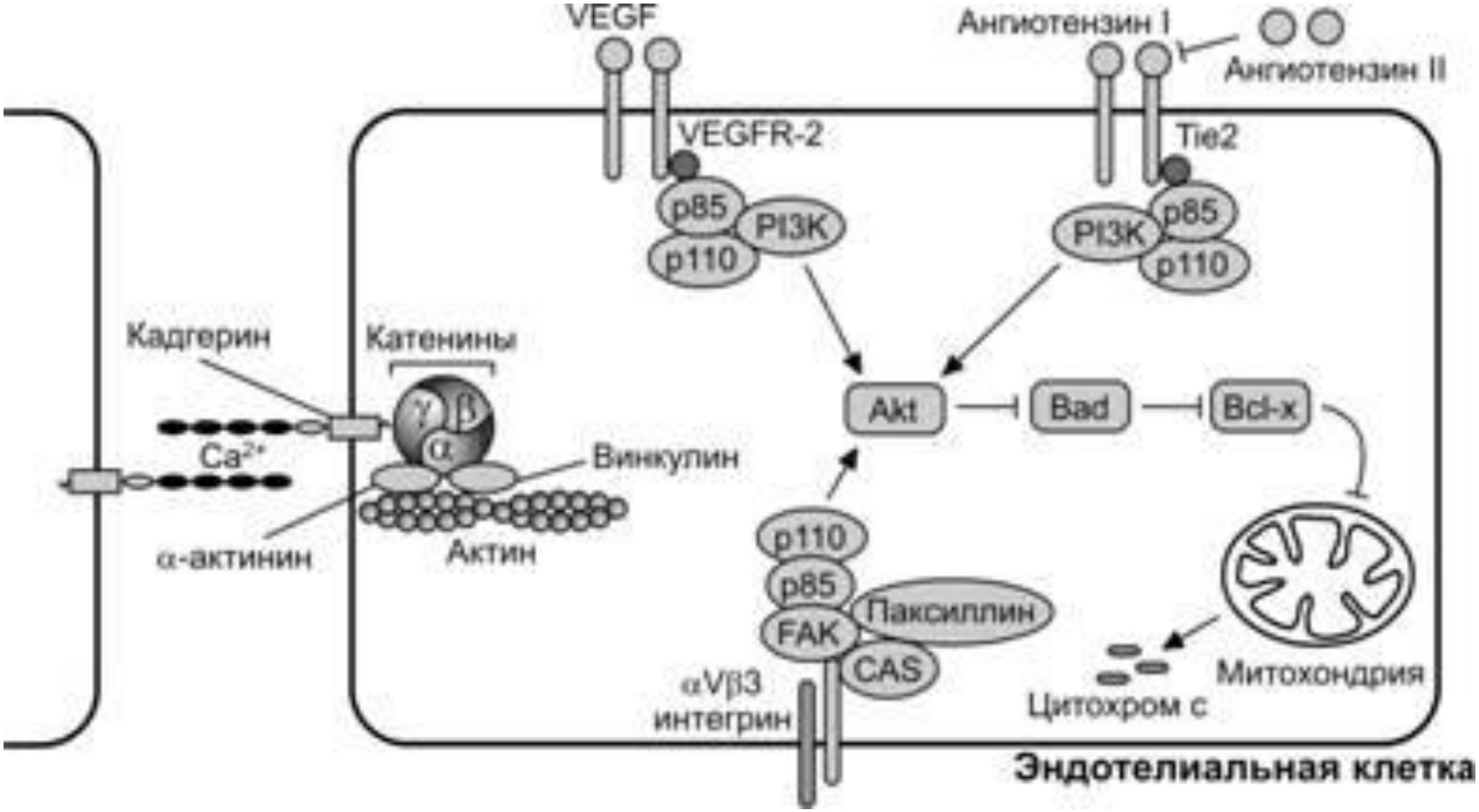
Пример- альтернативный сплайсинг в гене Bcl-x дает две формы белка. Bcl-x L запускает апоптоз, а Bcl-x S ингибирует

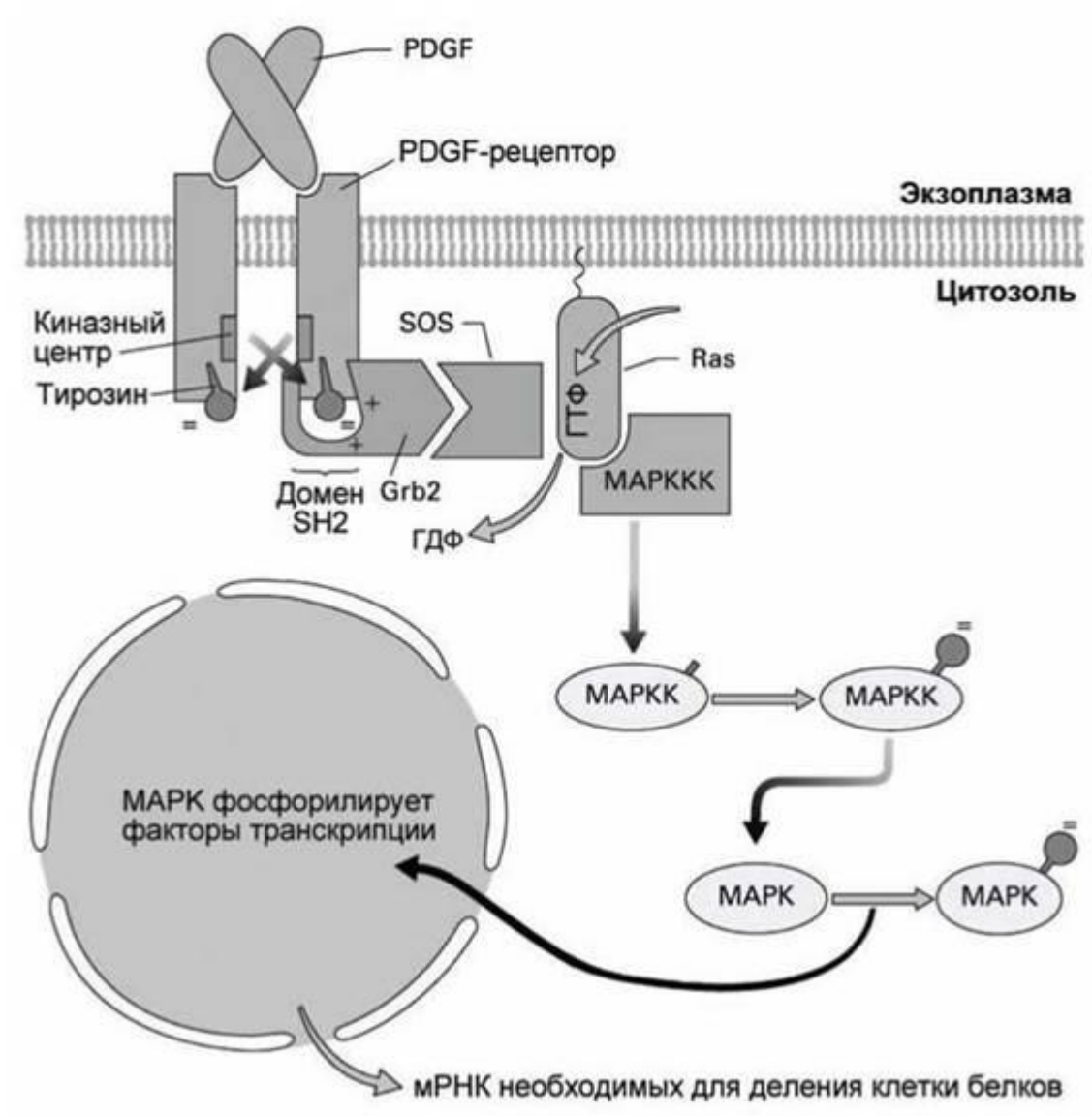

контактный
signaling cell
target cell
membrane-
bound signal
molecule

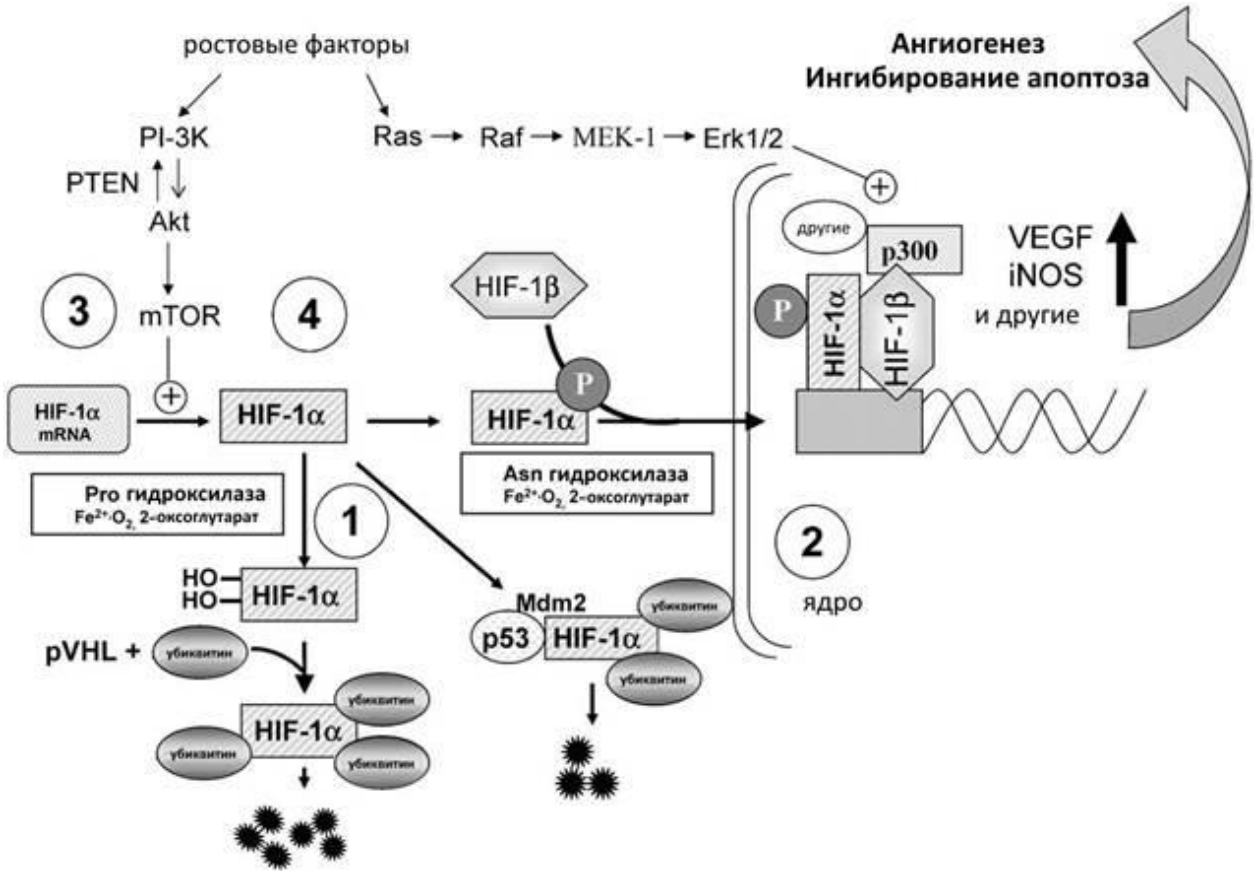

паракриновый
signaling
cell
target
cells
local
mediator

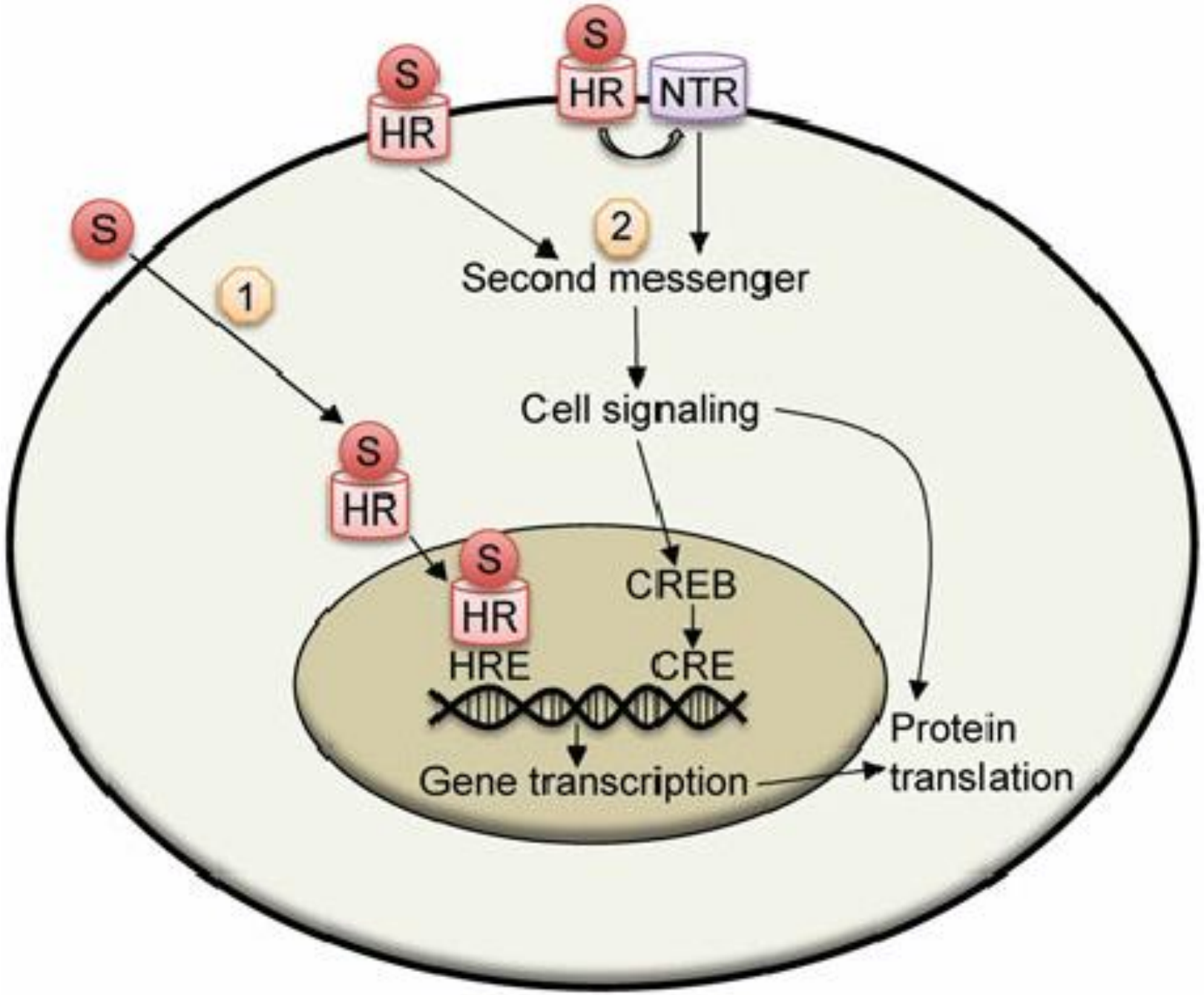

синаптический
synapse
neuron
axon
cell
body
neurotransmitter
target cell


эндокринный
endocrine cell
receptor
target cell
hormone
bloodstream
target cell

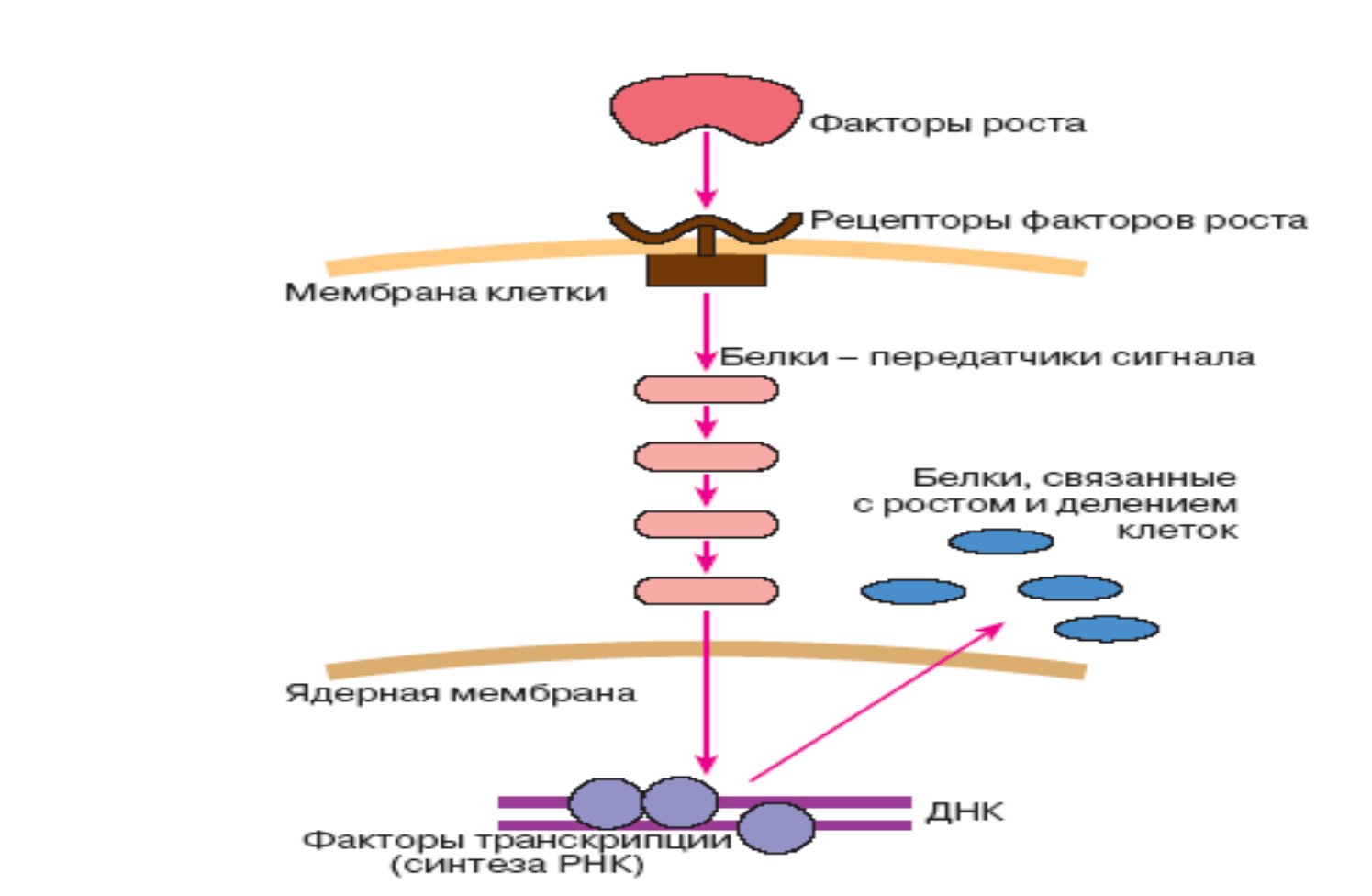

VEGF
Ангиотензин I
Ангиотензин II
VEGFR-2
Tie2
p85
PI3K
p110
PI3K
p85
p110
Кадгерин
Катенины
γ
β
α
Akt
Bad
Bcl-x
Ca2+
Винкулин
α-актинин
Актин
p110
p85
Паксиллин
FAK
CAS
αVβ3
интегрин
Цитохром с
Митохондрия
Эндотелиальная клетка


PDGF
PDGF-рецептор
Экзоплазма
Цитозоль
Киназный центр
Тирозин
SOS
Ras
ГТФ
Домен SH2
Grb2
ГДФ
МАРККК
МАРКК
МАРКК
МАРК
МАРК
МАРК фосфорилирует факторы транскрипции
мРНК необходимых для деления клетки белков

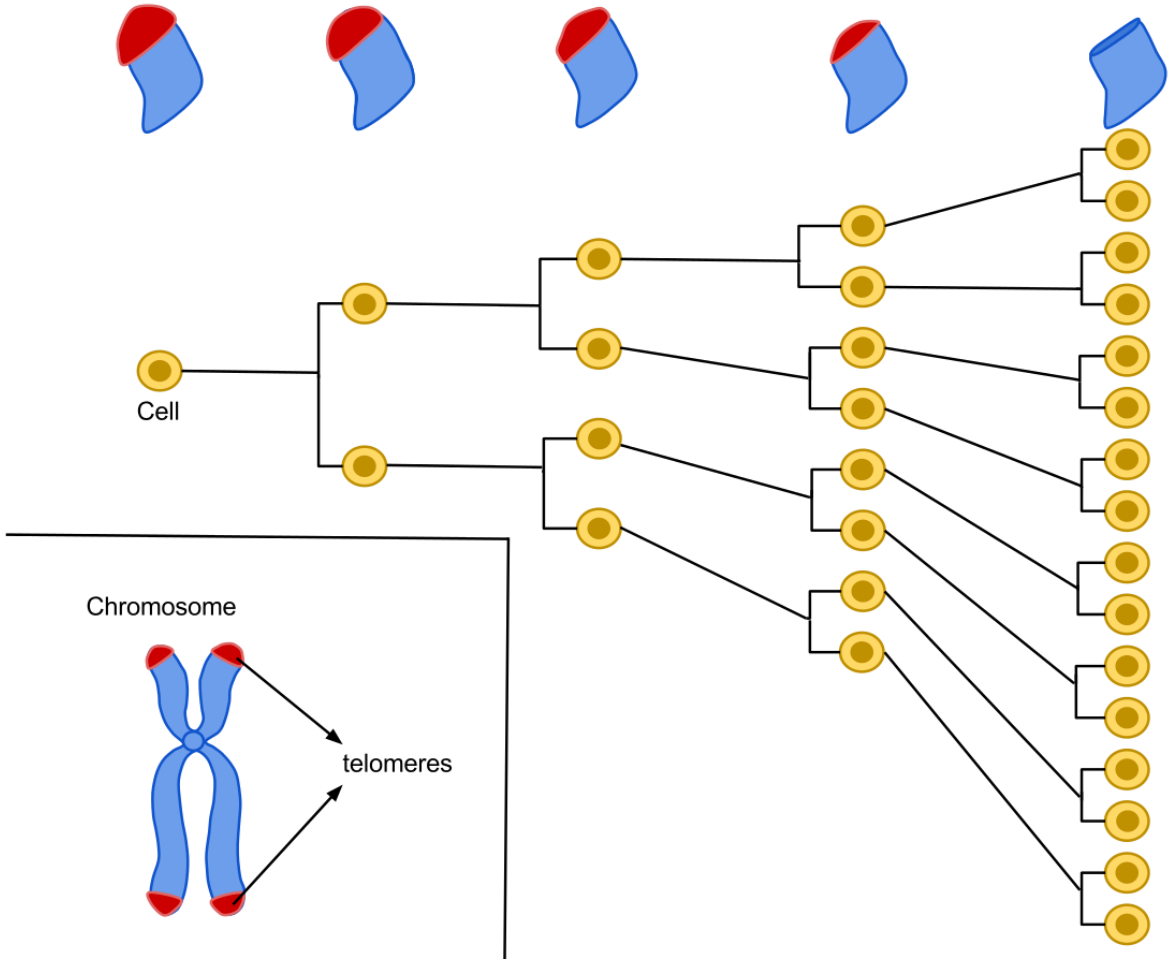

ростовые факторы
Ангиогенез
Ингибирование апоптоза
PI-3K
Ras → Raf → MEK-1 → Erk1/2
PTEN
Akt
3
mTOR
4
HIF-1β
другие
p300
VEGF
iNOS
и другие
P
HIF-1α
HIF-1β
HIF-1α mRNA
HIF-1α
HIF-1α
Pro гидроксилаза
Fe2+·O2, 2-оксоглутарат
Asn гидроксилаза
Fe2+·O2, 2-оксоглутарат
1
2
ядро
HO
HO
HIF-1α
Mdm2
p53
HIF-1α
убиквитин
pVHL +
убиквитин
HIF-1α


S
HR
S
HR
NTR
S
1
2
Second messenger
Cell signaling
S
HR
S
HR
CREB
HRE
CRE
Protein
translation
Gene transcription

Основные этапы передачи сигнала для роста от мембраны до клеточного ядра



Для большинства человеческих клеток предел **Хейфлика** составляет 52 деления.
Граница **Хейфлика** связана с сокращением размера теломер, участков ДНК на концах хромосом.
Клетки, в которых функционирует **теломераза** (половые, раковые), бессмертны.



Канцерогенез. Молекулярные механизмы опухолевой трансформации.

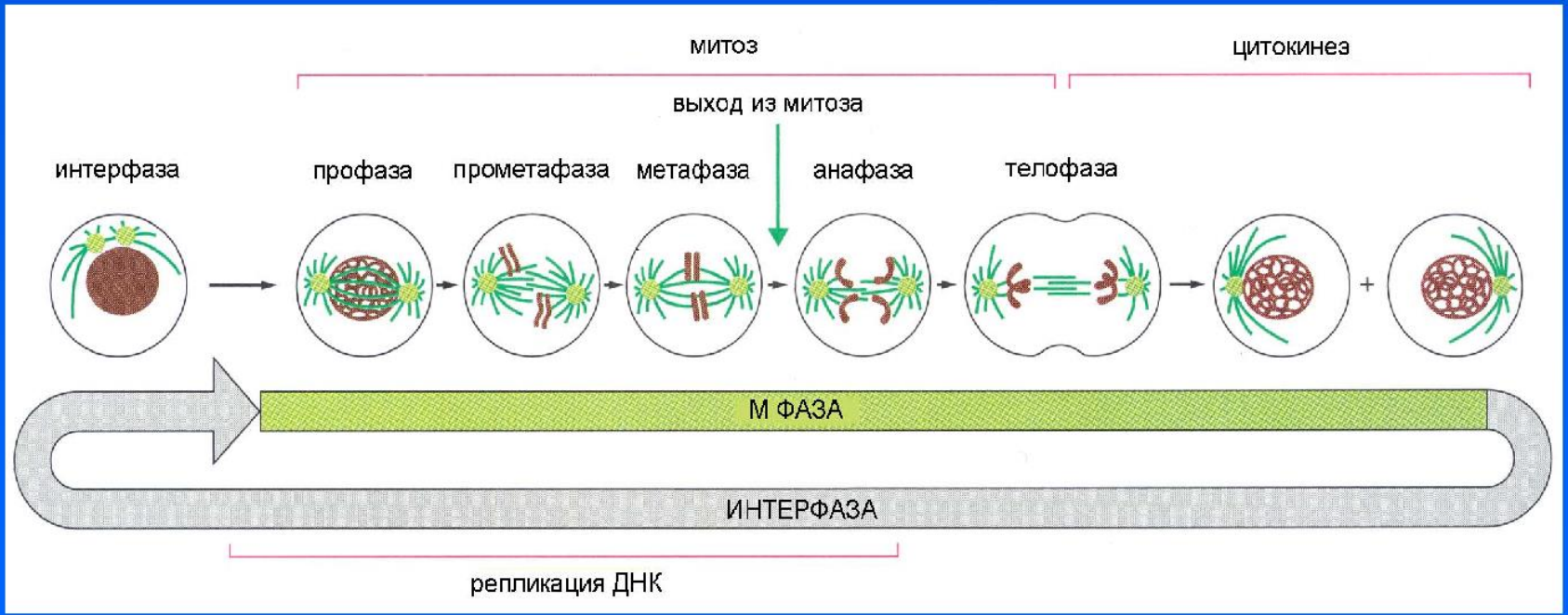
О.В.Островский

Канцерогенез

(в переводе с лат. cancerogenesis; cancero — рак, и с греч. genesis, зарождение, развитие) — сложный патофизиологический процесс зарождения и развития опухоли.

- Рак это группа заболеваний, характеризующая ненормальным и неконтролируемым ростом клеток
- Рак возникает в результате потери контроля над нормальным ростом клетки
- В нормальных тканях уровень размножения клеток и уровень клеточной смерти находится в равновесии
- При раке это равновесие нарушается
- Это нарушение произойти при
    1) неконтролируемом делении клеток
    2) потере клетками способности к апоптозу
- Раковые клетки не растут быстрее, чем нормальные клетки - просто их рост неконтролируемый
- Рак вызывается изменениями или мутациями генов

Клеточный цикл



Фазы клеточного цикла

Клеточный цикл: митоз и интерфаза.

Интерфаза: общая продолжительность (в соматических клетках млекопитающих) – около суток.

Интерфаза подразделяется на периоды G_1, S (синтез ДНК) и G_2 – опыты с импульсным мечением ДНК (Говард и Пелк).

G_1 (пресинтетический) – наиболее вариабельный период.

S-период – 6-8 часов.

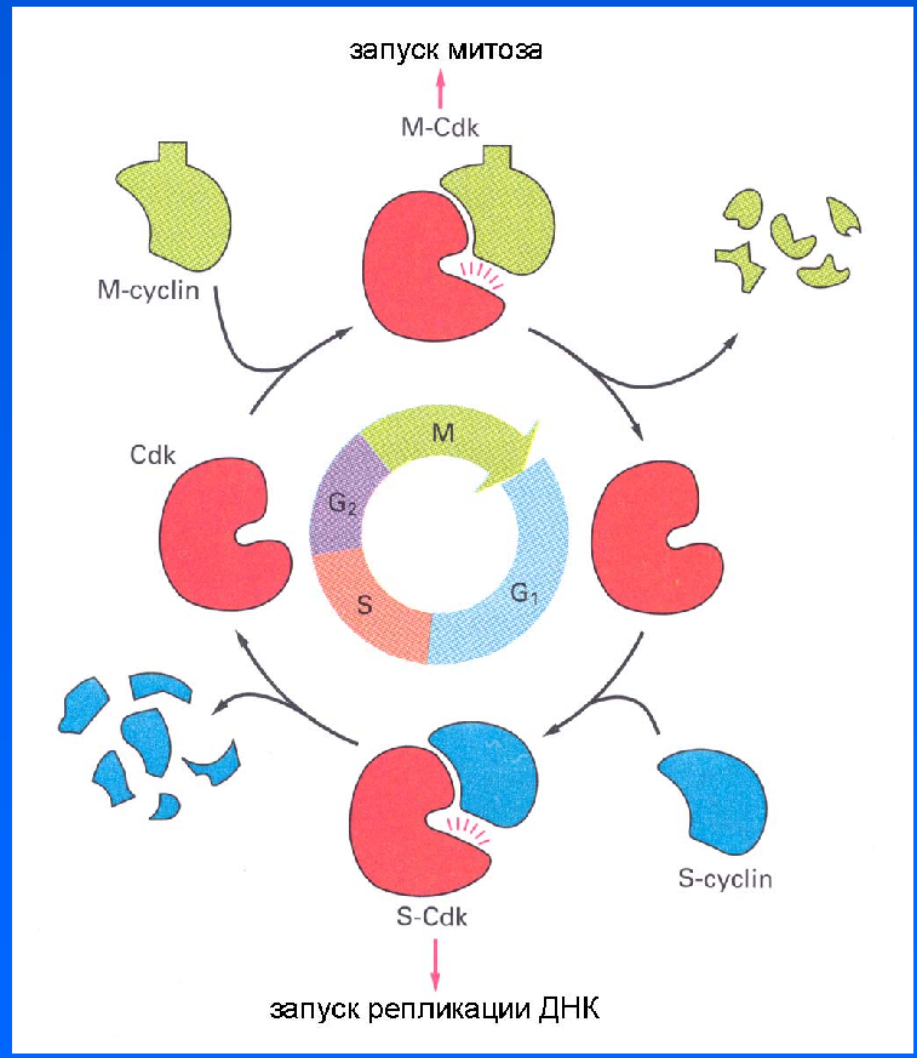
G_2 (постсинтетический период) – от 3 до 6 часов.

Рост клетки – наиболее быстрый в G_2 периоде.

Во время митоза транскрипция подавляется на 100%, трансляция – более чем на 90%.

Выход из/вход в клеточный цикл происходит, как правило, G_1-периоде.

Клеточный цикл – основной комплекс



Cdk – циклин-зависимая киназа (аналог cdc2)

M-cyclin – циклин Б

S-cyclin – циклин А

Cdk стабильны, а циклины – нет (разрушаются протеасомами).

Взаимодействие циклинов и циклин-зависимых киназ

Циклины не обладают каталитической активностью.

Циклин-зависимые киназы неактивны без комплекса с циклинами.

Активация комплексов киназа-циклин носит нелинейный характер, что обеспечивает гиперчувствительность к сигналам.

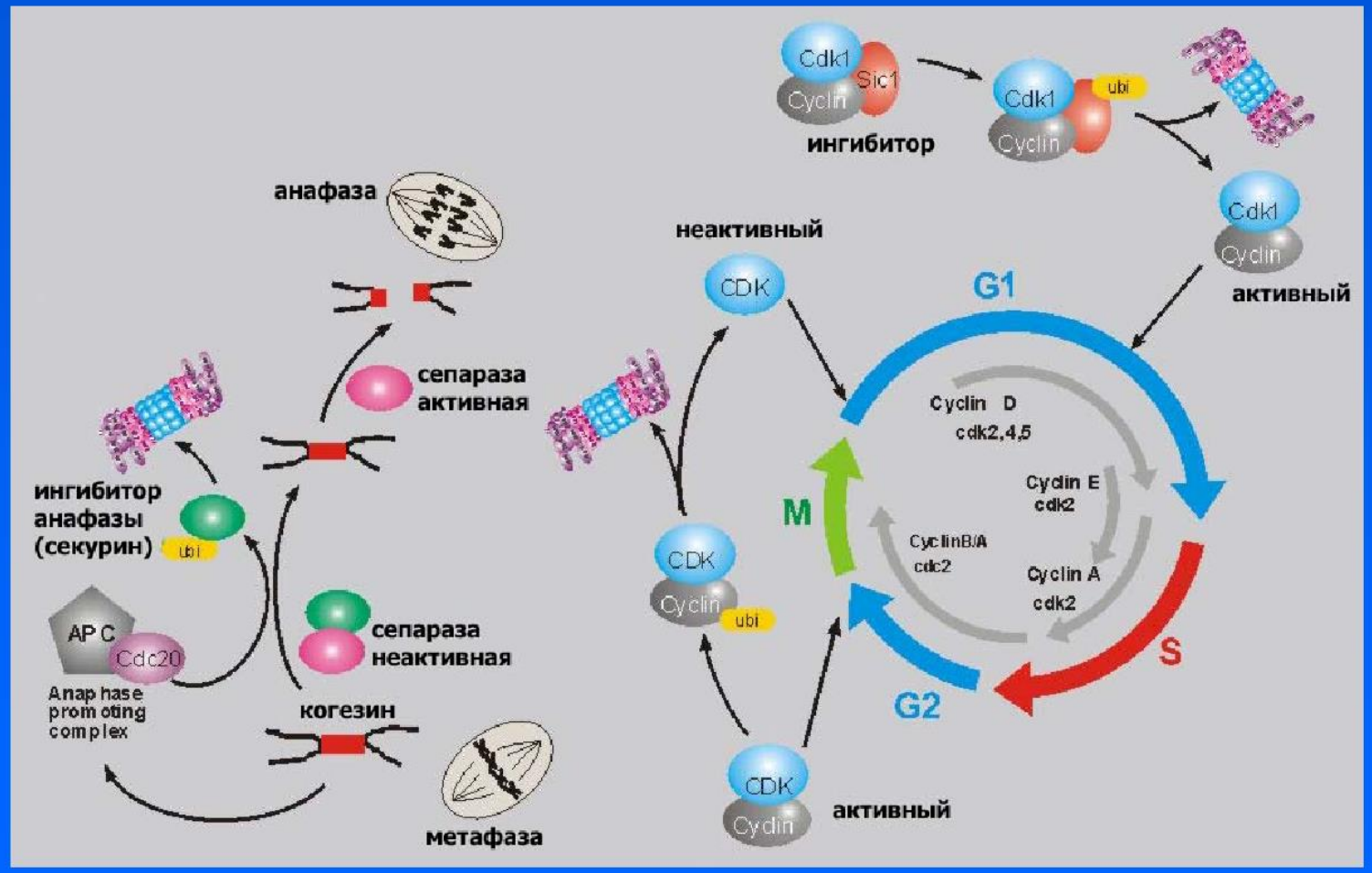
Последовательность работы основных циклинов:

В ответ на пролиферативный стимул синтезируется циклин Д. Он связывается со специальной киназой, и запускает синтез транскрипционных факторов, которые обеспечивают синтез циклина Е, циклина А и ферментов для синтеза ДНК.

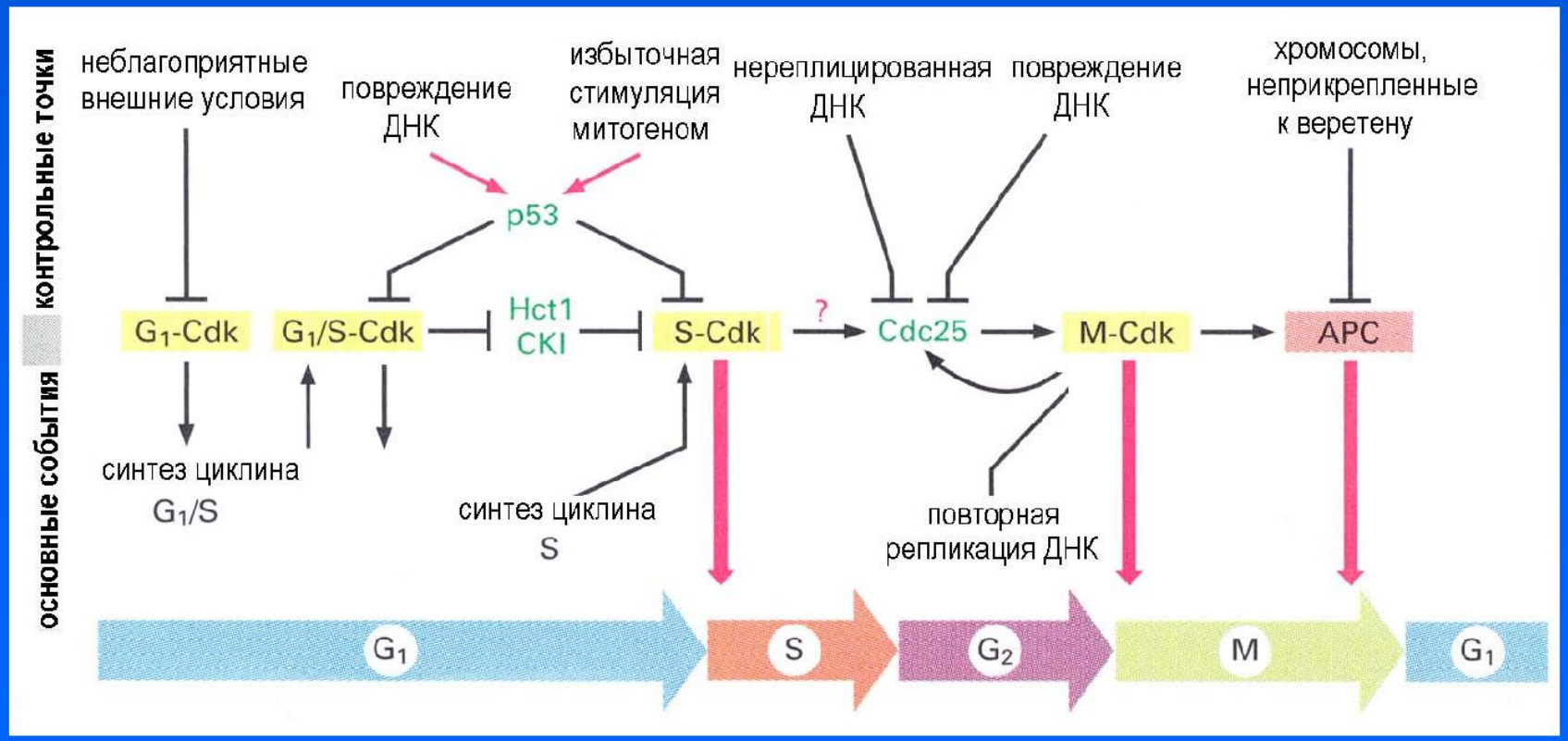
Циклин Е связывается с киназой и запускает S-фазу.

Циклин Б связывается с киназой и запускает профазу. Выход из митоза происходит при разрушении комплекса циклина Б с киназой.

Клеточный цикл – общая схема



Клеточный цикл – общая схема ингибирования



Контрольные точки клеточного цикла

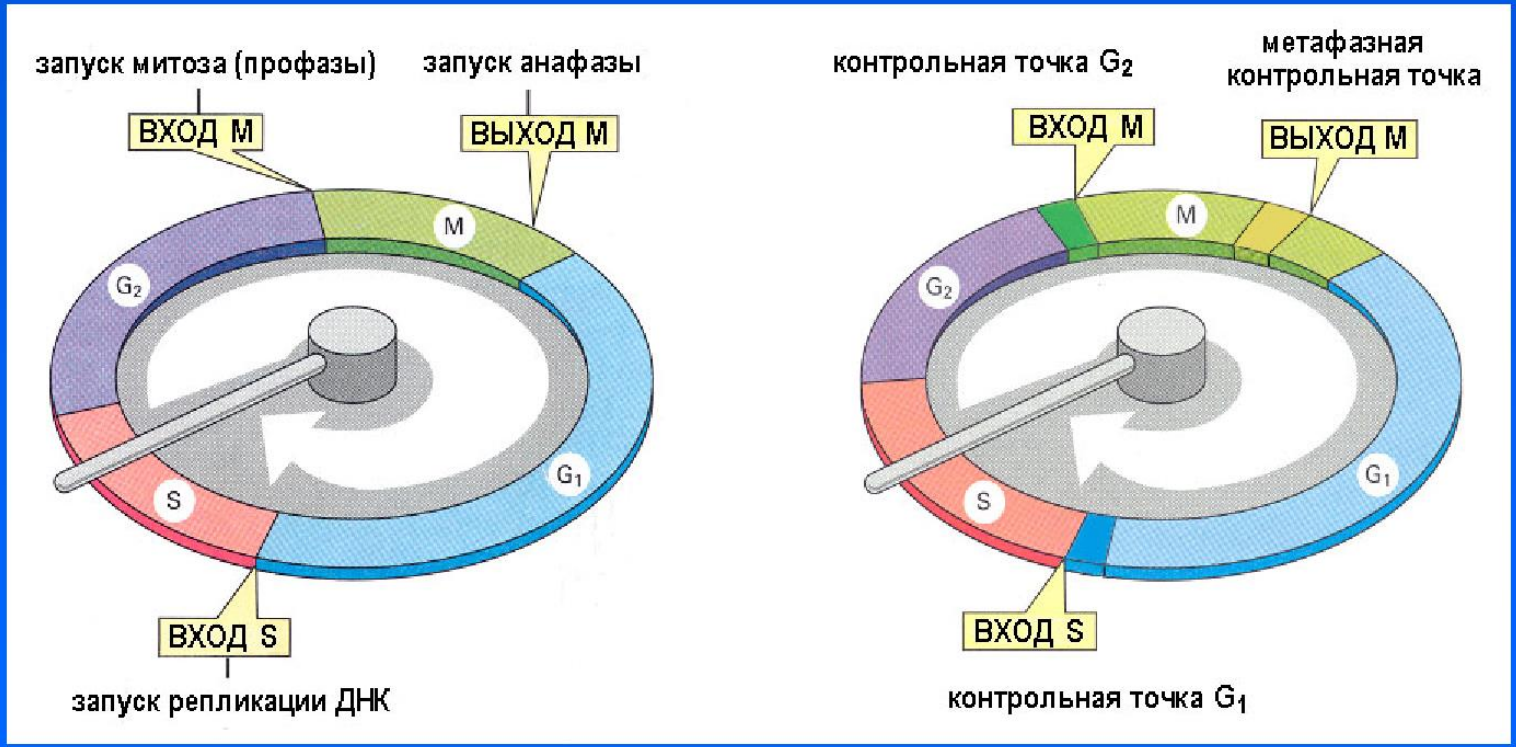
Контрольная точка – этап клеточного цикла, непрохождение которого индуцирует программу, альтернативную пролиферации.

G1/S – проверка повреждений в ДНК (зависит от p53) и разрешение на начало синтеза ДНК. При непрохождении, как правило, запускается репарация ДНК.

G2/M – проверка повреждений в ДНК (зависит от p53) – вход в митоз. При непрохождении, как правило, запускается апоптоз.

Метафаза/анафаза – проверка биполярного прикрепления хромосом. Специальный комплекс (APC – anaphase promoting comples) разрешает завершение митоза и восстановление интерфазного ядра. Короткая задержка в метафазе обратима. При длительной задержке запускается апоптоз.

Клеточный цикл – контрольные точки



Регуляция синтеза ДНК

Положительный контроль репликации: лицензирование.

Узнающий комплекс (origin recognition complex) ДНК-полимеразы дополняется лицензирующими факторами и белками MCM (mini chromosome maintenance proteins).

Узнающий комплекс садится на определенные последовательности ДНК – ori (origin). У прокариот – одна последовательность на хромосому, у эукариот – много.

В процессе репликации белки MCM отделяются от ДНК и лицензирующие факторы разрушаются (убиквитинизация).

Отрицательный контроль репликации: геминин. Он препятствует сборке MCM на новосинтезированной ДНК.

Геминин отсутствует в G1, накапливается начиная с S-фазы и разрушается в митозе.

Некоторые ключевые регуляторы клеточного цикла

Белок p53. Имеет центры связывания с ДНК. Двоякая роль: торможение клеточного цикла и индукция апоптоза.

Mdm2 – негативный регулятор p53.

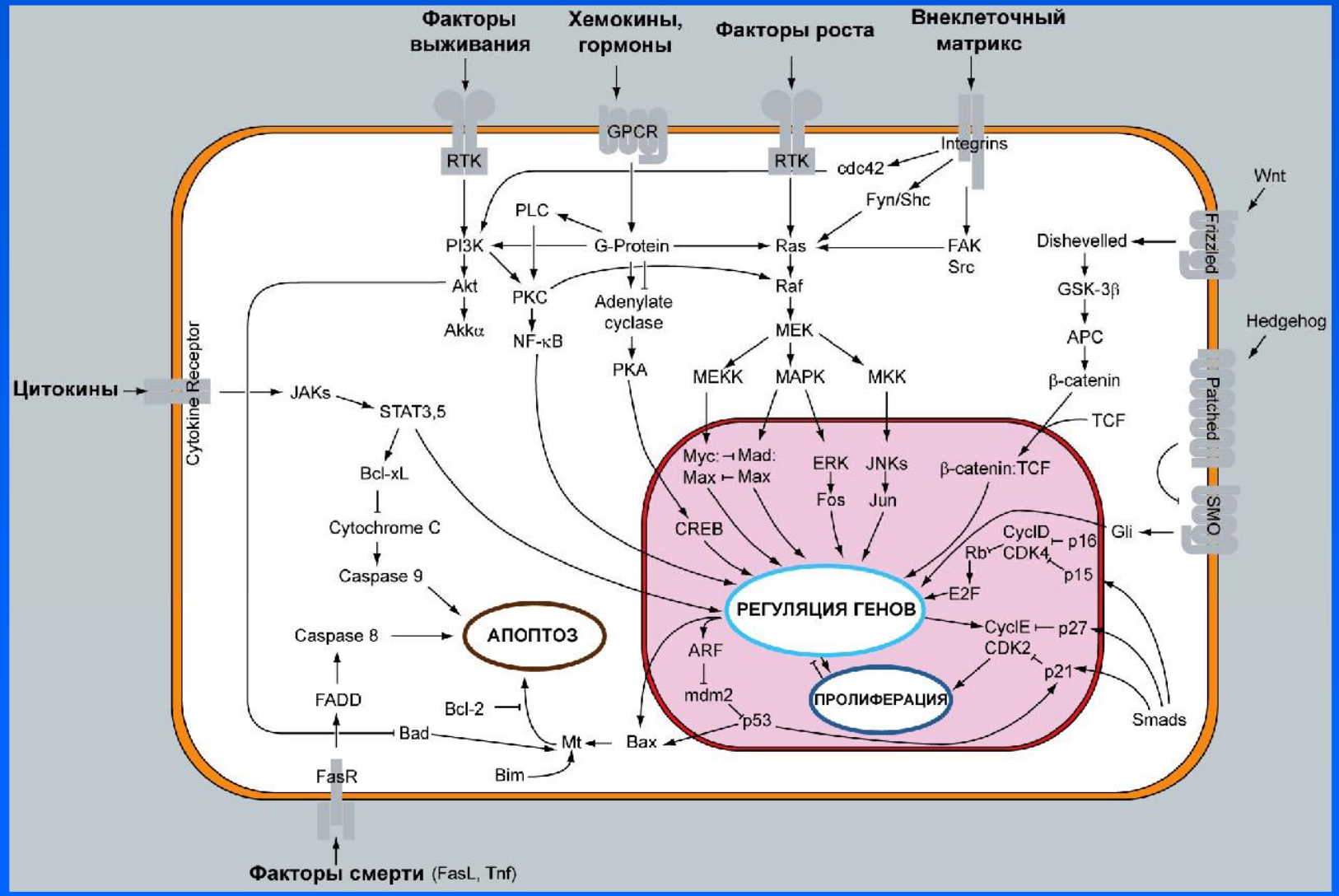
USP7 – позитивный реуглятор p53.

Белок гена ретинобластомы – Rb1. Работает в гипофосфорилированном состоянии (G1). В начале S-фазы гиперфосфорилируется и инактивируется. Неактивен в дефосфорилированном (ранний G1) и гиперфосфорилированном (S, G2, M) состояниях.

p21 – циклин-зависимый ингибитор киназ (комплексы циклин Е-киназа 2 и циклин Д – киназа 4). Активируется посредством p53 и тормозит прохождение S-фазы.

p27 – ингибитор клеточного цикла, блокирует его на стадии G1. Регулируется внешними факторами.

Регуляция клеточной пролиферации и гибели



Репарация ДНК

Репарация (от лат. *reparatio* — восстановление) — особая функция клеток, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК, повреждённых при нормальном биосинтезе ДНК в клетке или в результате воздействия физических или химических реагентов.

- Осуществляется специальными ферментными системами клетки.
- Ряд наследственных болезней (напр., пигментная ксеродерма) связаны с нарушениями систем репарации.

Виды повреждений

- **Репарируемые** удаляются собственными системами клеток
- **Нерепарируемые** возникают редко

- **Спонтанные** возникают без каких либо направленных воздействий
  - **Апуринизация** – гидролитическое отщепление азотистых оснований
  - **Дезаминирование** - гидролитическое отщепление аминогруппы от азотистого основания
  - **Метилирование** – перенос метильной группы метилирующего агента на определенные азотистые основания
  - **Окисление азотистых оснований** вызывается различными активными формами кислорода

- **Индуцированные** возникают под действием физических, химических или биологических факторов
  - **Образование пиримидиновых димеров** (УФ-облучение)
  - **Размыкание пуринового кольца** (окисление свободными радикалами)
  - **Однонитевые и двунитевые разрывы в ДНК** (ионизирующая радиация и др.)
  - **Сшивки между цепями ДНК** (химические агенты)

Виды репарации

Прямая

наиболее простой путь устранения повреждений в ДНК, в котором обычно задействованы специфические ферменты, способные быстро устранять соответствующее повреждение, восстанавливая исходную структуру нуклеотидов

Эксцизионная

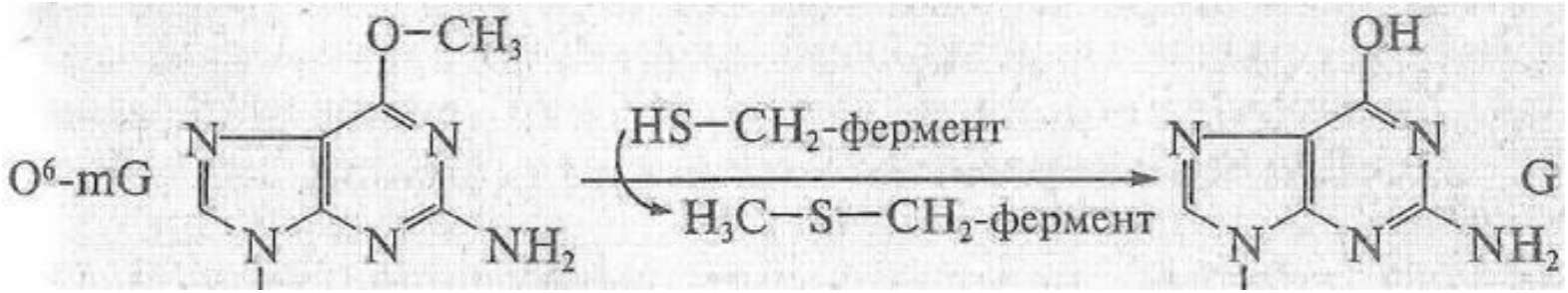
включает удаление повреждённых азотистых оснований из ДНК и последующее восстановление нормальной структуры молекулы по комплементарной цепи

Пострепликативная

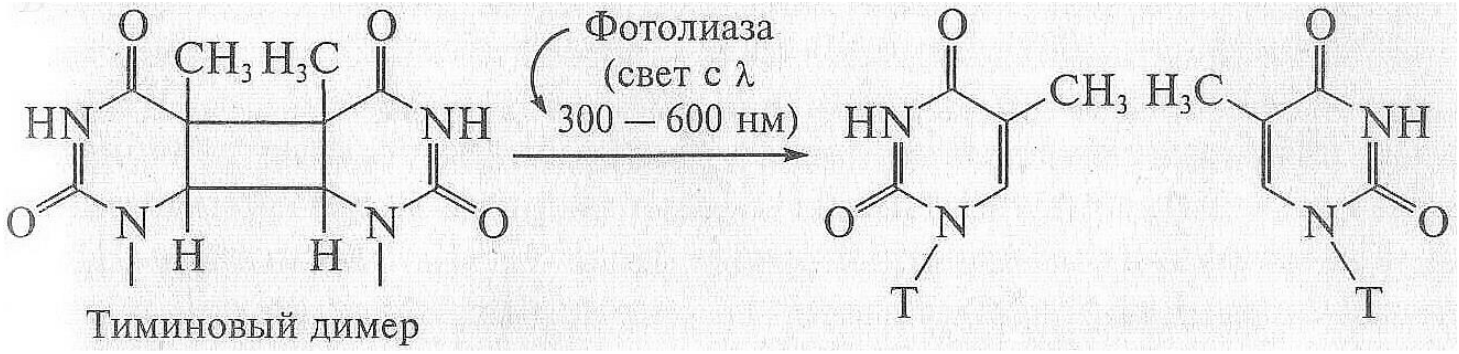
тип репарации, имеющей место в тех случаях, когда процесс эксцизионной репарации недостаточен для полного исправления повреждения

Прямая репарация

1. ***O^6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза*** снимает метильную группу с азотистого основания на один из собственных остатков цистеина

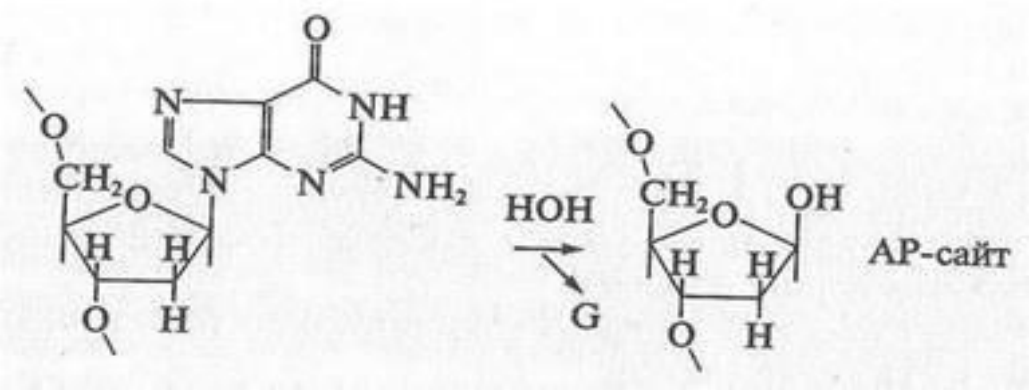


2. ***Тиминовые димеры*** «расшиваются» при участии ***фотолиаз***, осуществляющих фотохимическое превращение, называемое фотореакцией.
ДНК-фотолиазы активируются светом, нуждаются в разнообразных кофакторах.

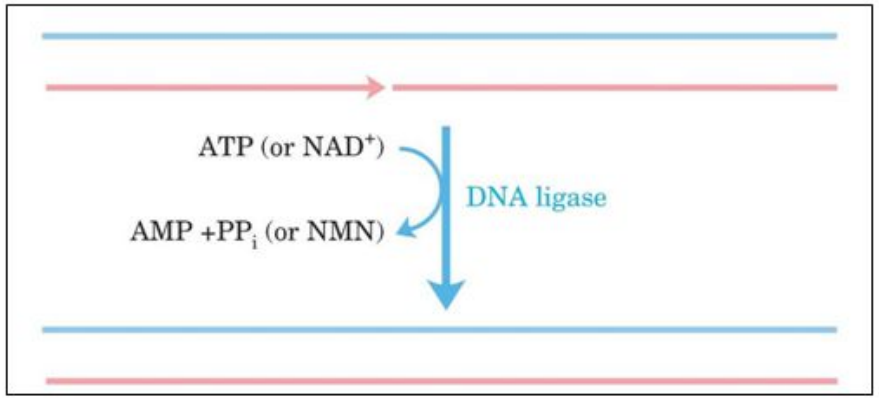


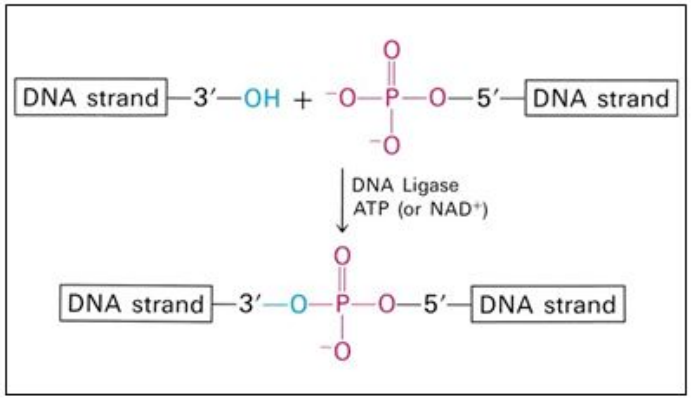
Прямая репарация

3. ***АП-сайты*** могут репарироваться путем прямой вставки пуринов при участии ***ДНК-инсертаз***



4. ***Репарация однонитевых разрывов***, индуцируемая ионизирующим излучением. ***ДНК-полинуклеотидлигаза*** воссоединяет разорванные концы в молекуле ДНК.





Эксцизионная репарация

NER

BER

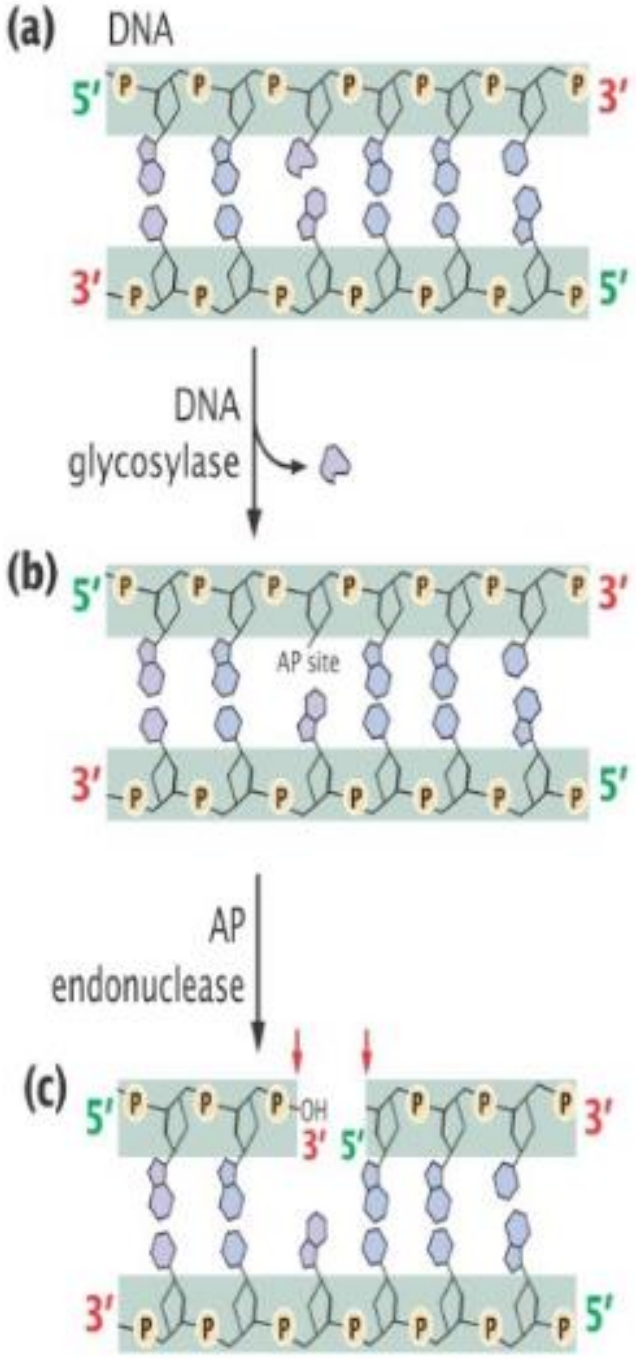
Существуют более сложные реакции восстановления, напоминающие хирургические вмешательства в структуру ДНК, когда поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК, а затем образовавшиеся бреши заполняются неповрежденным материалом

BER (вырезание поврежденных оснований гликозилазами и застройка АП-сайтов)

Основные этапы:

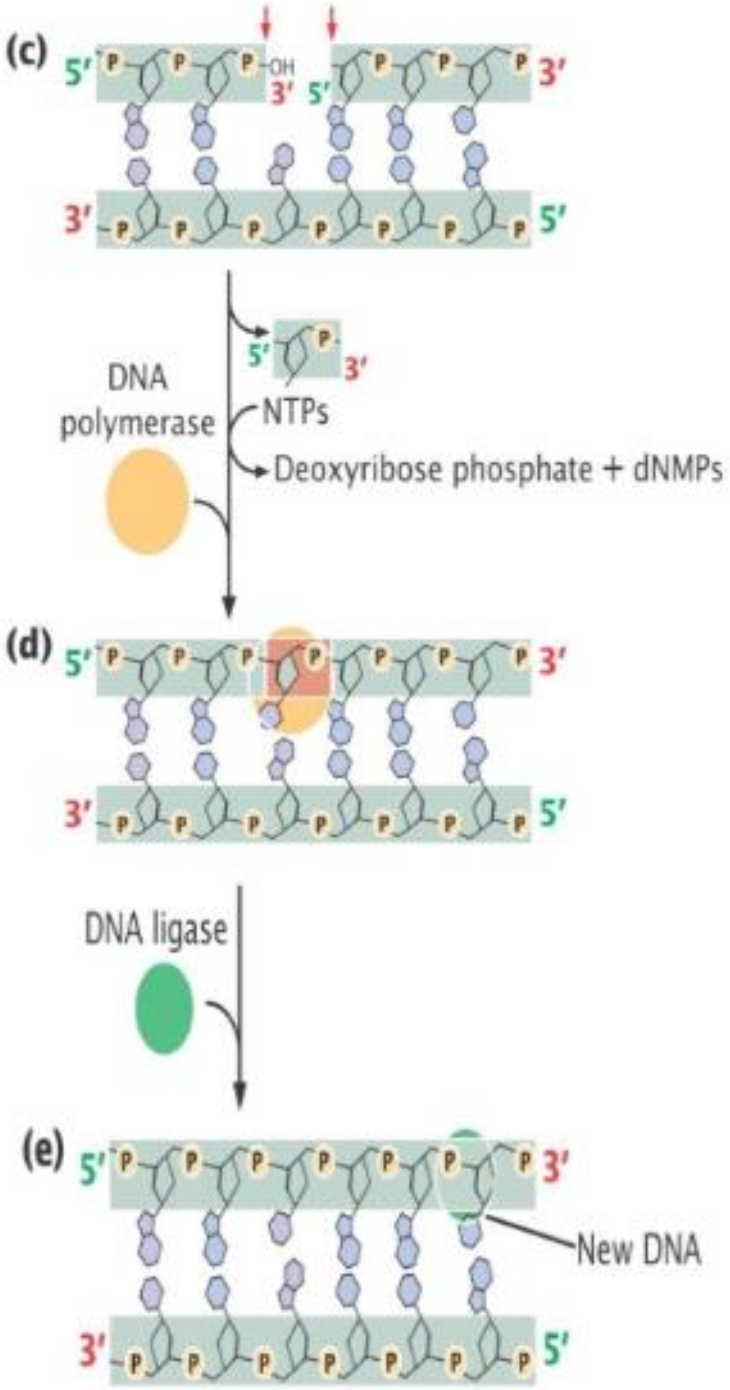
- удаление поврежденного азотистого основания соответствующей гликозилазой с образованием АП-сайта;
- АП-эндонуклеаза делает надрез на 5′-конце АП-сайта для образования 3′-ОН конца;
- наращивание 3′-ОН конца с помощью ДНК-полимеразы;
- зашивание надреза ДНК-лигазой.

Схена процесса BER у прокариот



Узнавание модифицированного основания и его удаление ферментом ДНК-N-гликозилаза с образованием АР сайта. Существует несколько ДНК-N-гликозилаз, обладающих субстратной специфичностью

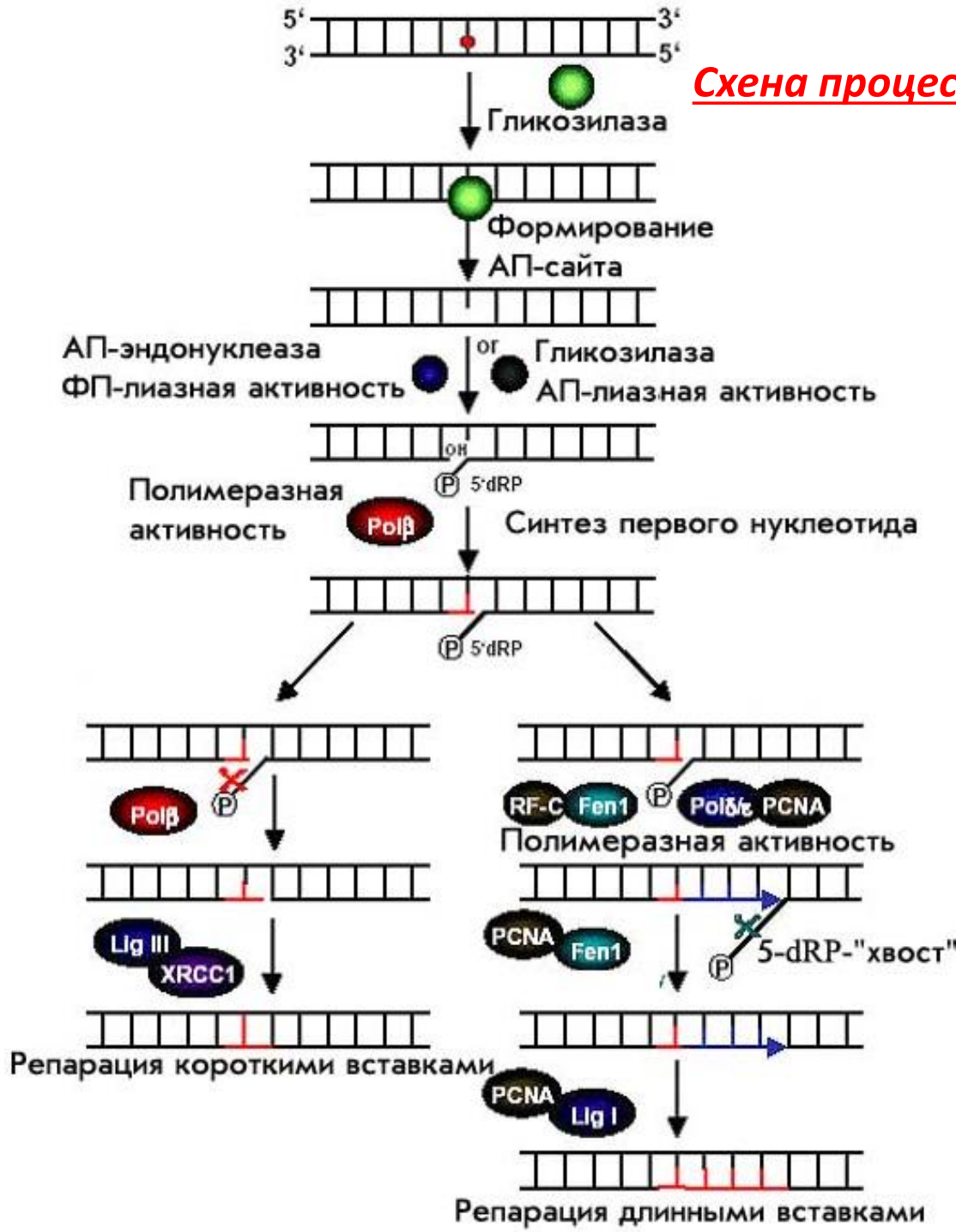
Инцизия АР сайта соответствующей АР-эндонуклеазой. Удаление сахарного остатка с образованием пробела



Встраивание соответствующего основания

Соединение концов ДНК лигазой

Схема процесса BER у эукариот

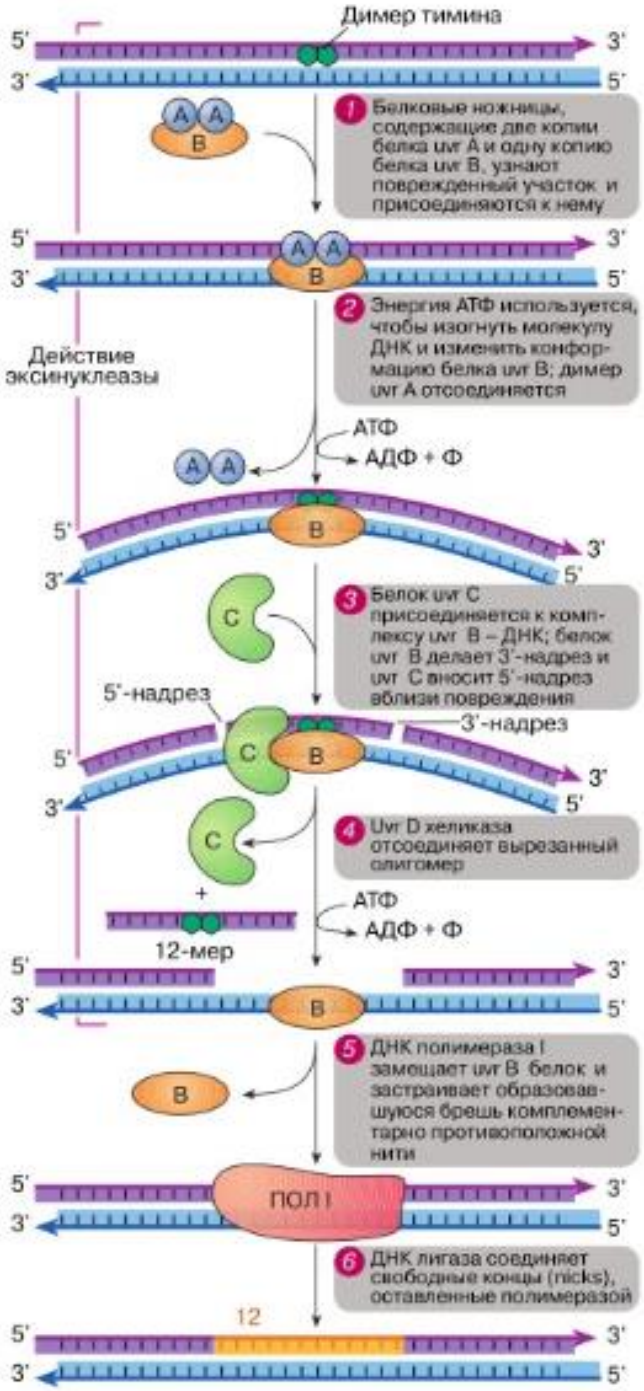


NER (вырезание нуклеотидов)

Более сложная и энергетически более дорогая реакция вырезания не просто поврежденного основания, а значительного участка цепи ДНК перед и позади повреждения

Основные этапы:

1. Узнавание повреждений
2. Связывание мультисубъединичного комплекса с поврежденным сайтом
3. Двойное надрезание поврежденной цепи на несколько нуклеотидов
от поврежденного сайта в обоих направлениях 5' и 3'
4. Освобождение олигонуклеотида, содержащего повреждение между двумя надрезами
5. Заполнение образовавшейся бреши ДНК полимеразой
6. Лигирование

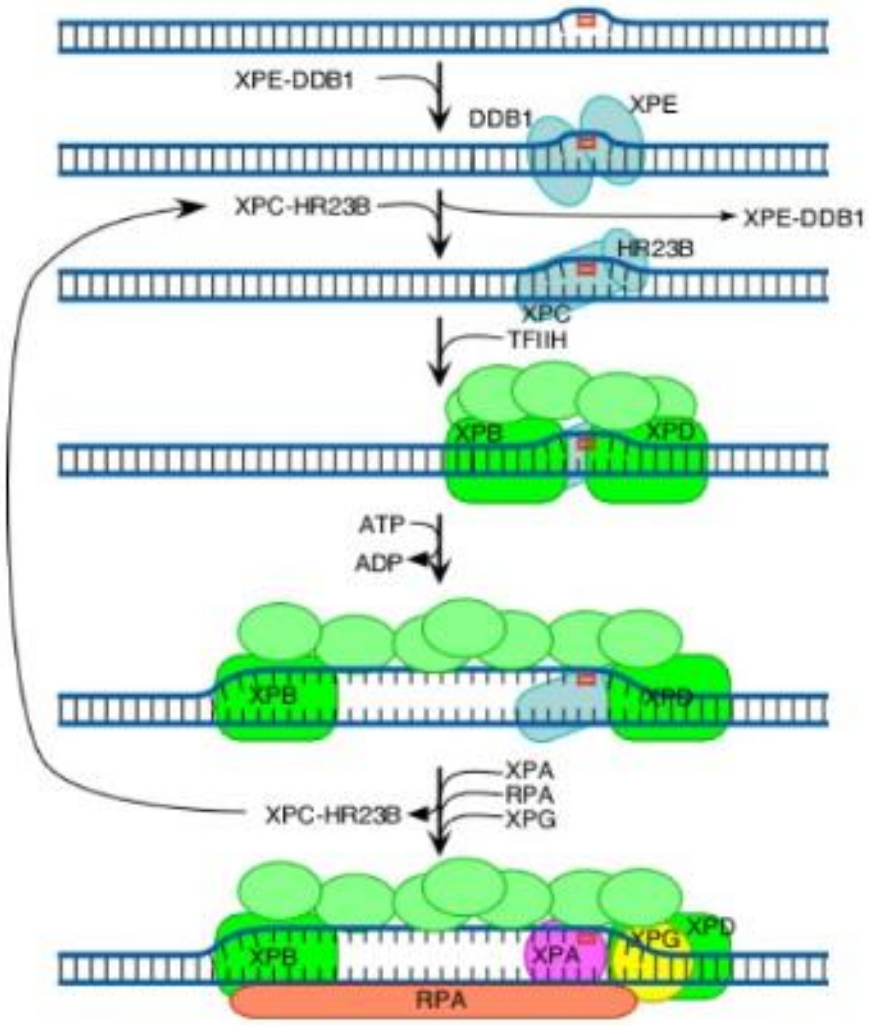


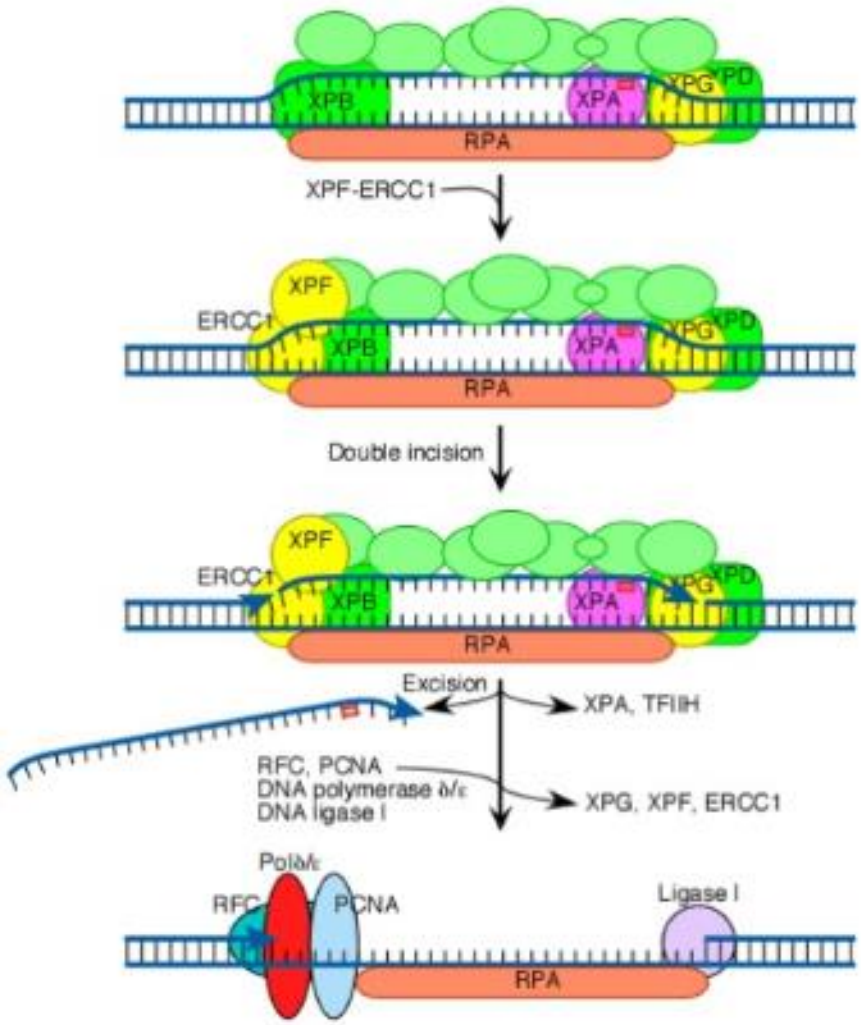
Схена процесса NER у прокариот

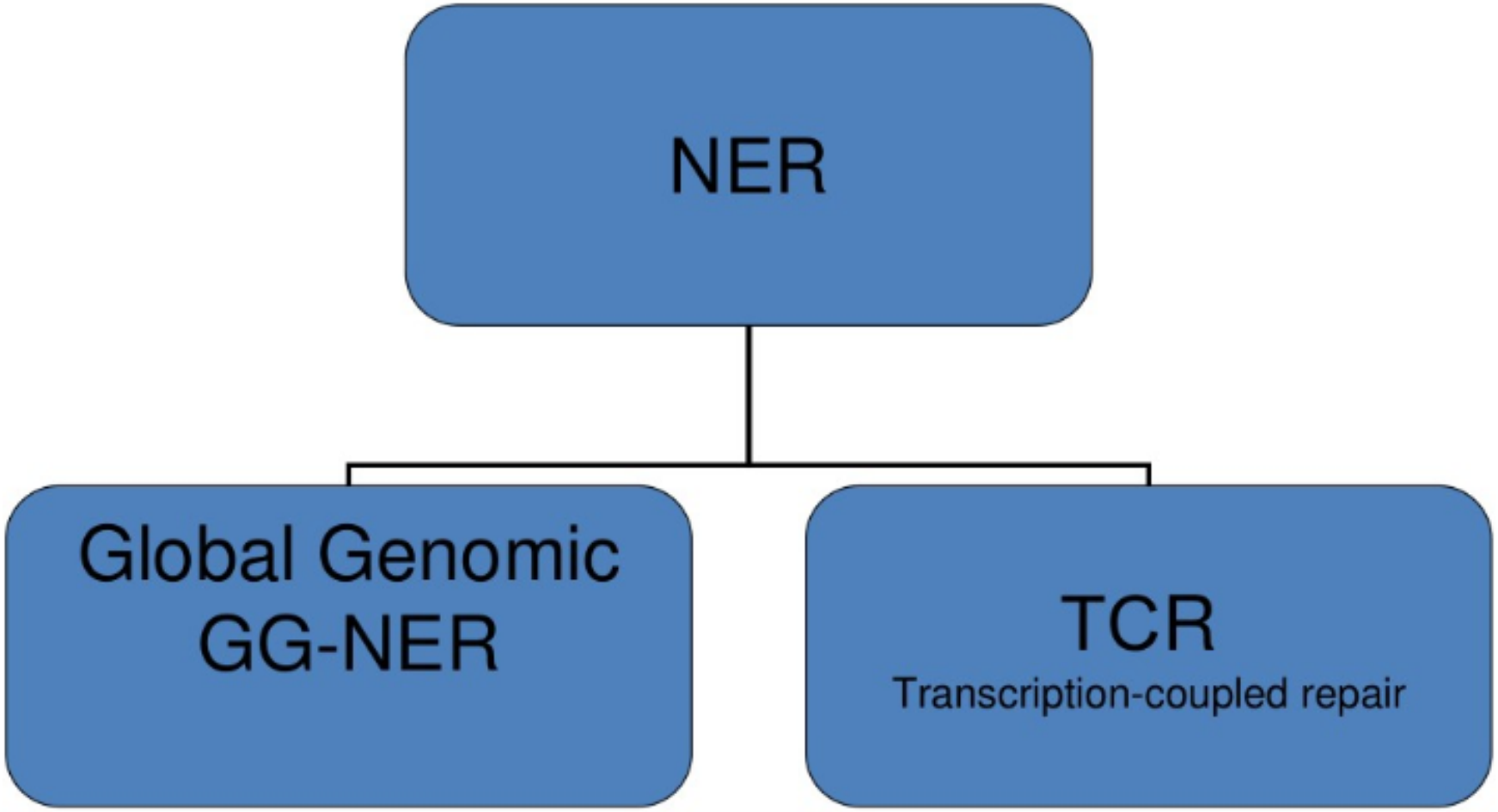
Репарация ДНК по механизму вырезания нуклеотидов (эксцизионная репарация нуклеотидов): *1* – распознавание повреждений белками, кодируемыми генами UvrA и UvrB; *2* – изгиб молекулы ДНК и изменение конформации белка uvrB; *3* – внесение двух однонитевых надрезов ДНК с обеих сторон от повреждения с помощью белков uvrB и uvrC; *4* – расплетание ДНК в участке между двумя надрезами с помощью белка uvrD (хеликазы), отсоединение содержащего дефект фрагмента длиной 12 нуклеотидов (12-мер) с образованием бреши; при этом расходуется энергия еще одной молекулы АТФ; *5* – застройка образованной бреши с помощью ДНК полимеразы; *6* – соединение свободных концов сахарофосфатного остова ДНК с помощью ДНК лигазы

NER у человека

(около 17 белков)







NER всего генома

NER, связанная с транскрипцией – репарация транскрибируемой нити в активно транскрибируемых участках генома

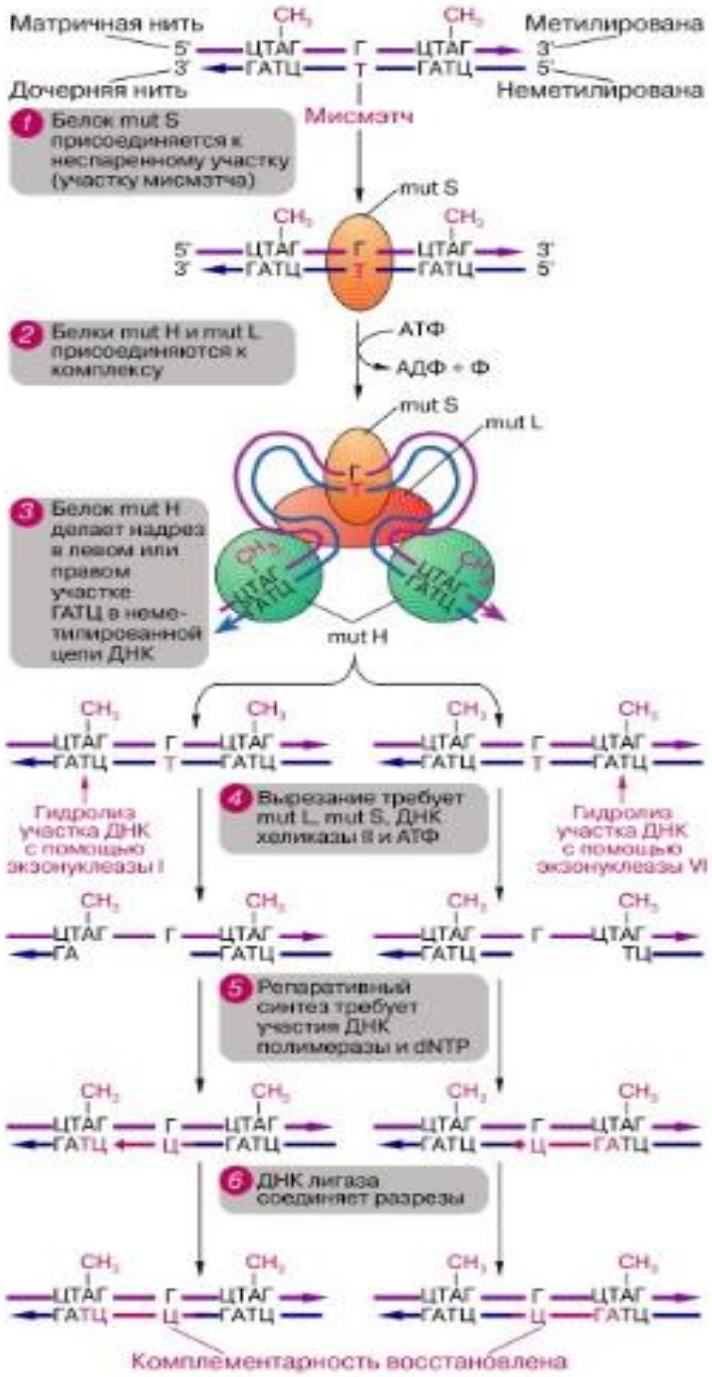
Большинство белков NER участвуют в обоих процессах

Репарация неспаренных оснований (MMR – mismatch repair)

- исправляет ошибки репликации, представляющие собой неспаренные (но НЕ повреждённые) нуклеотиды
- осуществляется непосредственно после репликации ДНК

Основные этапы:

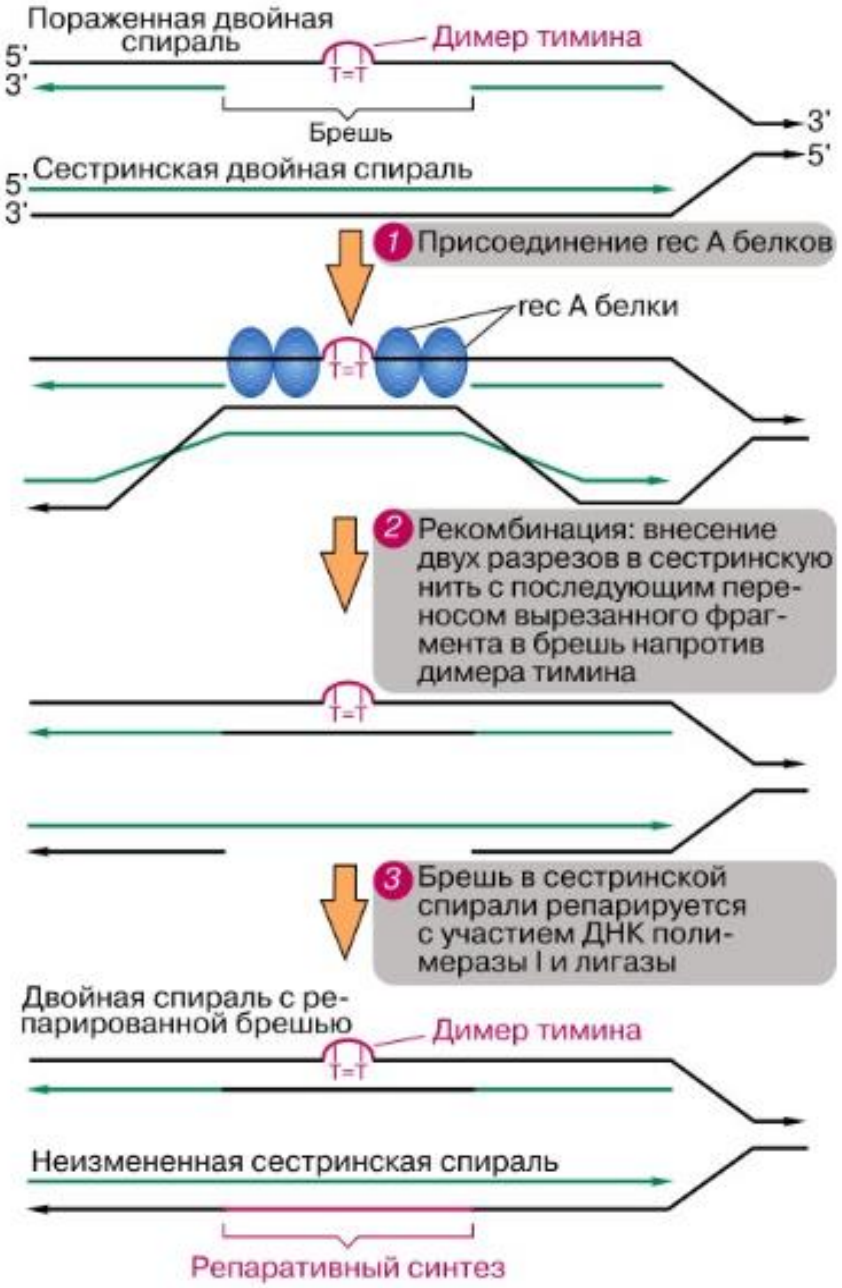
1. Обнаружение неспаренных нуклеотидов
2. Связывание мультисубъединичного комплекса с неспаренным участком
3. Определение «старой» и «новой» цепи ДНК
4. Надрезание новой «цепи»
5. Заполнение образовавшейся бреши ДНК полимеразой
6. Лигирование



MisMatch репарация у кишечной палочки (E. coli)

Двойная спираль ДНК была только что отреплицирована; матричная цепь несет уже метилированные основания, в то время как дочерняя нить еще неметилирована. Белки mutH разрезают в ходе описываемого процесса репарации только неметилированные сайты ГАТЦ. Матричная цепь ДНК остается целостной и служит матрицей для восстановления правильной последовательности в образовавшихся брешах: 1 – белок mutS распознает неспаренный участок и присоединяется к нему; 2 – образование репарационного комплекса за счет присоединения белков mutH и mutL к белку mutS; на осуществление этой реакции тратится одна молекула АТФ; 3 – разрезание ДНК в участке ГАТЦ, расположенных перед и позади сайта мисмэтча; 4 – длинный участок ДНК, расположенный между двумя надрезами и несущий мисмэтч, должен быть отсоединен от молекулы ДНК, в результате чего возникает длинная однонитевая брешь; в расплетании двунитевой ДНК принимают участие хеликазы и расходуются несколько молекул АТФ; 5 – застройка длинной бреши ДНК полимеразой с использованием дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP); 6 – соединение оставшихся после завершения репликации однонитевых разрывов с помощью ДНК лигаз. В результате всей цепи реакций участок мисмэтча заменяется правильной (комплементарной) парой

Пострепликативная, или рекомбинационная, репарация

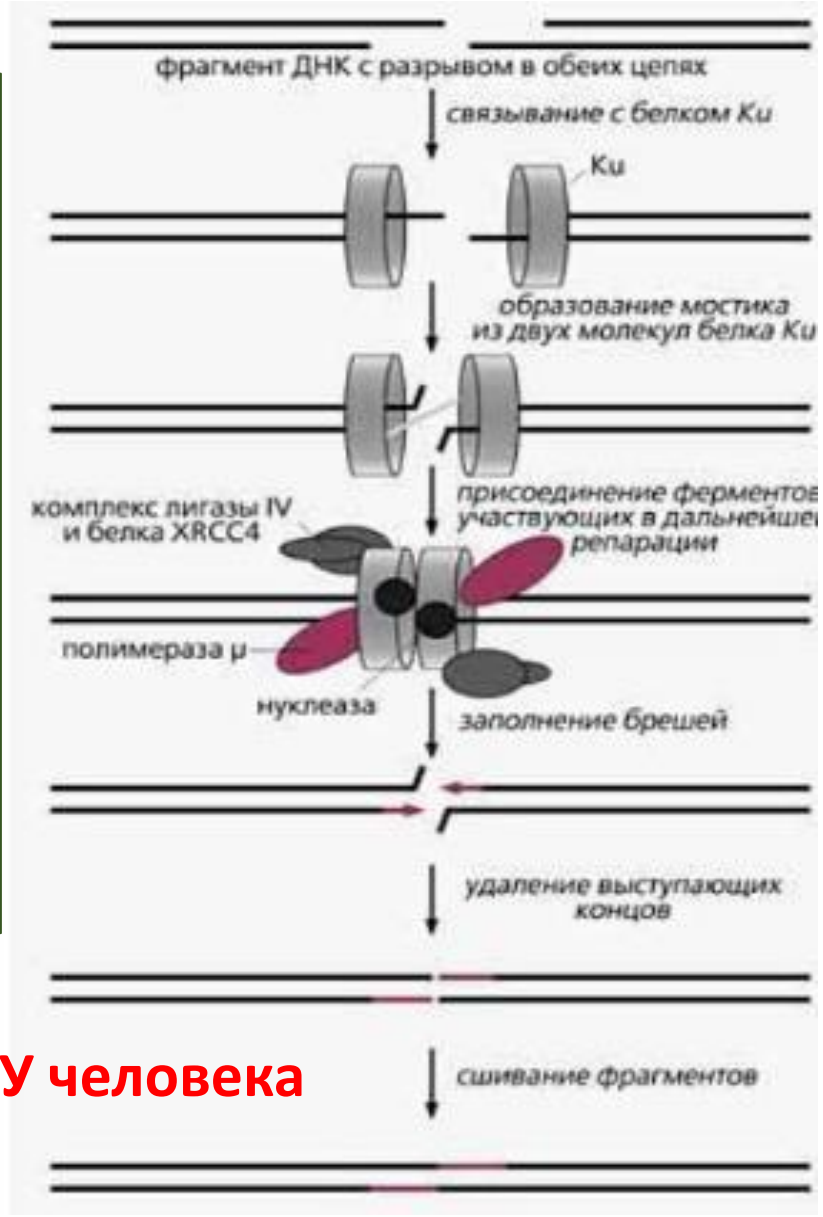


Если до начала репликации ДНК из нее не были устранены все дефекты, то одна из нитей материнской молекулы будет нести повреждение (красным цветом выделен димер тимина), а комплементарная ей нить будет свободна от повреждений (нити материнской молекулы показаны черным цветом). На поврежденной нити репликация завершится тем, что напротив димера тимина в заново синтезированной нити (зеленого цвета) окажется брешь, в то время как сестринская двойная спираль не будет нести повреждения. После этого может пройти пострепликативная репарация поврежденного участка: 1– молекулы белка recA (синие) присоединяются к зоне бреши; 2 – под контролем белков recA произойдет рекомбинация –участок комплементарной цепи сестринской нити (черная) переносится в район бреши; 3 – брешь в сестринской ДНК застраивается в ходе репликативного синтеза (застроенный участок показан красным цветом); концы новой и старой нитей соединяются лигазой

Негомологичное объединение концов (NHEJ – nonhomologous end joining)

- Не требуется наличия идентичной неповреждённой ДНК
- Отсутствует у многих бактерий; основной механизм репарации DSB у млекопитающих; есть также у одноклеточных эукариот
- Особенно важно на стадиях G0/G1
- Может приводить к мутациям:

- делеция (потеря участка нуклеотидной последовательности)
- транслокация (перемещение участка хромосомы на другую хромосому)



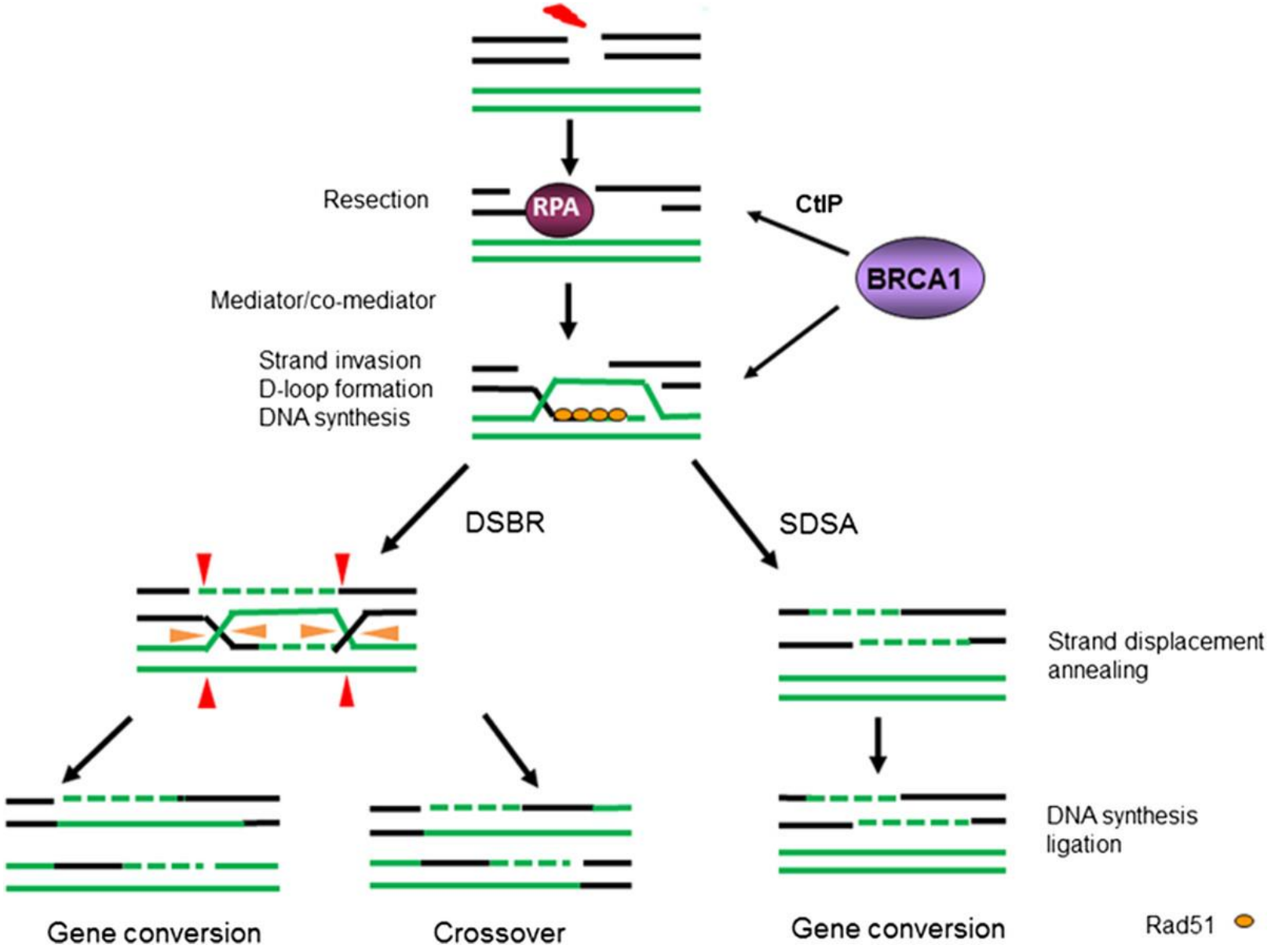
У человека

Роль мутаций в генах BRCA1 и BRCA2

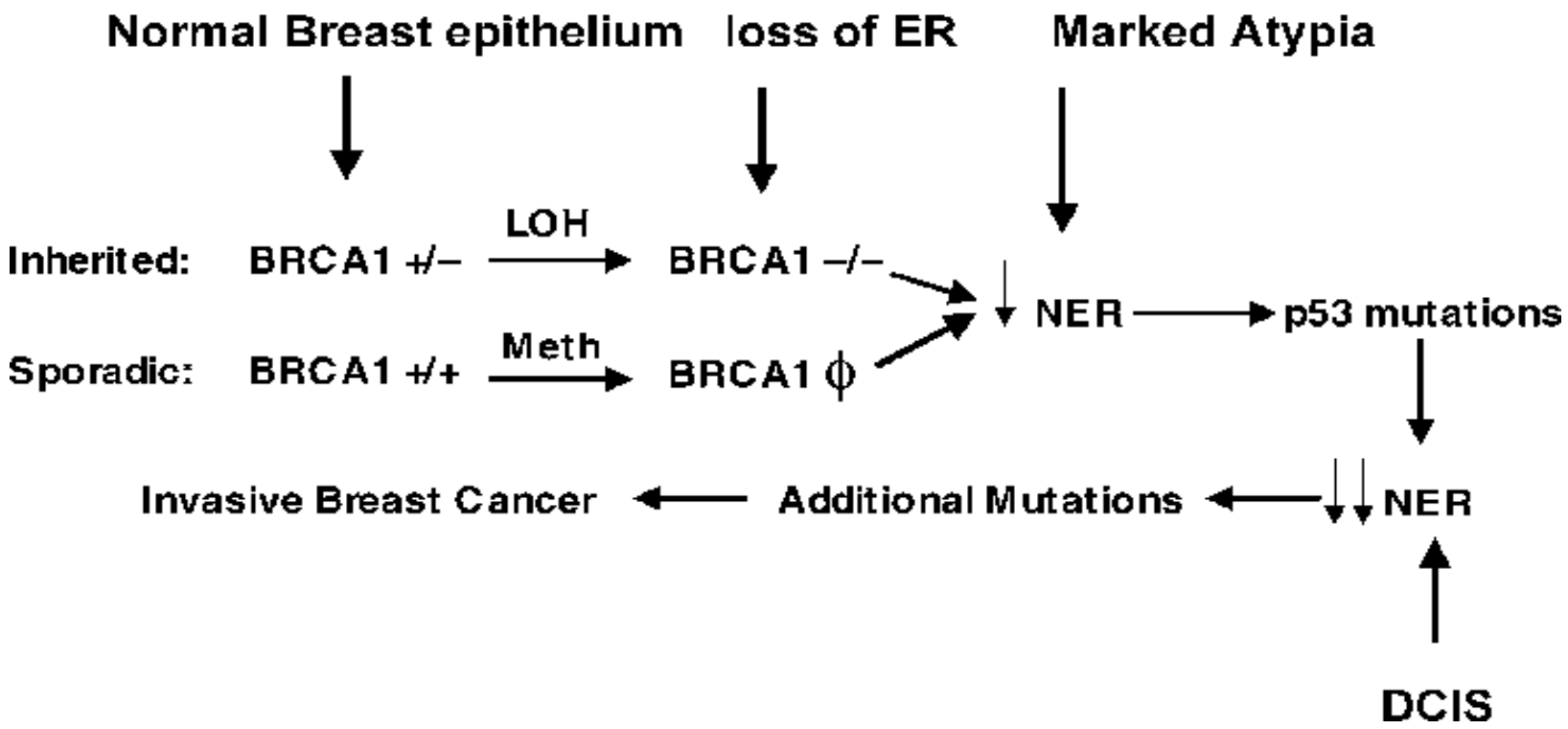
Гены BRCA1/2 относятся к группе генов-супрессоров, вовлеченных в процесс гомологичной репарации двунитевых разрывов ДНК

Наличие клинически значимых мутаций в генах BRCA1 или BRCA2 вызывает потерю функции белков, кодируемых этими генами, в результате чего нарушается основной механизм репарации двунитевых разрывов ДНК. Альтернативные пути репарации (NER, BER, NHEJ) неспособны полностью исключить накопление большого числа ошибок в первичной структуре ДНК (геномная нестабильность), следствием чего является повышенный риск возникновения некоторых злокачественных новообразований (рака молочной железы, рака яичников, рака простаты, рака поджелудочной железы)

BRCA в негомологичной репарации



Модель BRCA1-ассоциированного канцерогенеза

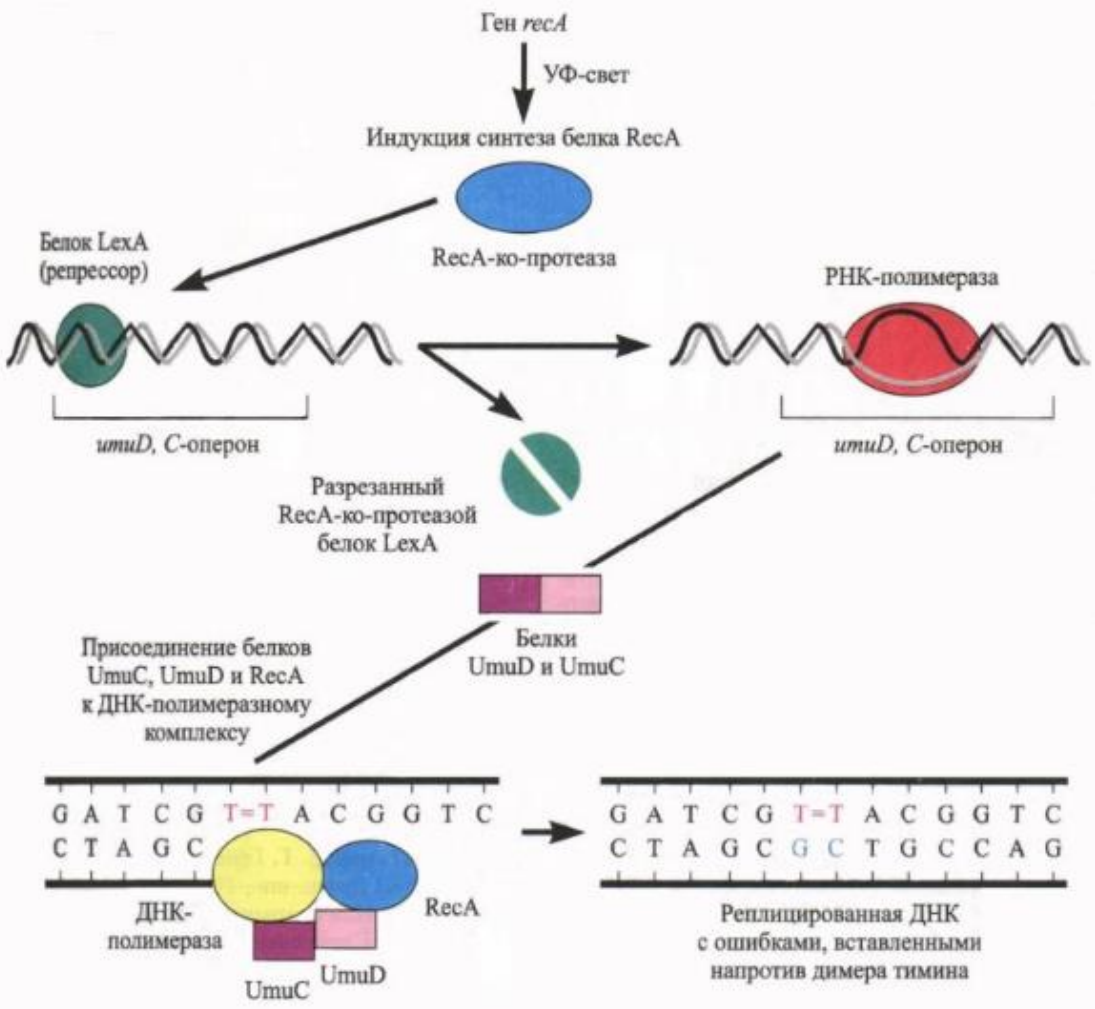


Потеря гетерозиготности по BRCA1 приводит к начальному снижению активности NER и, возможно, к потере ER (эксцизионная репарация), что приводит к накоплению дополнительных мутаций, особенно возникающих из нетранскрибированной цепи p53. Промоторное гиперметилирование BRCA1 вызывает молчание генов и может также привести к снижению GGR (общая репарация генома) и мутациям, возникающим в результате нетранскрибированной цепи p53. Потеря функции p53 приводит к еще более выраженной нестабильности генома, что приводит к дополнительным генетическим изменениям, приводящим к инвазивному фенотипу рака

Рак груди стал причиной смерти нескольких близких родственниц Джоли, она решила секвенировать свои гены (BRCA 1/2), ответственные за риск развития рака груди.

Была выявлена мутация гена BRCA1 и риск развития рака груди составляет 87 %, а рака яичников — 50 %. Актриса приняла решение пройти двустороннюю мастэктомию с последующей реконструкцией (в конце апреля 2013 года), а в марте 2015 удалила яичники из-за риска развития рака

SOS-репарация
(TLS - Translesion Synthesis – Синтез в обход повреждений)

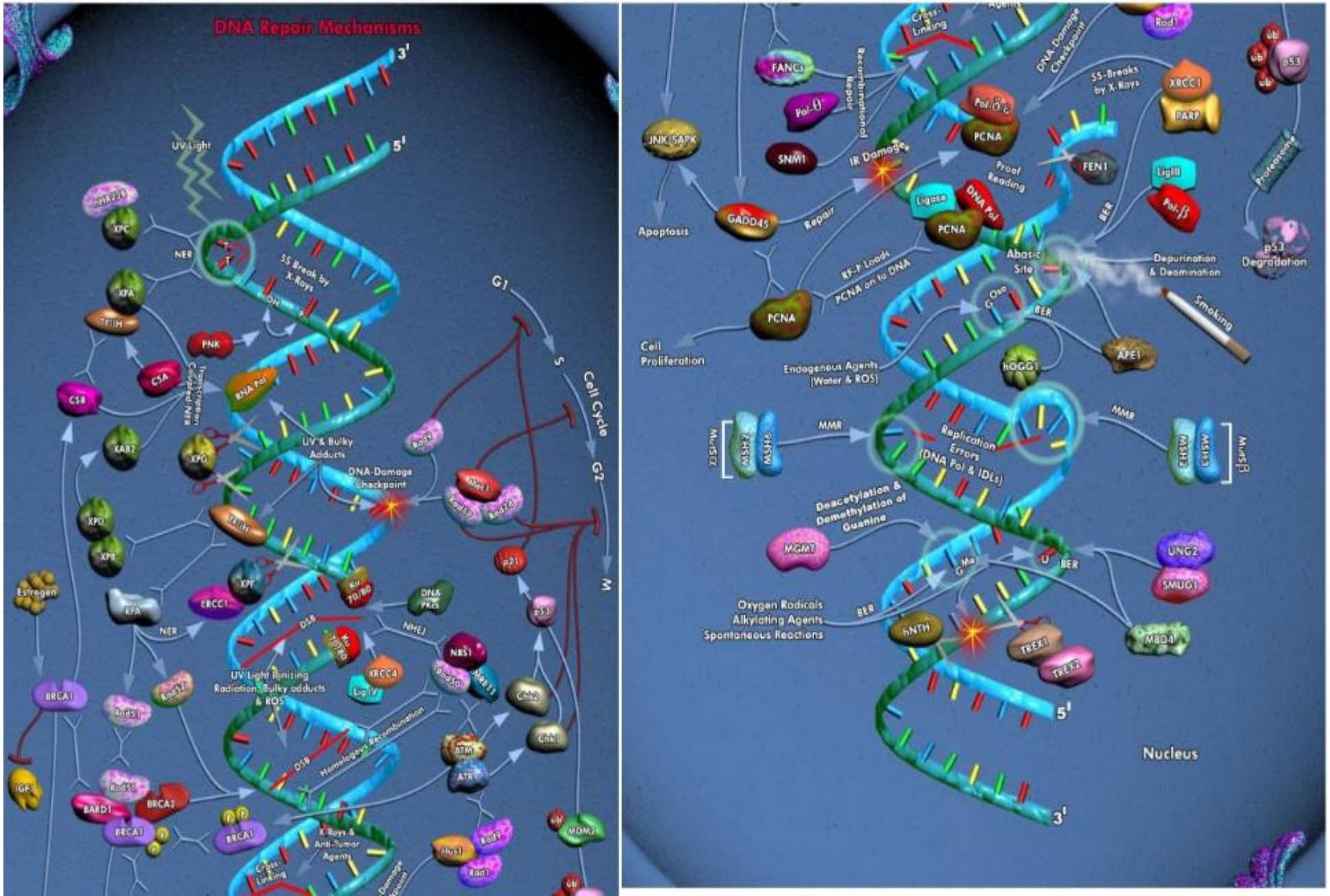


Индуцируемая УФ-светом SOS-репарация [Сойфер, 1997].

- Репарация, склонная к ошибкам (error-prone repair), в отличие от error-free repair
- Используется, когда остальные механизмы неэффективны
- Функционируют специальные «неточные» полимеразы

- SOS ответ активируется при накоплении однонитевой ДНК (остановка репликации)
- в нормальных условиях гены, имеющие SOS box, репрессированы (lexA, recA, uvrA, uvrB, uvrD, umuC, umuD)
- на ранних этапах активируется NER
- UmuC+UmuD = ДНК полимераза V

Основные механизмы репарации ДНК эукариот

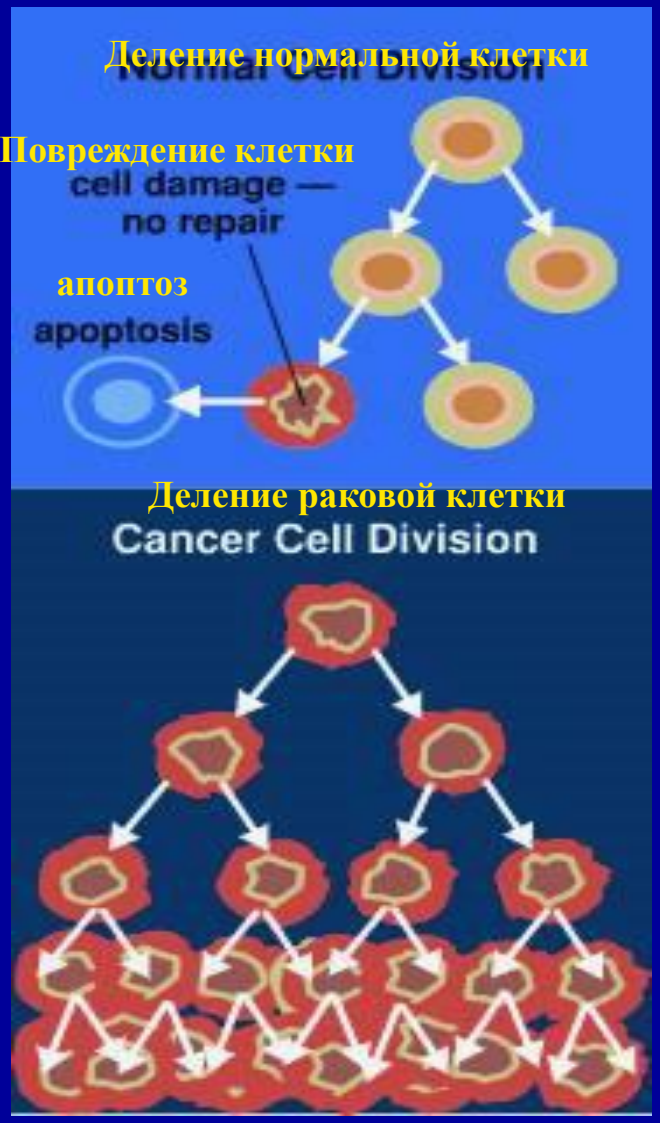


Канцерогенез
(с точки зрения генетической теории)

Канцерогенез - многоступенчатый процесс накопления мутаций и других генетических изменений, приводящих к нарушениям регуляции клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки, морфогенетических реакций клетки, а также, вероятно, к неэффективному функционированию факторов противоопухолевого иммунитета.

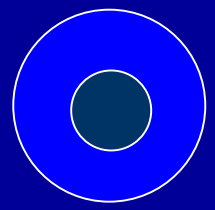
Клеточные основы рака

- Рак это группа заболеваний, характеризующая ненормальным и неконтролируемым ростом клеток
- Рак возникает в результате потери контроля над нормальным ростом клетки
- В нормальных тканях уровень размножения клеток и уровень клеточной смерти находится в равновесии
- При раке это равновесие нарушается
- Это нарушение произойти при
  1) неконтролируемом делении клеток
  2) потере клетками способности к апоптозу

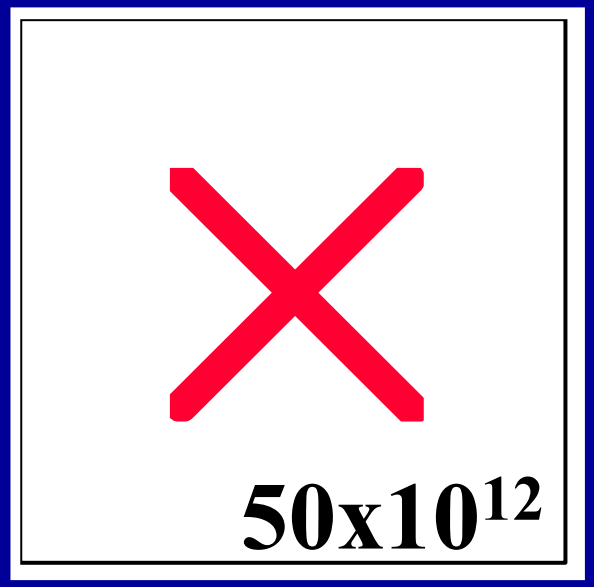


Раковые клетки не растут быстрее, чем нормальные клетки

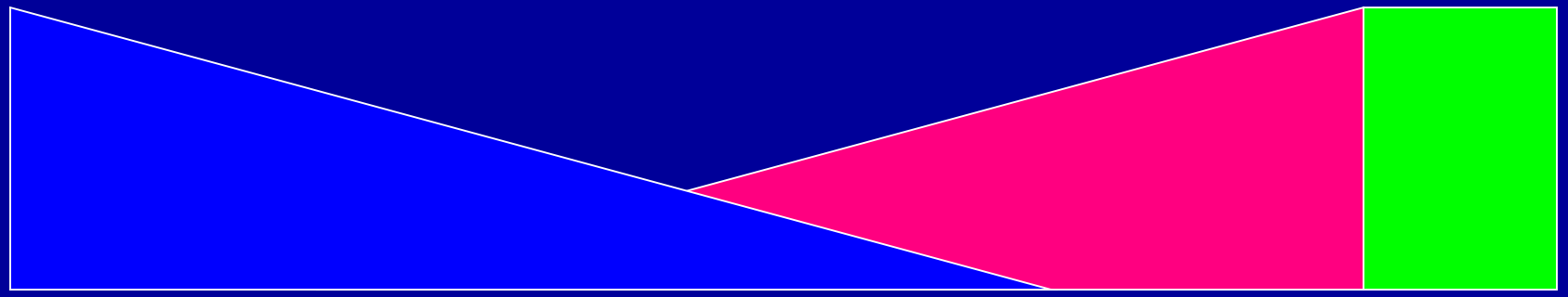
Просто их рост неконтролируемый



1 оплодотворенная яйцеклетка



10^{16} Делений клеток за жизнь



Proliferation
Пролиферация

Differentiation
Дифференцировка

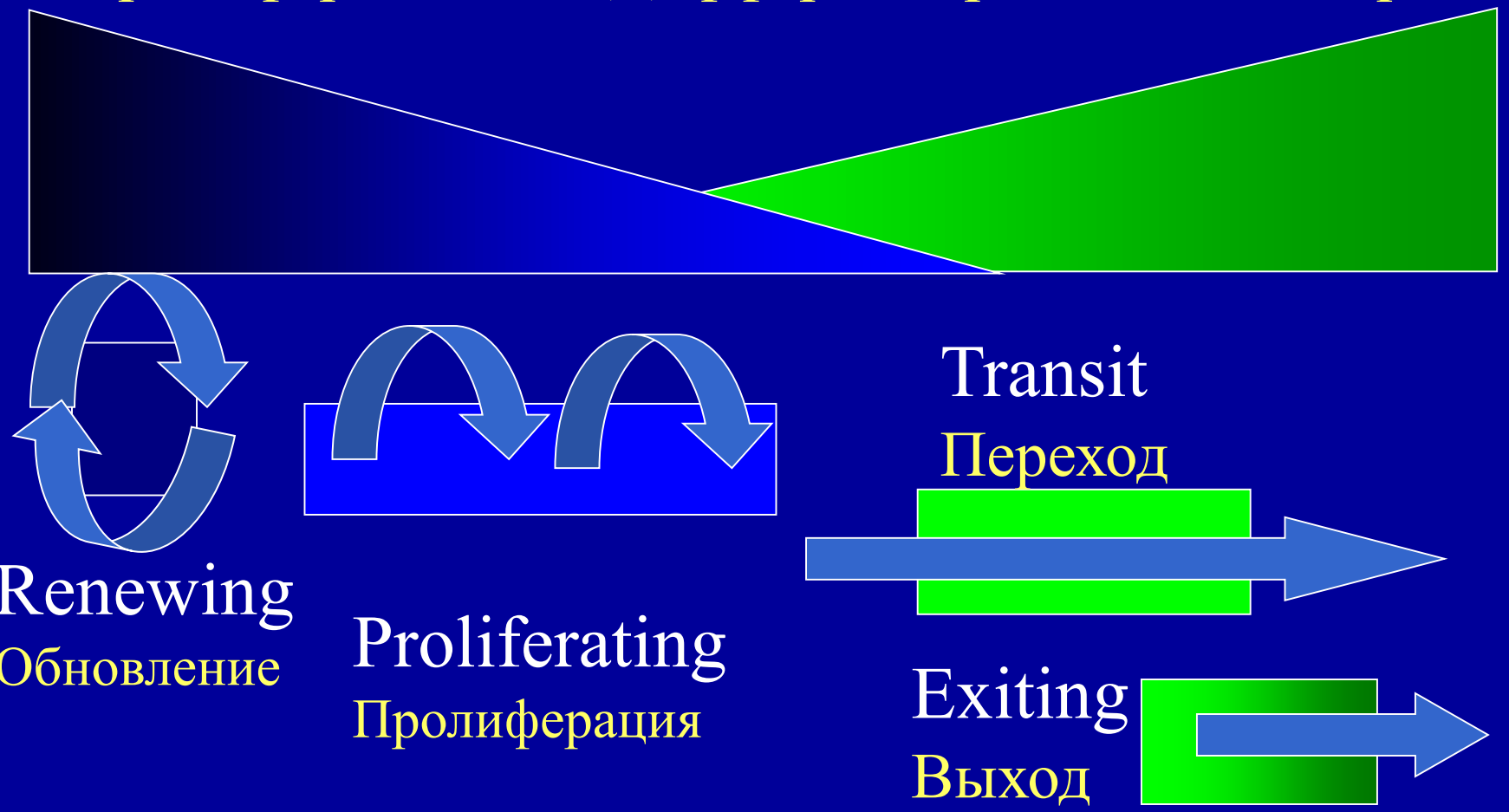
Death
Смерть

Гармония клеток

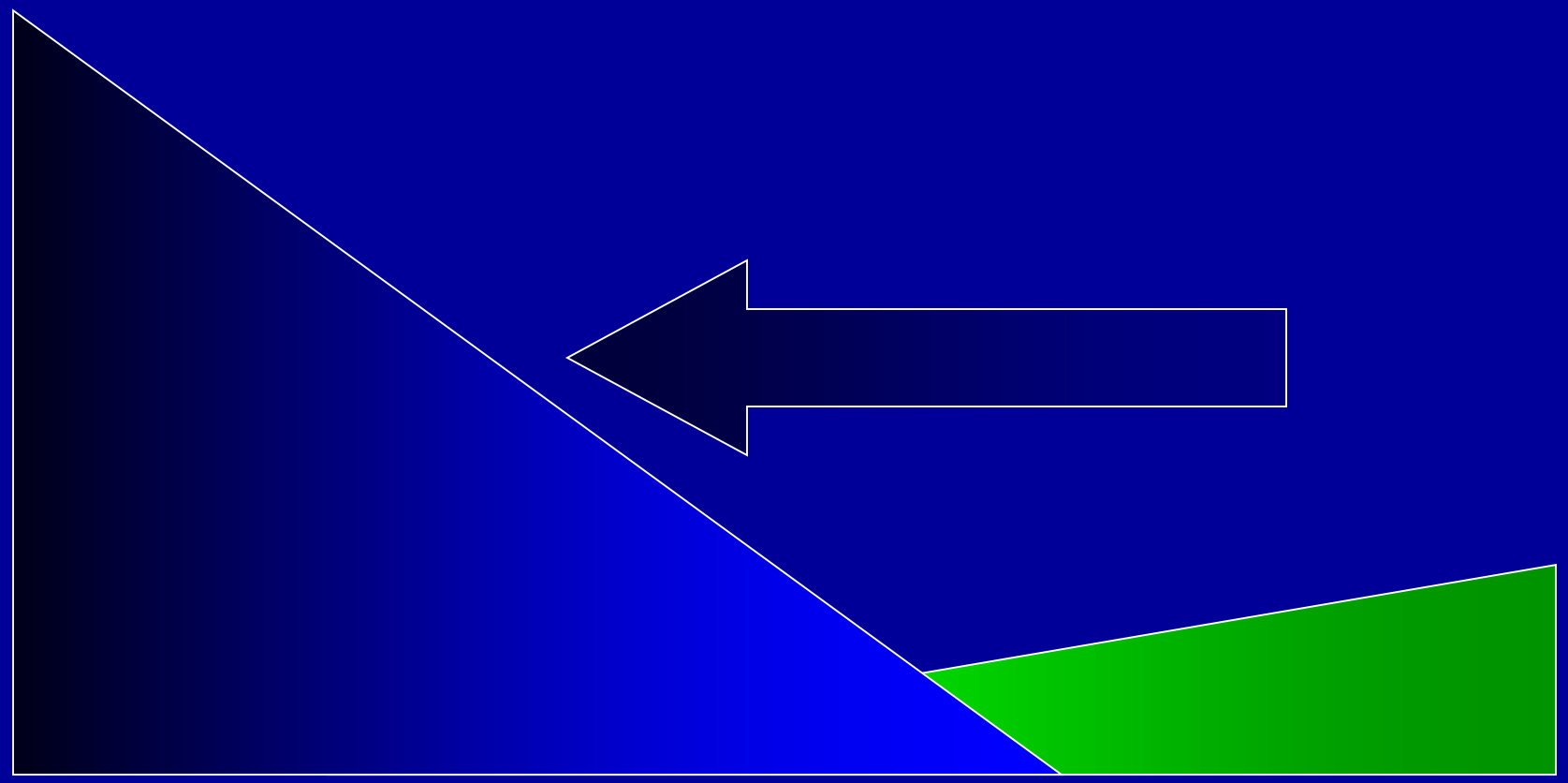
Proliferation
Пролиферация

Differentiation
Дифференцировка

Death
Смерть



Рак: нарушение гармонии клеток

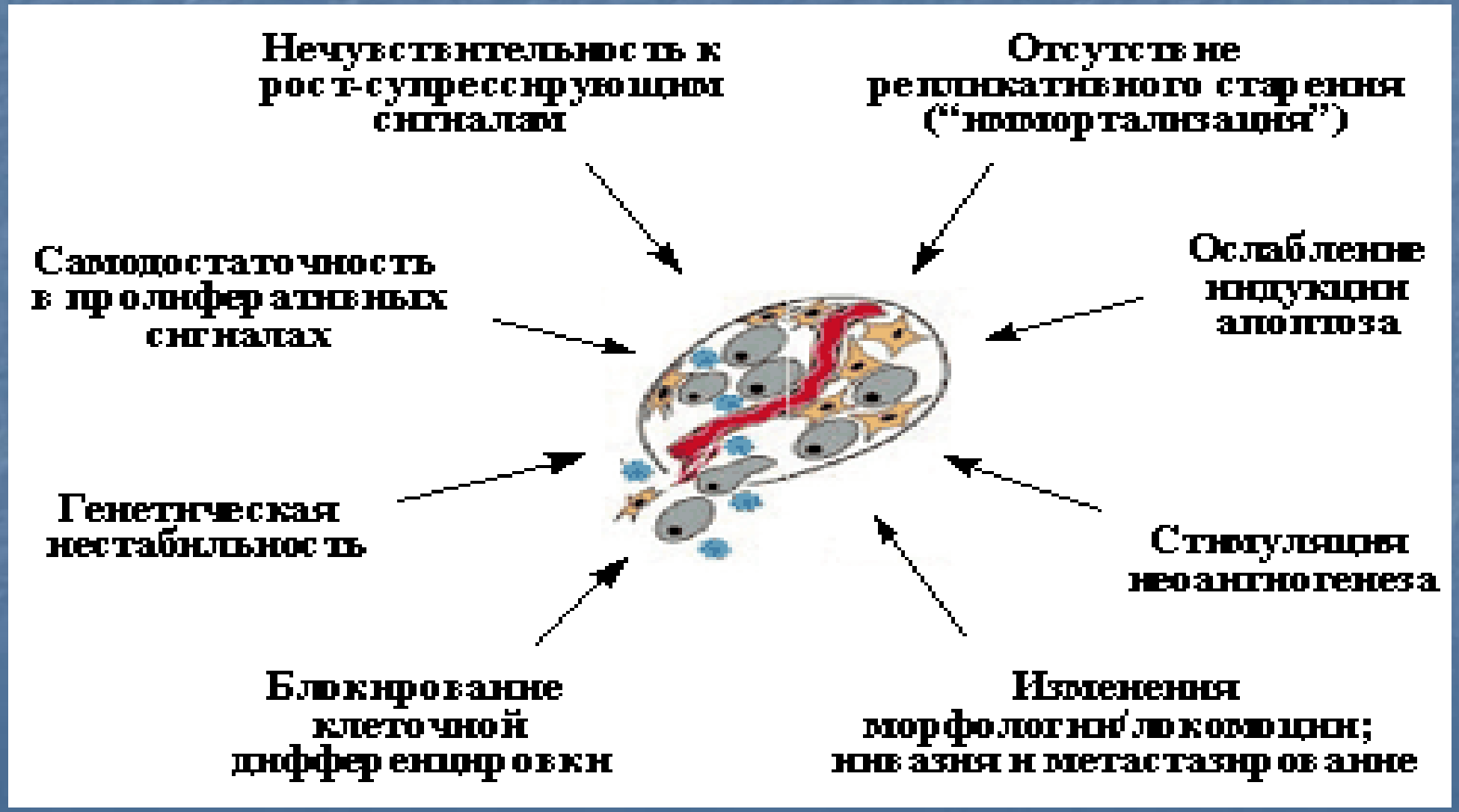


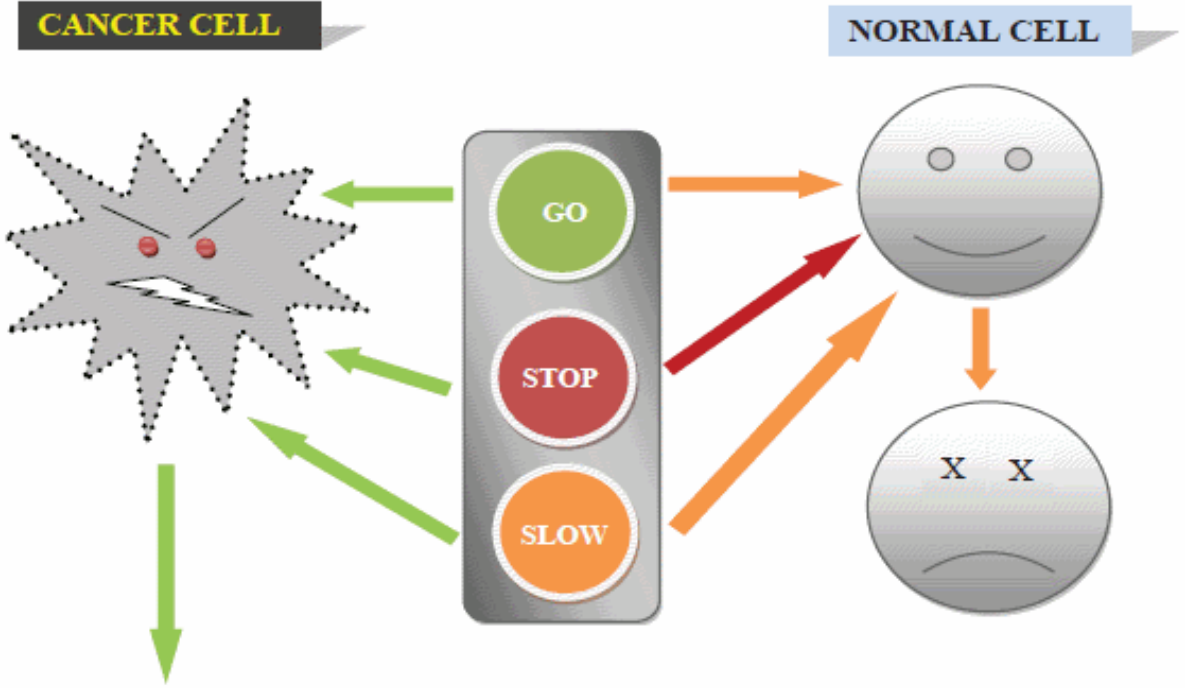
Proliferation
Пролиферация

Differentiation
Дифференцировка

Death
Смерть

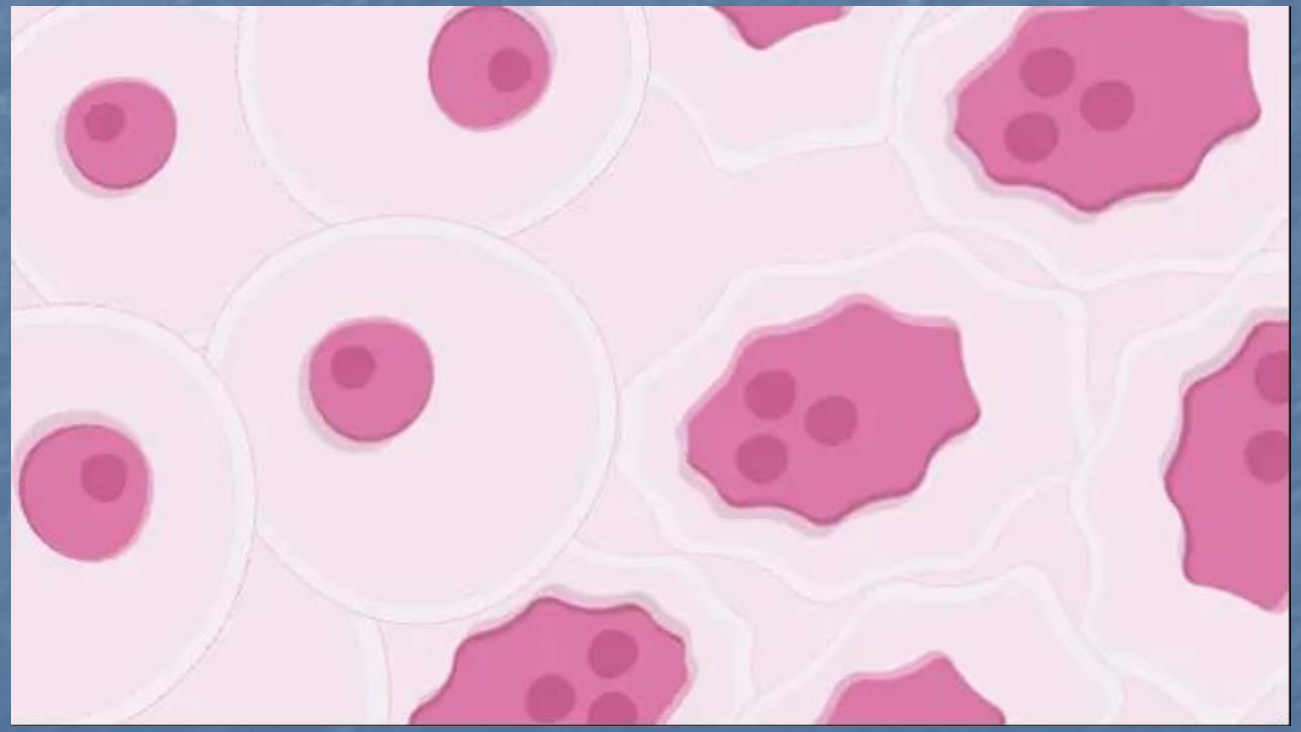
Характерные признаки опухолевой клетки

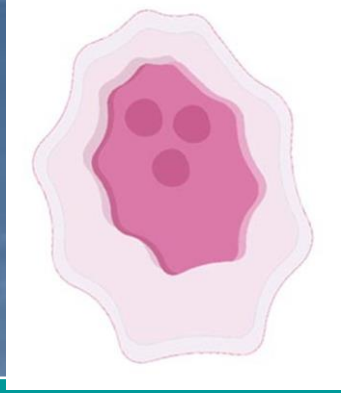




1. Immortality	•Normal cells have a finite lifespan. Cancer cells manipulate the cell to keep dividing indefinitely by producing proteins that enable them to do so
2. Produce 'Go' signals	• Most cells wait for a 'Go signal before dividing. Cancer cells don't bother waiting... they produce their own 'Go' chemical messages and continue dividing.
3. Override 'Stop' signals	•Even if neighbouring cells produce a 'Stop' signal, cancer cells override these signals and continue dividing.
4. Resist cell death	•Normal cells sometimes react to stress by triggering a 'Self Destruct' button and killing itself, but cancer cells sneak past these signals and continue to divide.
5. Angiogenesis	•Cancer cells make sure they can keep growing by stimulating the sprouting of new blood vessels to keep their nutrient supply lines open.
6. Metastasis	• The final stage in tumour progression is the migration and spread of cancers to different sites from where they originated.

Морфологические признаки злокачественности

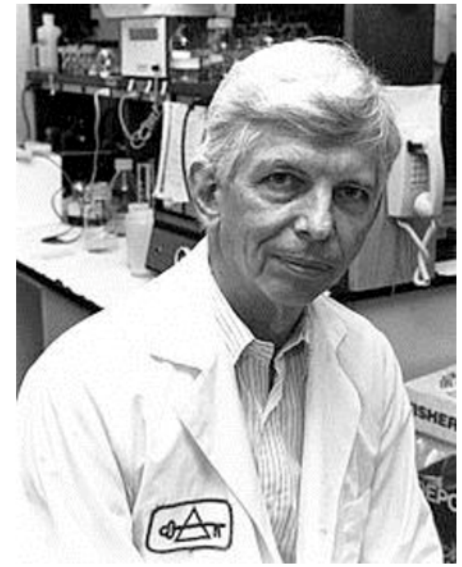




	Нормальная клетка	Раковая клетка
Форма клетки	Униформа	Нерегулярный
Ядро	Форма сфероида, одно ядро	Неправильная форма, обычное многократное образование зародышей
Хроматин	Прекрасно, равномерно распределено	Грубый, агрегированный
Ядрышко	Единичное незаметное ядрышко	Множественные увеличенные ядрышки
Цитоплазма	Большой объем цитоплазмы	Небольшой объем цитоплазмы
Рост	Контролируемый	Неконтролируемый
Созревание	Созревают в специализированные клетки	Оставайтесь незрелыми и недифференцированными
Кровоснабжение	Нормальный ангиогенез (происходит во время развития/заживления)	Ангиогенез, индуцированный опухолью
Кислород	Подходит (для аэробного дыхания), но при необходимости подвергается анаэробному дыханию	Не требуется (хорошо себя чувствует в условиях гипоксии), способствует анаэробному дыханию
Место расположения	Оставайтесь в предполагаемом месте	Может распространяться в разные части тела (метастазы)

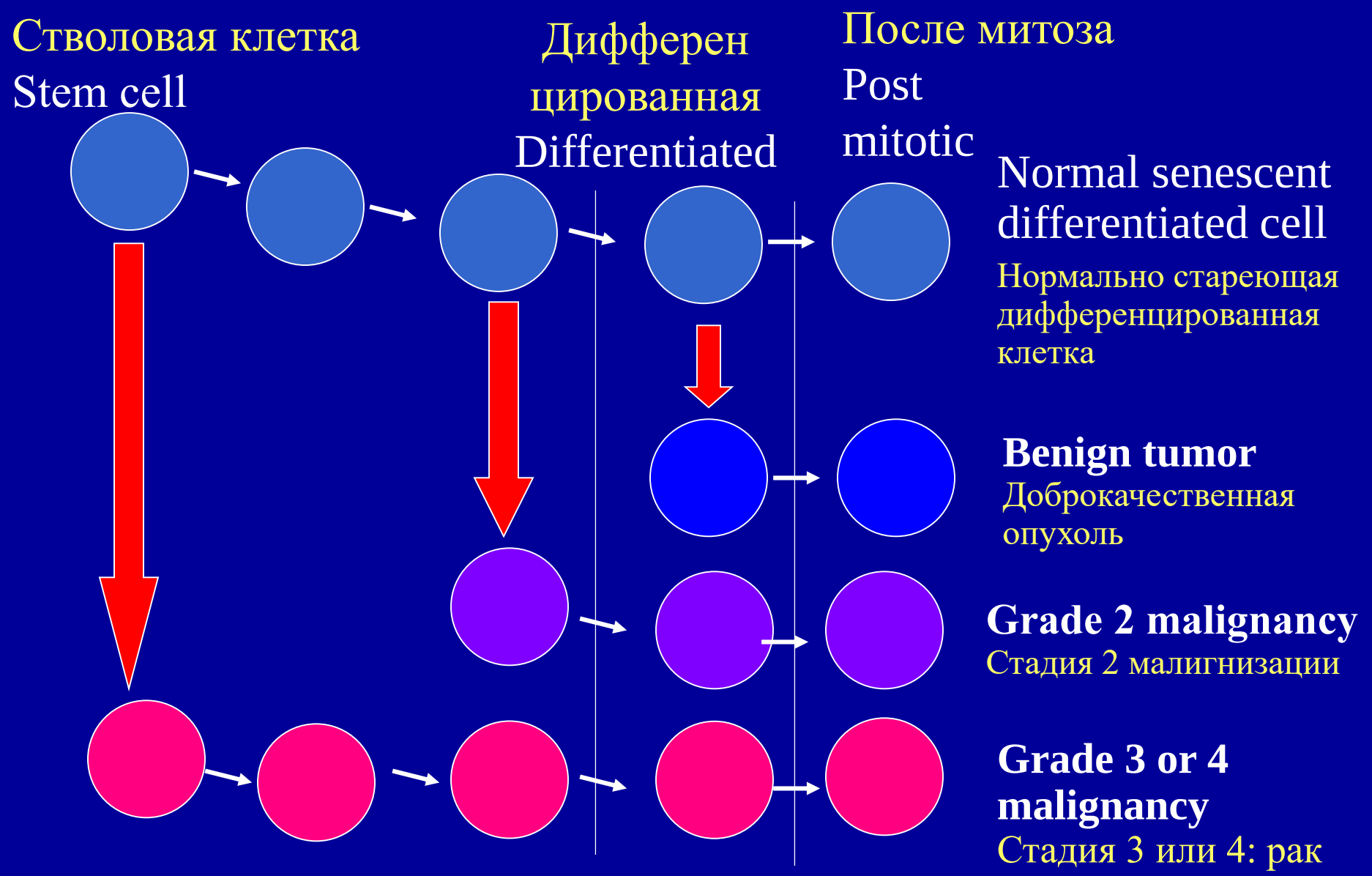
Молекулярные механизмы канцерогенеза

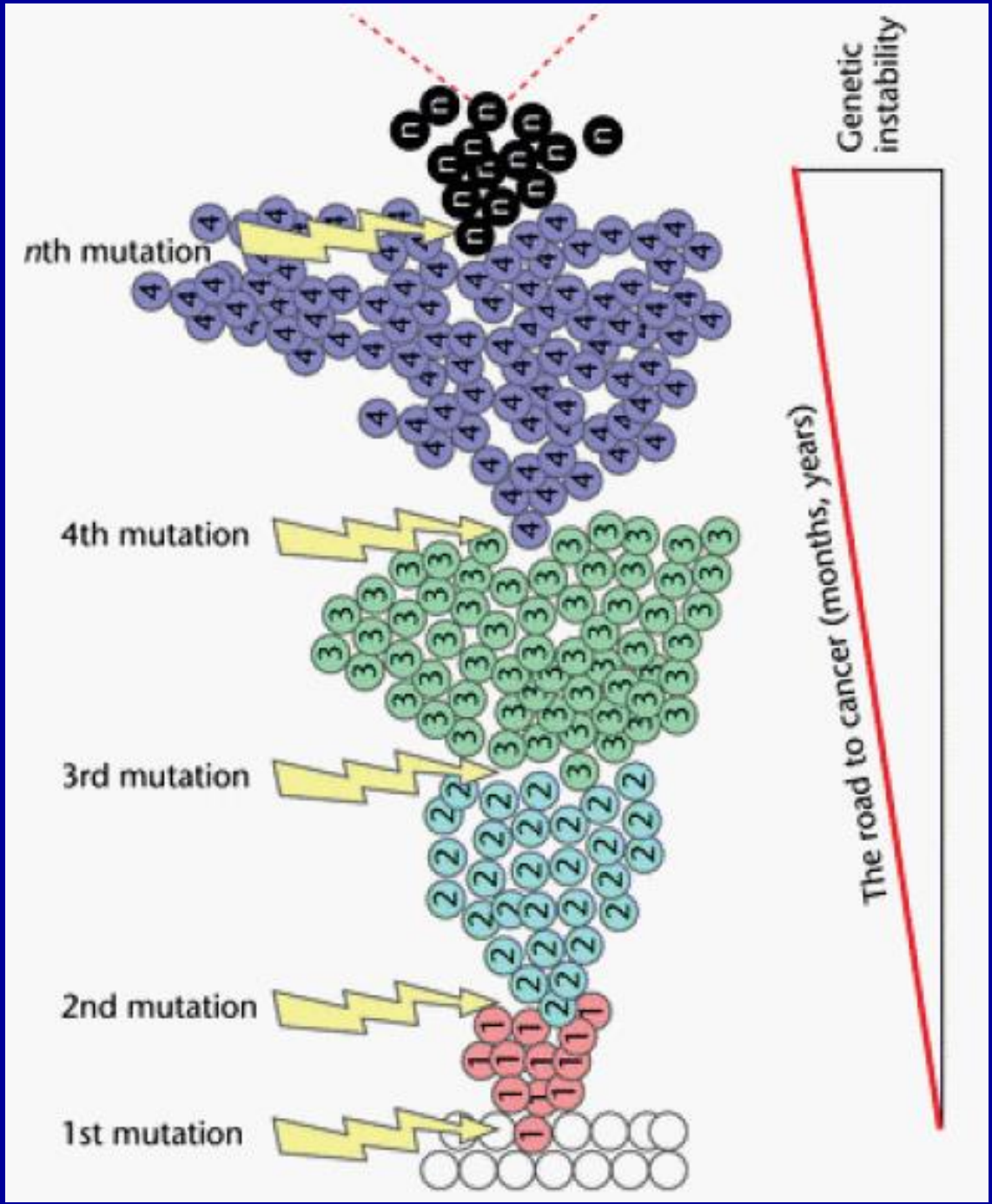
1. В 1971 году Альфред Кнудсон предложил гипотезу, известную сейчас как теория двойного удара
2. Основываясь на данных статистического анализа проявления разных форм ретинобластомы, он предположил, что для возникновения опухоли в клетке должны произойти две последовательные мутации.
3. По современным представлениям, от трёх до шести дополнительных генетических повреждений (в зависимости от природы исходной или предрасполагающей мутации, которая может предопределить путь развития заболевания) требуются для того, чтобы завершить процесс образования опухоли.



Злокачественная трансформация - это сложный, многоэтапный процесс, включающий случайную активацию онкогенов и (или) сайленсинг генов-супрессоров опухоли и осуществляемый посредством генетических или эпигенетических событий. Все это называют "двухударной теорией Кнудсона"

Стволовые клетки как мишень канцерогенеза




1st mutation
2nd mutation
3rd mutation
4th mutation
nth mutation
The road to cancer (months, years)
Genetic instability

Молекулярные механизмы канцерогенеза

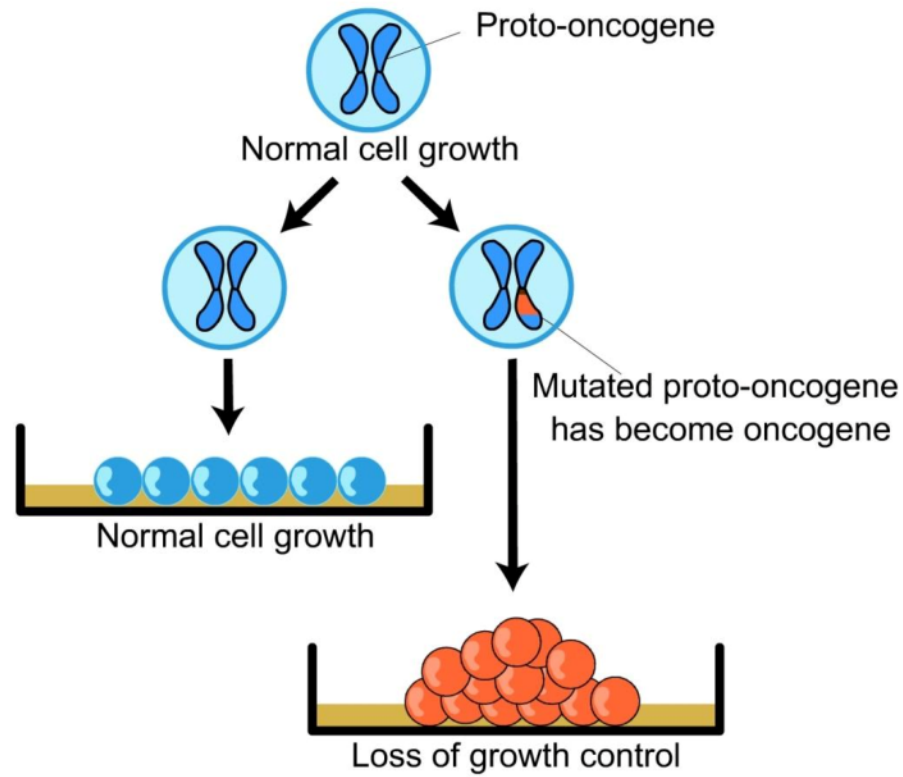
Гены-супрессоры опухолевого роста

Онкогены

Гены репарации ДНК

Онкогены

- Онкогены это мутантные формы клеточных прото-онкогенов.
- Прото-онкогены кодируют белки, регулирующие нормальный клеточный рост и дифференцировку
- Онкогены являются мутированными генами чьё присутствие может стимулировать развитие рака.



Онкогены

Функции онкобелков:

- Факторы роста
- Тирозинкиназы
- Некиназные рецепторы
- G-белки ассоциированные с мембраной
- Цитоплазматические регуляторы
- Факторы транскрипции
- Белки, контролирующие клеточный цикл

Несколько важных онкогенов:

HER-2/neu

- HER-2/neu кодирует клеточный рецептор стимулирующий клеточное деление.
- Ген HER-2/neu амплифицирован в 30% случаев рака груди

RAS

- Продукт гена Ras вовлечён в сигнальный киназный пасвэй который строго контролирует транскрипцию генов регулирующих клеточное деление и дифференциацию.

MYC

- Белок Myc является транскрипционным фактором и контролирует экспрессию нескольких важных генов.

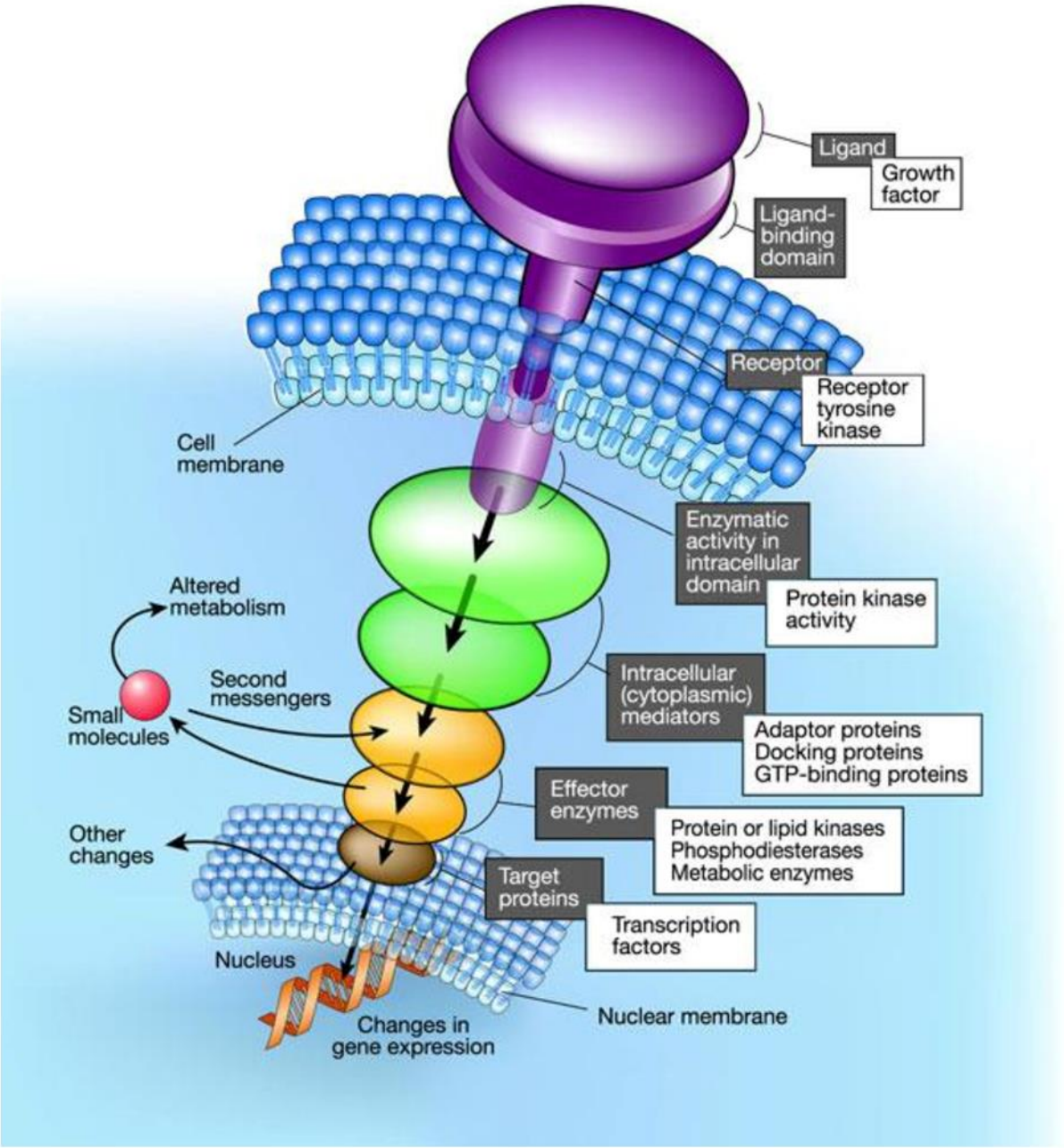
SRC

- Ген Src был первым открытым онкогеном.
- Белок Src является тирозин киназой регулирующей клеточную активнойсть.

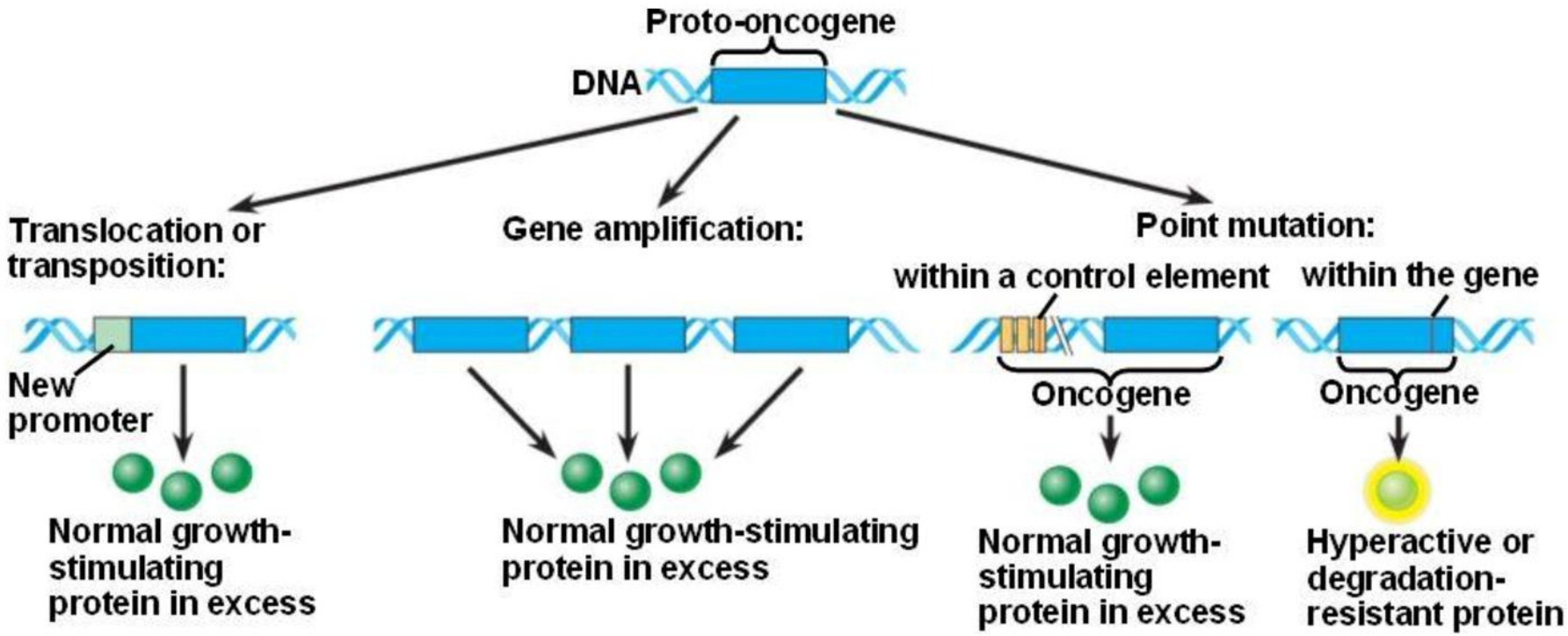
hTERT

- hTERT кодирует фермент – теломеразу

Онкогены

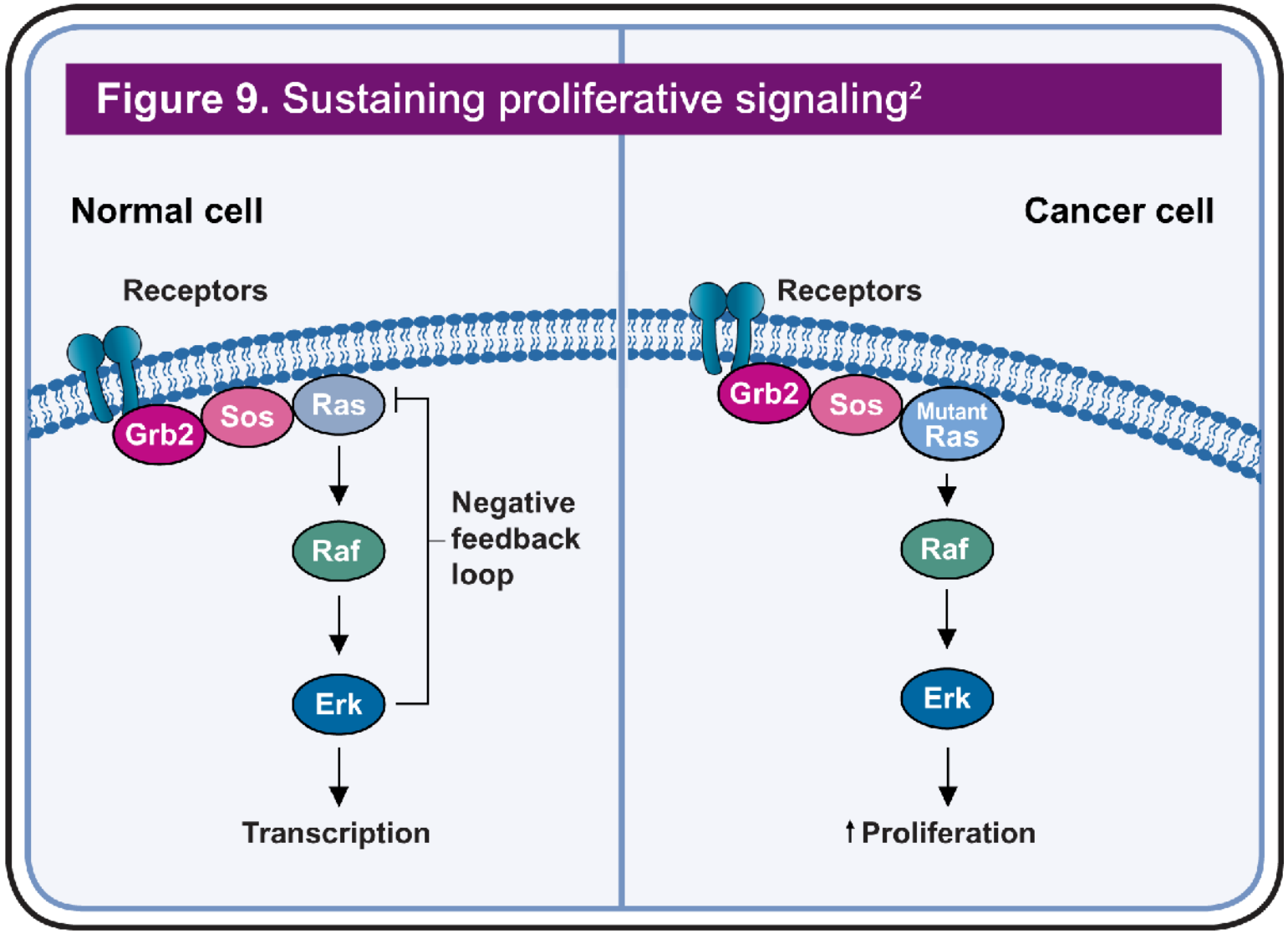

Ligand
Growth factor
Ligand-binding domain
Receptor
Receptor tyrosine kinase
Cell membrane
Enzymatic activity in intracellular domain
Protein kinase activity
Altered metabolism
Second messengers
Small molecules
Intracellular (cytoplasmic) mediators
Adaptor proteins
Docking proteins
GTP-binding proteins
Effector enzymes
Protein or lipid kinases
Phosphodiesterases
Metabolic enzymes
Other changes
Target proteins
Transcription factors
Nucleus
Nuclear membrane
Changes in gene expression

Механизмы активации онкогенов



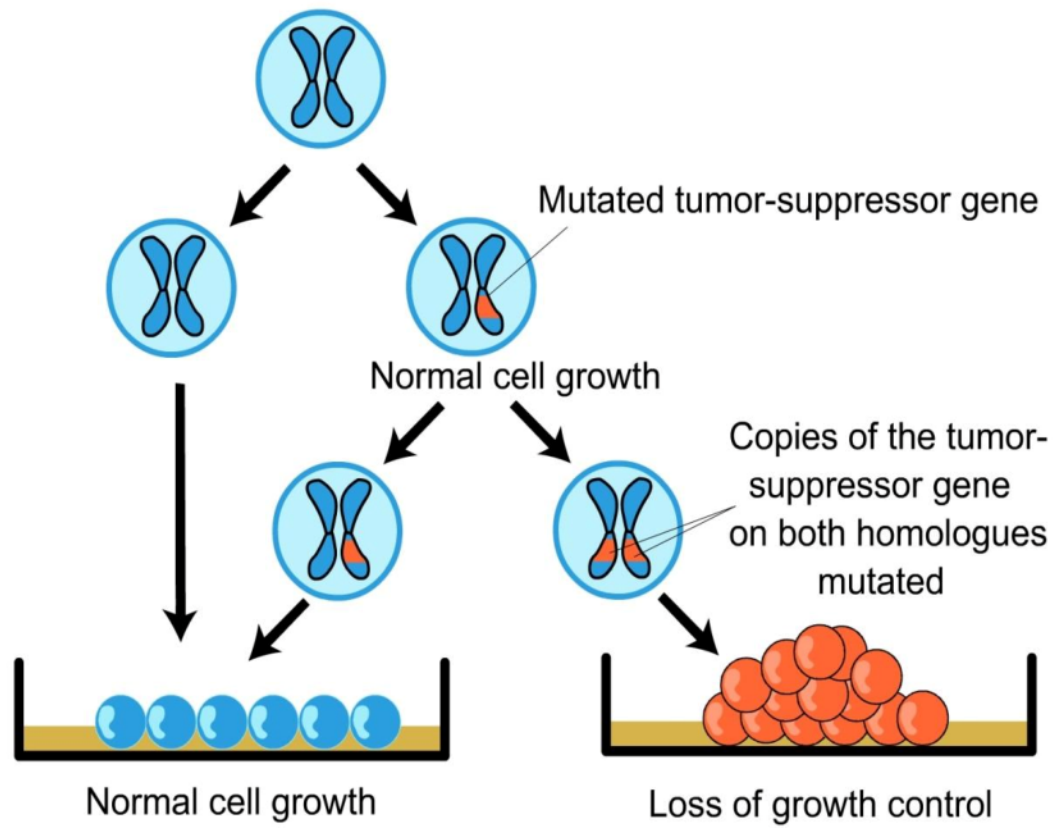
Онкоген

- Пример онкогена – ras
- Все время активный и стимулирует пролиферацию



Гены-супрессоры опухолевого роста

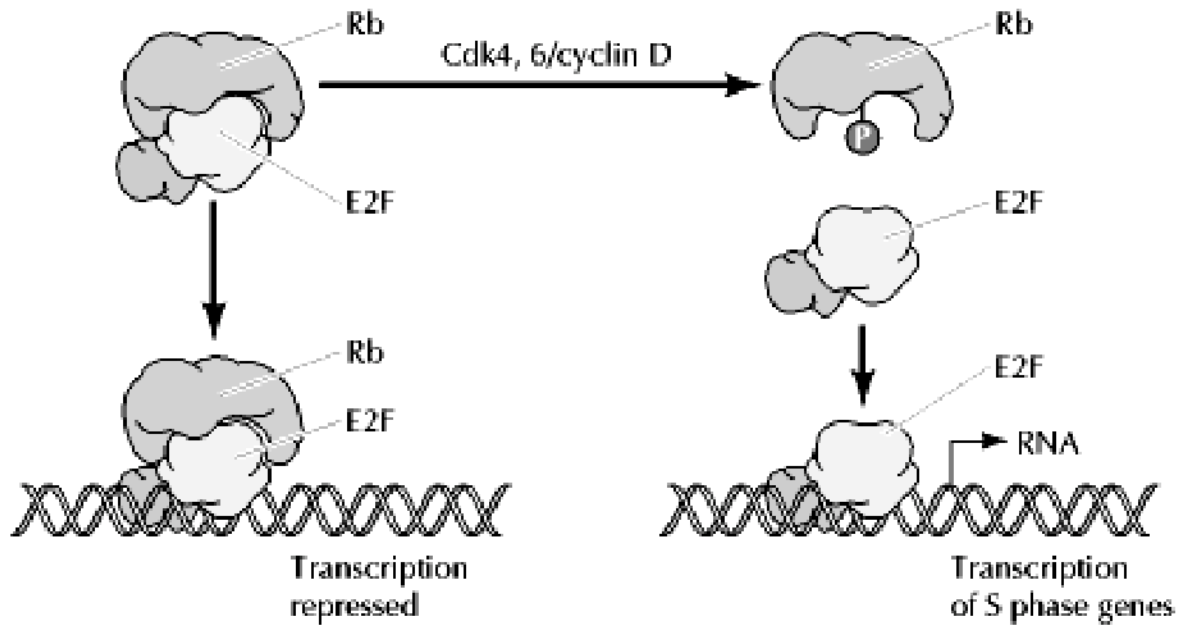
- Гены-супрессоры опухолевого роста в нормальной клетке работают действуют как замедляющие сигналы в течении G1 фазу клеточного цикла, для остановки или замедления клеточного цикла перед S фазой.
- Отсутствие этих генов приводит к возникновению рака.
- Обычно для этого необходимо возникновение мутаций в обоих аллелях гена.
- Одни из известных генов-супрессоров опухолевого роста: p53, Rb, APC.



Гены-супрессоры опухолевого роста

Пример гена-супрессора опухолевого роста – Rb1:

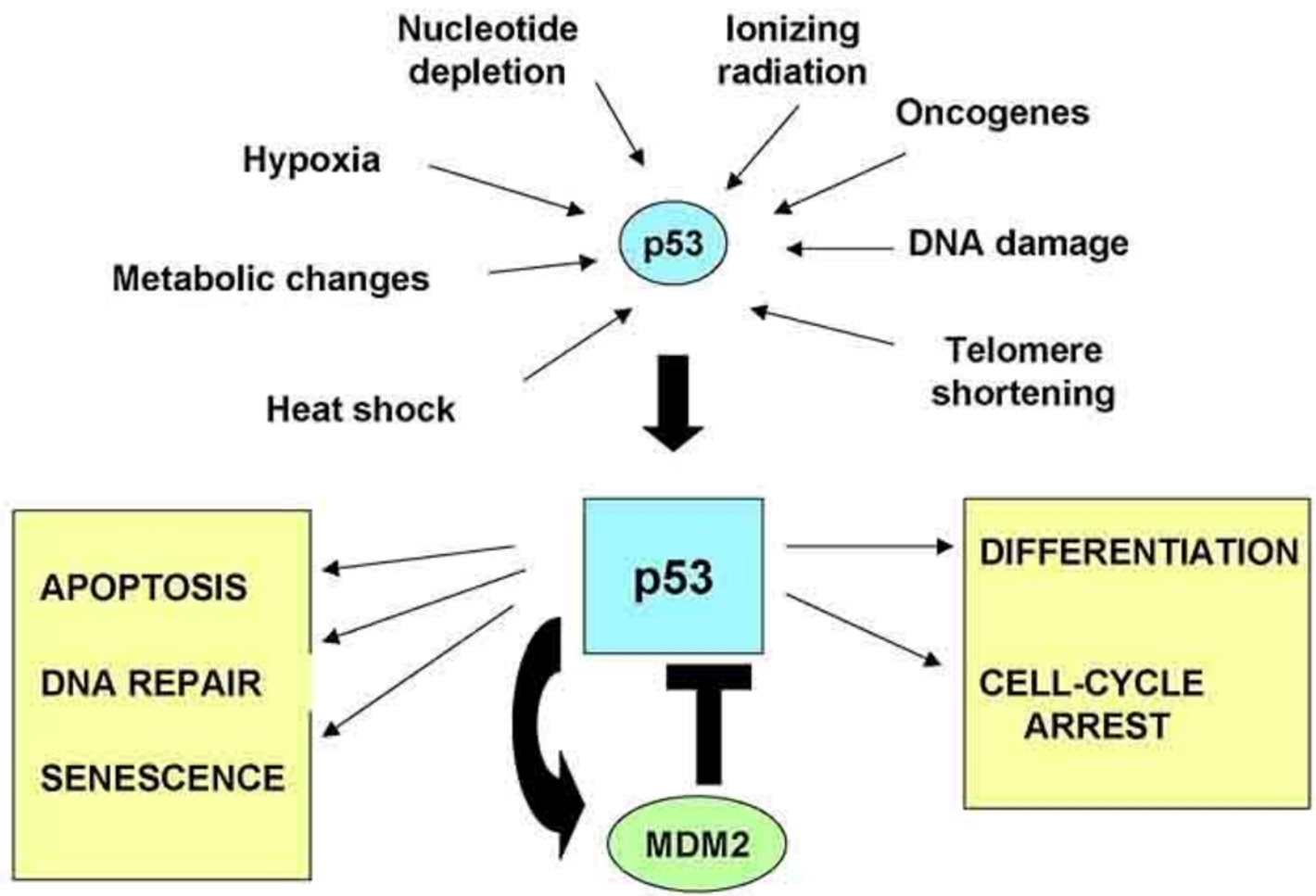
- Ген RB1 - ретинобластома располагается на 13 хромосоме.
- Этот ген был найден первым в числе подавляющих опухоль.
- С гена считывается белок, негативный регулятор клеточного цикла
- Активная, гипофосфорилированная форма белка, связывает фактор транскрипции E2F1
- Влияя на активность транскрипционных факторов контролирует клеточное деление.



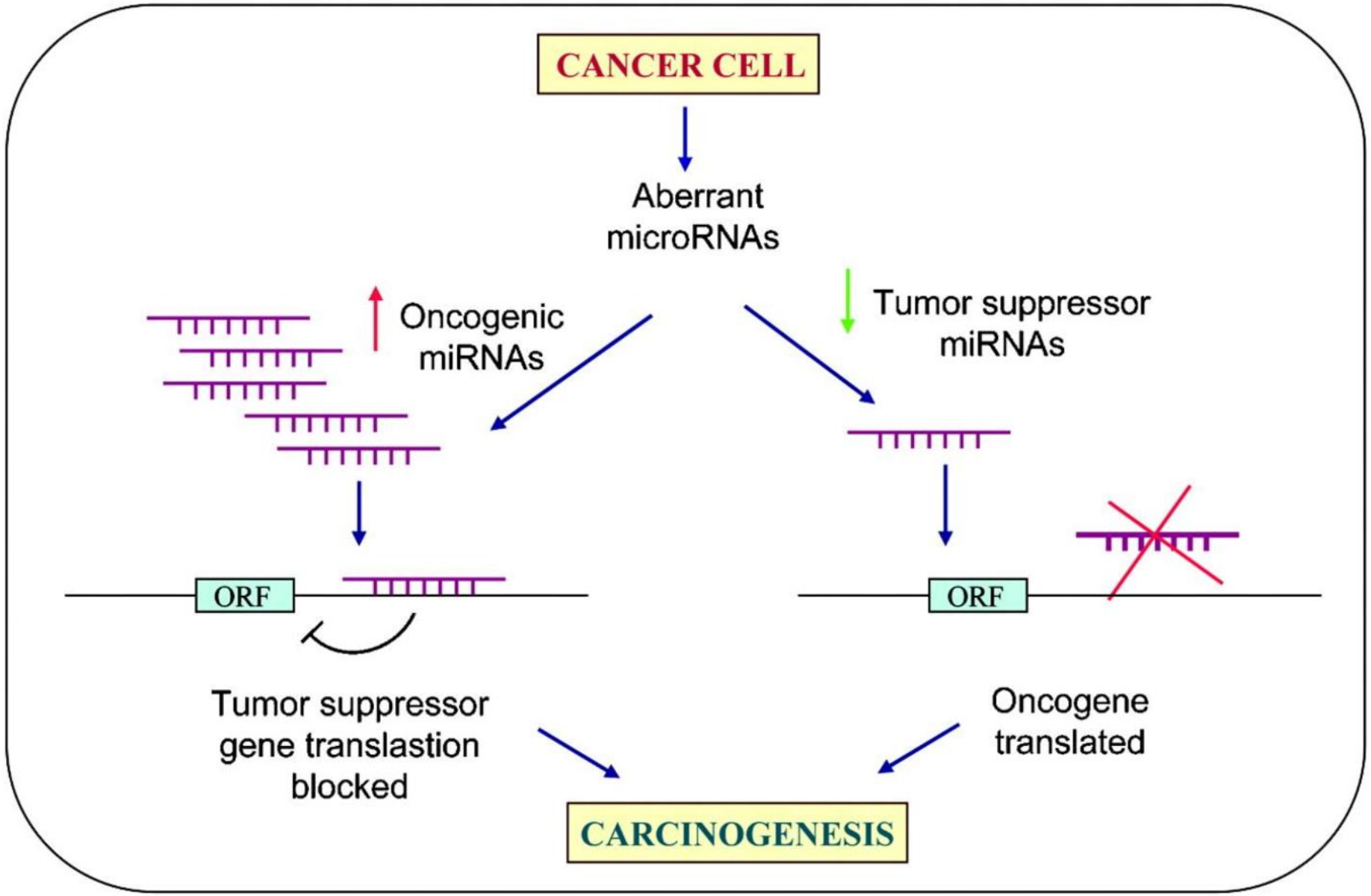
Гены-супрессоры опухолевого роста

Пример гена-супрессора опухолевого роста – p53

- p53 является транскрипционным фактором регулирующим клеточное деление и смерть.



miRNA – онкогены и гены-супрессоры опухолевого роста

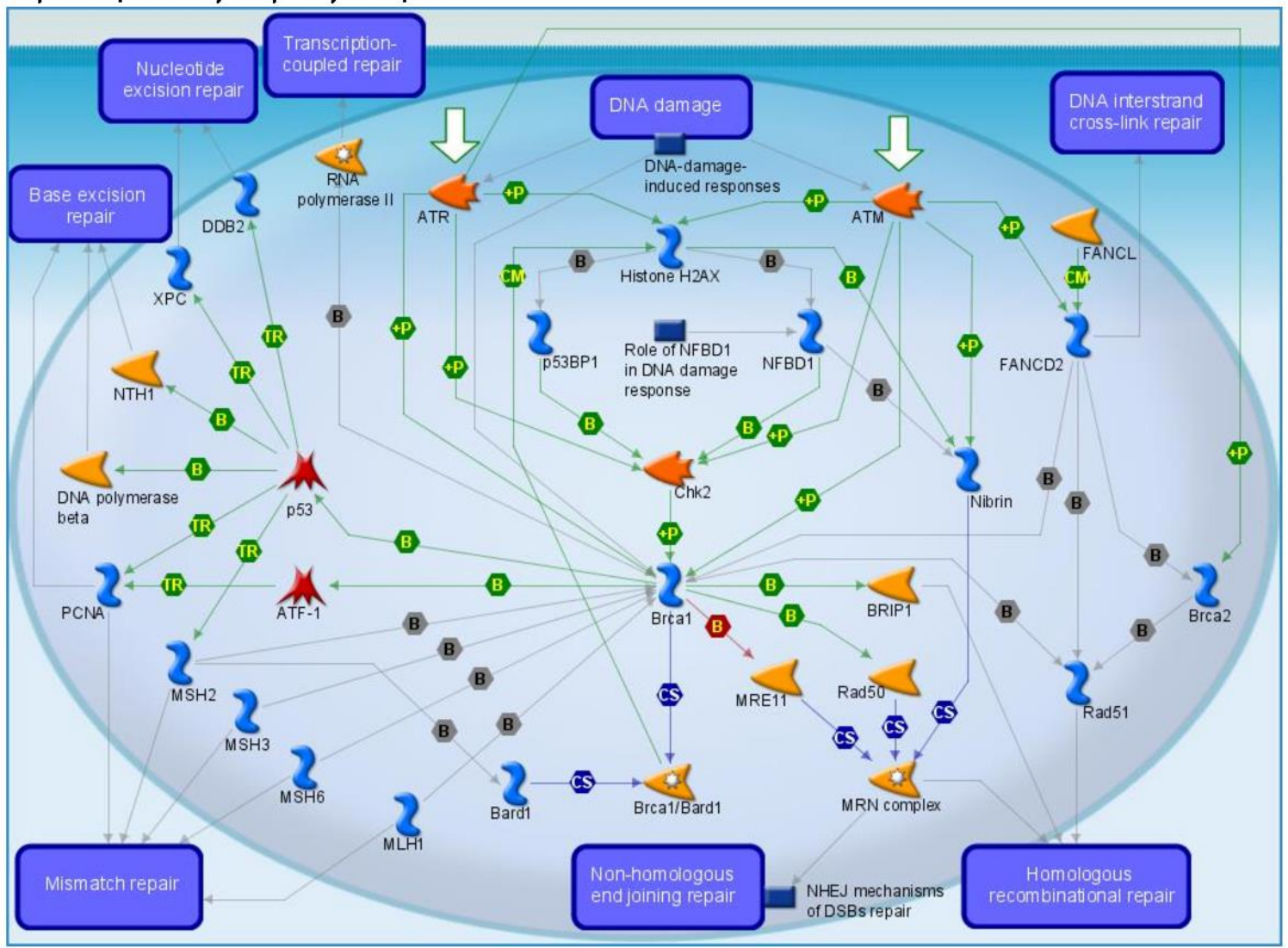


Гены репарации ДНК

- Эти гены обеспечивают аккуратное копирование каждой цепи ДНК во время деления клетки.
- Мутации в генах репарации ДНК приводят к увеличению частоты мутаций в других генах, таких как прото-онкогены и гены супрессоры опухоли.
- Гены участвующие в развитии рака груди (BRCA1 и BRCA2)
- Гены участвующие в развитии наследуемого неполипозного рака кишечника (MSH2, MLH1, PMS1, PMS2) вовлечены в репарацию ДНК.
- Мутации в этих генах вызывают опухолеобразование.

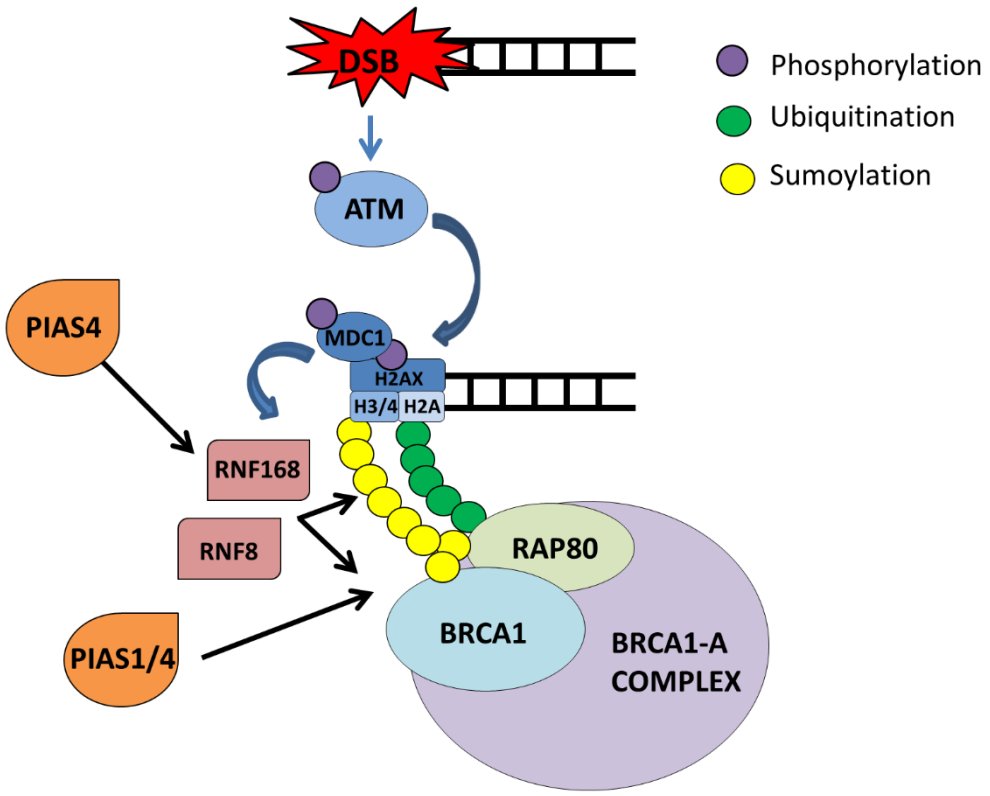
Гены репарации ДНК

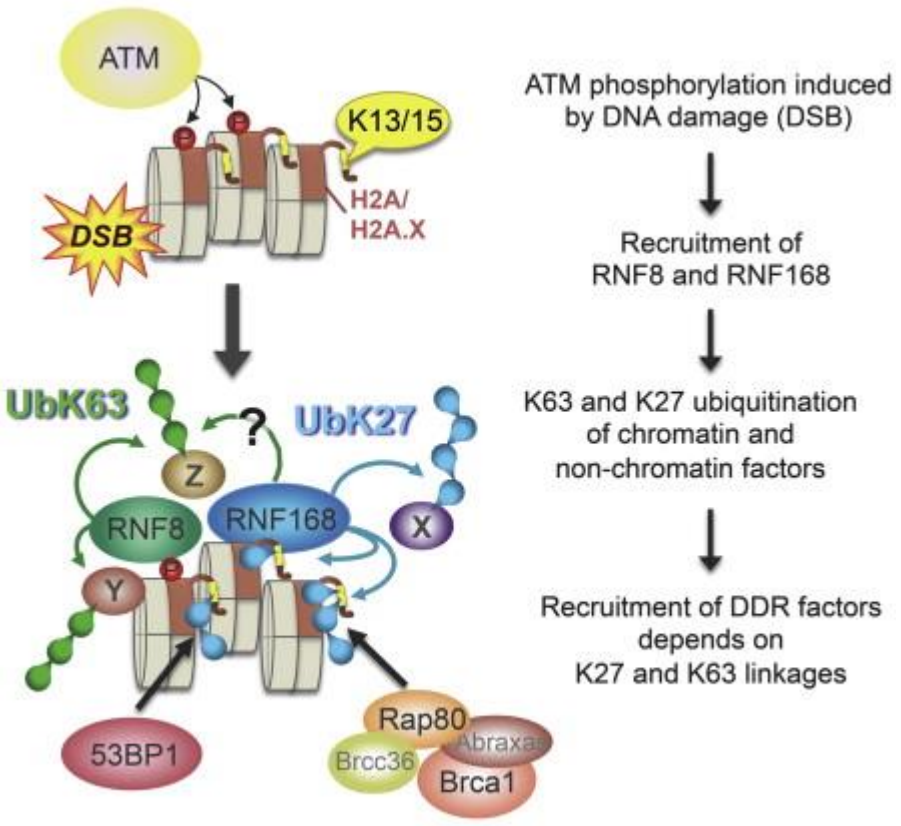
- BRCA1 является важным компонентов клеточных путей регулирующих ДНК-репарацию, прохождение клеточного цикла, убитиквинилирование, и транскрипционную регуляцию.



BRCA

- BRCA1 являются человеческим геном и его белковым продуктом соответственно. Официальным символом
- BRCA1 представляет собой ген супрессора опухоли человека, обнаруженный у всех людей; его белок, также называемый белком рака молочной железы типа 1, отвечает за репарацию ДНК
- BRCA1 и BRCA2 являются несвязанными белками, но оба они обычно экспрессируются в клетках груди и другой ткани, где они помогают восстановить поврежденную ДНК или уничтожают клетки, если ДНК не может быть восстановлена. Они участвуют в восстановлении хромосомного повреждения с важной ролью в безошибочном восстановлении двунитевых разрывов ДНК





BRCA1 взаимодействует с другими супрессорами опухолей, индикаторами повреждения ДНК и преобразователями сигналов для образования большого комплекса с несколькими субъединицами, известного как BRCA1-ассоциированный комплекс контролирующий целостность генома (BASC). Белок BRCA1 ассоциируется с РНК-полимеразой II и через С-концевой домен также взаимодействует с комплексами гистондезацетилазы. Таким образом, этот белок играет роль в транскрипции, репарации ДНК двунитевых разрывов ubiquitination, регуляции транскрипции, а также других функций

- С генетической предрасположенностью связано только 5–10% случаев возникновения рака молочной железы. В Европе лишь 2% заболевших — носители мутаций.
- С другой стороны, среди молодых женщин (в возрасте до 50 лет) процент рака молочной железы, связанный с генетической патологией, несколько выше, чем у женщин более старшего возраста. Если в семье были случаи заболевания раком молочной железы или яичников у близких родственников (мамы, сестры, тети), это повышает вероятность того, что РМЖ будет обусловлен генетической предрасположенностью.
- Существует как минимум два гена, изменения в которых связаны с повышением частоты возникновения рака молочной железы.
  - BRCA-мутации относятся к аутосомным доминантным мутациям. Это означает, что ген, унаследованный от одного родителя и имеющий мутацию, будет проявляться несмотря на то, что другой ген (полученный от другого родителя) является нормальным.
  - Ген BRCA1 расположен в 17-й хромосоме, а BRCA 2 – в 13-й хромосоме. Ученые выделяют сотни различных мутаций каждого из этих генов.
  - Гены BRCA в норме функционируют как гены, подавляющие развитие опухоли. Они кодируют белок, используемый для реконструкции (исправления повреждений) ДНК.
  - Однако белки в генах с мутациями короче нормальных и не могут должным образом «починить» ДНК.
  - Ученые считают, что именно укороченная длина белков и способствует повреждению ДНК в клетках и, как следствие, развитию раковых опухолей.
- Женщины, у которых встречаются мутации генов BRCA1 и BRCA 2, подвержены существенно более высокому риску развития рака молочной железы.
- При отсутствии мутации гена BRCA вероятность развития рака молочной железы у женщин к 85 годам составляет 12%. У женщин с мутациями генов BRCA1 и BRCA 2 риск заболевания раком гораздо выше. При наличии мутации гена BRCA1 риск заболевания на протяжении жизни составляет от 60 до 90%, при наличии мутации гена BRCA2 риск развития рака молочной железы составляет от 30 до 85%. Эти проценты показывают риск в среднем, но риск для каждой отдельно взятой женщины с мутацией BRCA может выйти за рамки этого диапазона.
- В целом, носителем генов с мутацией BRCA является один из 400 и 800 человек соответственно.
- Уровень риска гораздо выше для женщин евреек ашкеназского происхождения, у которых мутации генов BRCA1 и BRCA 2 составляют 1 из 40 случаев.
- Некоторые исследования показывают, что женщины с разной этнической принадлежностью могут иметь разные мутации генов BRCA.
- Большинство факторов риска развития рака молочной железы сходным образом влияют на женщин с мутацией генов BRCA и без нее.
- Однако влияние некоторых репродуктивных факторов и образа жизни может быть различным для женщин, имеющих мутацию гена BRCA и женщин, не имеющих мутацию.
- У среднестатистической женщины наличие детей и роды в молодом возрасте уменьшают риск развития рака молочной железы, но некоторые исследования показывают, что эти факторы не оказывают никакого влияния на снижение риска в отношении женщин с мутацией генов BRCA. Другие исследования показывают, что для носителей мутации гена BRCA-2 большое количество детей может, напротив, увеличить риск. Кроме того, раннее начало менструации (раньше 12 лет) и использование контрацептивов (текущее или в недавнем прошлом) увеличивает риск развития рака молочной железы для большинства женщин, но пока неизвестно, влияют ли эти факторы на носителей мутаций BRCA.
- Мутации BRCA 1 также увеличивают риск развития рака яичников, предстательной железы и рака толстой кишки.
- Мутации BRCA 2 увеличивают риск развития рака поджелудочной железы, желчного пузыря, желчного протока, желудка.
- Мужчины, имеющие мутацию гена BRCA 2, имеют повышенный риск развития рака молочной железы, и даже если у них не было этого вида рака, мутация может передаться их детям.
- В то время как у женщин только 5-10% случаев рака молочной железы связаны с мутациями генов, у мужчин мутации гена BRCA2 становятся причиной 40% случаев развития этого вида рака.
- Выявление генетической мутации в генах BRCA1 и BRCA2 говорит о том, что женщина находится в группе повышенного риска развития рака молочной железы и рака яичников, и ей в течение всей жизни следует быть более внимательной к своему здоровью, чтобы снизить этот риск.
- Доказано, что генетические мутации передаются по наследству, но не все родственницы получают этот генетический дефект. Мутации в генах можно обнаружить при проведении специального анализа крови. В нашей стране это исследование, к сожалению, не покрывается системой обязательного медицинского страхования, но его можно сделать платно в ведущих научно-исследовательских институтах и лечебных учреждениях, которые специализируются на лечении онкологических заболеванийсли после консультации с врачом (маммологом, гинекологом, онкологом, семейным доктором) вам рекомендовано пройти генетическое исследование, уточните у врача, где можно сделать такое исследование.
- ВАЖНО!
- Выявление измененных генов BRCA1 и BRCA2 прогнозирует высокую степень риска развития рака молочной железы и яичников, но не способно дать точную оценку степени этого риска, предугадать возраст возникновения заболевания, а также его вид (рак молочной железы или яичников). Например, по данным Израильской ассоциации по борьбе против рака, около 70% женщин, заболевших раком молочной железы, не относились ни к одной из известных групп риска.
- Выбор Анджелины Джоли. Мнения экспертов
- Издание The New York Times опубликовало колонку Анджелины Джоли, в которой актриса и режиссер рассказала о том, что после двойной мастэктомии (удаления молочных желез) сделала операцию по удалению яичников и маточных труб. Свое решение Джоли объяснила наличием в ее организме мутации гена BRCA1 и высоким риском развития рака РМЖ и рака яичников, а

Три главных клеточных стратегии, используемые раковыми клетками для достижения рост-факторной автономии

- Изменения во внеклеточных ростовых сигналах
- Изменения в трансклеточных медиаторах этих сигналов (рецепторы)
- Изменения во внутриклеточных сигнальных посредниках (мессенджерах), которые стимулируют пролиферацию.

Продукты онкогенов представляют все этажи путей передачи митогенных сигналов

Ростовые факторы/Цитокины
(PDGF-β/SIS, FGF1, WNT1 и др.)

Рецепторные тирозинкиназы
(ErbB1/EGF-R,ErbB2,PDGF-Rβ, HGF-R /MET, RET и др.)

Рецепторы, сопряженные с G-белками
(Mas,TSH-R, Gsp, Gip2 и др.)

G-белки
(K-RAS, H-RAS, N-RAS и др.)

Нерецепторные тирозинкиназы
(Src, Fgr, Abl и др.)

Серин-треониновые/MAP-киназы
(Raf, Mos, Erk)

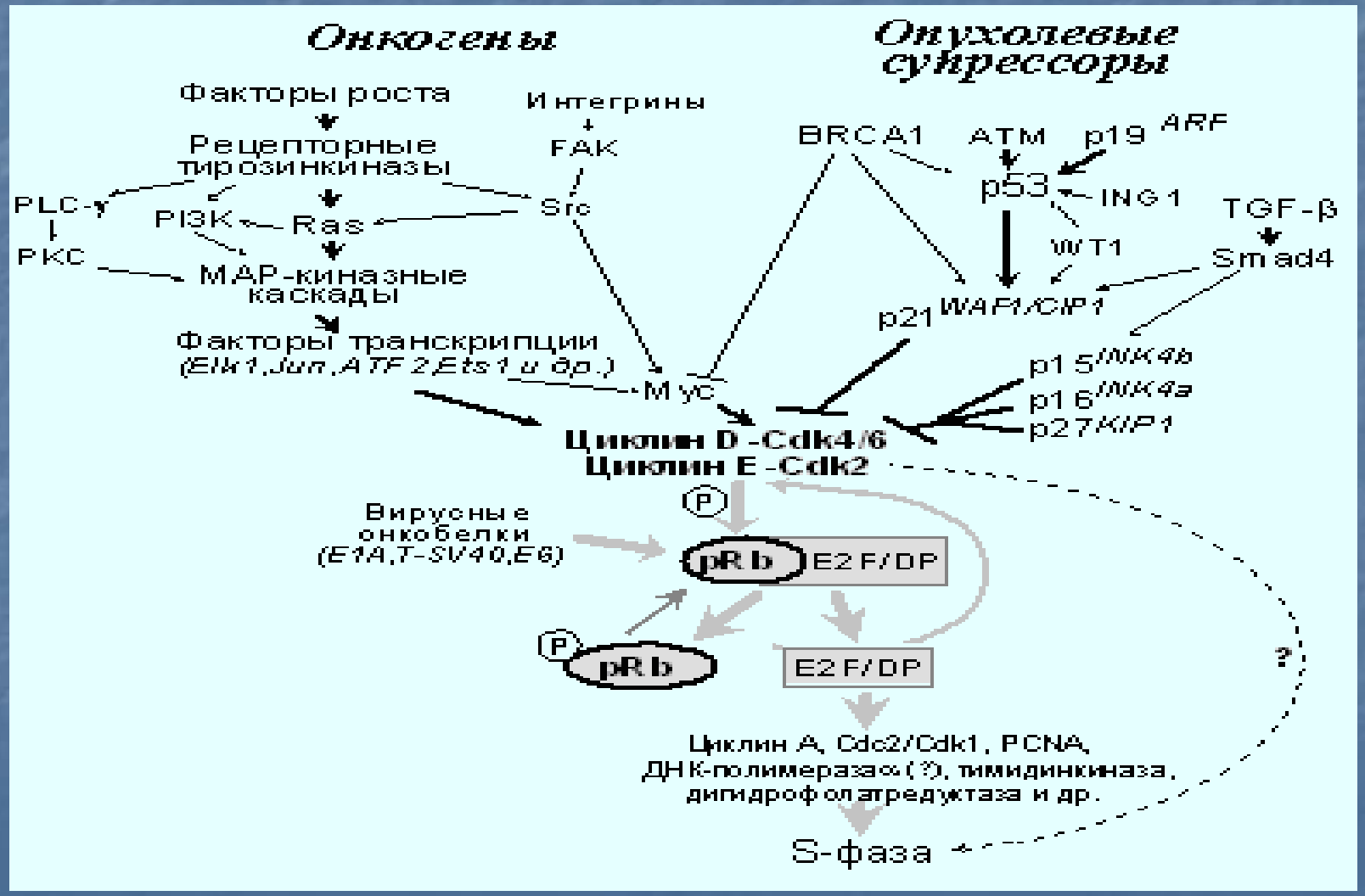
Компоненты STAT-путей
(Jak2, и др.)

Факторы транскрипции
(Myc,β-катенин, Jun, Fos, Ets1 и др.)

Циклин-зависимые киназы
(циклинD1/PRAD1, Cdk4)

Внеклеточный матрикс
Факторы роста
Интегрины
Рецепторные тирозинкиназы
Ras
Rho
MAP-киназы (*Erk1/2, Jnk, p38*)
Факторы транскрипции (Elk1, SRF, Ets1, Jun, Fos и др.)
p21Cip1/Waf1
p27Kip1
циклинD1
Myc
вход в S фазу

Онкогены и опухолевые супрессоры в регуляции клеточного цикла



Пути активации Myc в неопластических клетках:

Изменения структуры/регуляции гена *MYC*

1) Хромосомные транслокации, перемещающие *MYC* под контроль регуляторных элементов генов иммуноглобулинов (лимфома Бэркита, лимфосаркомы);

2) Амплификация и гиперэкспрессия гена (рак молочной железы, простаты и др.);

3) Мутации, повышающие стабильность белка (лимфома Бэркита и др.)

Продукты онкогенов представляют все этажи путей передачи митогенных сигналов

Ростовые факторы/Цитокины
(PDGF-β/SIS, FGF1, WNT1 и др.)

Рецепторные тирозинкиназы
(ErbB1/EGF-R,ErbB2,PDGF-Rβ, HGF-R /MET, RET и др.)

Рецепторы, сопряженные с G-белками
(Mas,TSH-R, Gsp, Gip2 и др.)

G-белки
(K-RAS, H-RAS, N-RAS и др.)

Нерецепторные тирозинкиназы
(Src, Fgr, Abl и др.)

Серин-треониновые/MAP-киназы
(Raf, Mos, Erk)

Компоненты STAT-путей
(Jak2, и др.)

Факторы транскрипции
(Myc,β-катенин, Jun, Fos, Ets1 и др.)

Циклин-зависимые киназы
(циклинD1/PRAD1, Cdk4)

Новообразования человека, ассоциированные с изменениями протоонкогенов, контролирующих вход в S-фазу

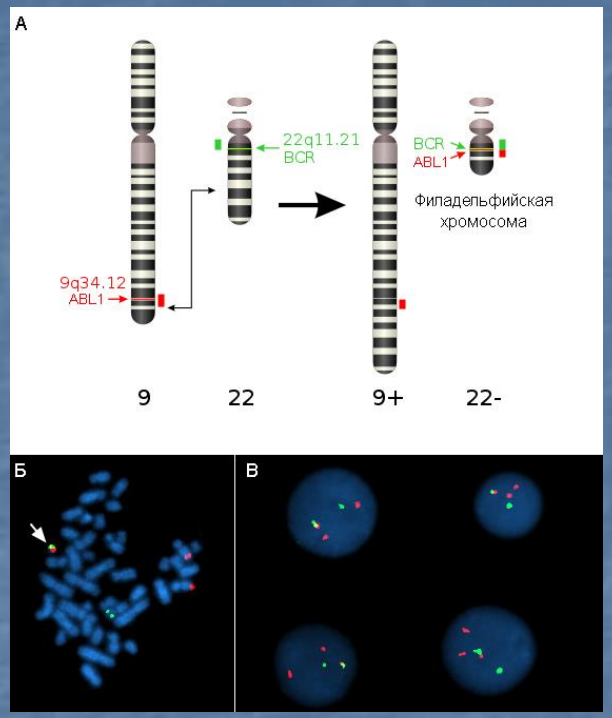
Рецепторные тирозинкиназы:	
мутации, инверсии RET/GDNF-R	Рак щитовидной железы, MEN2ab
амплификация ERBB2/HER2	Рак молочной железы
транслокации PDGF-Rβ	Острый и хрон. миелолейкозы
GPCR (G Protein-Coupled Receptors**):**	
мутации GSP	Рак щитовидной железы, эпифиза
мутации GIP2	Опухоли яичника, надпочечника
G-белки:	
мутации K-RAS, N-RAS,H-RAS	Многие новообразования
Нерецепторные тирозинкиназы:	
мутации SRC	Рак толстого кишечника
Компоненты STAT-путей:	
хром. транслокации JAK2	Острый лимфолейкоз
Факторы транскрипции:	
транслокации, мутации C-MYC	Лимфома Бэркита, лимфосаркома
мутации CTNNB1 (β-катенина)	Опухоли толстого кишечника
хром. транслокации FLI1	Саркома Юинга
Циклинзависимые киназы:	
амплификация PRAD1/циклинD1	Рак пищевода, печени и др. опухоли

Филадельфийская хромосома

- Первая описанная структурная геномная перестройка в соматических клетках, которая вызывает онкологическое заболевание,
- Согласно Международной цитогенетической номенклатуре человека имеет собственное обозначение — Ph. Эта хромосома была названа в честь города в США, где работали её первооткрыватели П. Новелл (P. Nowell) и Д. Хангерфорд (D. Hungerford), сообщившие в 1960 г. о необычной маленькой хромосоме в лейкоцитах двух больных хроническим миелолейкозом.
- Филадельфийская хромосома возникает вследствие реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22
- Мутация вызывает 95 % случаев хронического миелолейкоза и 20—50 % случаев острого В-лимфобластного лейкоза взрослых.
- Эта мутация является одной из самых распространённых при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе взрослых.

Молекулярная биология РНЕ

- В результате транслокации t(9;22)(q34;q11) ген ABL1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) из хромосомы 9 (участок q34) объединяется с участком BCR (breakpoint cluster region) хромосомы 22 (участок q11).
- В новый химерный белок BCR-ABL входит участок белка ABL1, обладающий тирозинкиназной активностью, этой активностью обладает и химерный белок. В норме тирозинкиназы являются медиаторами, активируемыми связыванием факторов роста с мембранными рецепторными белками и передающими сигнал к делению на ядро, но BCR-ABL является постоянно активной формой и вызывает безудержное деление клетки

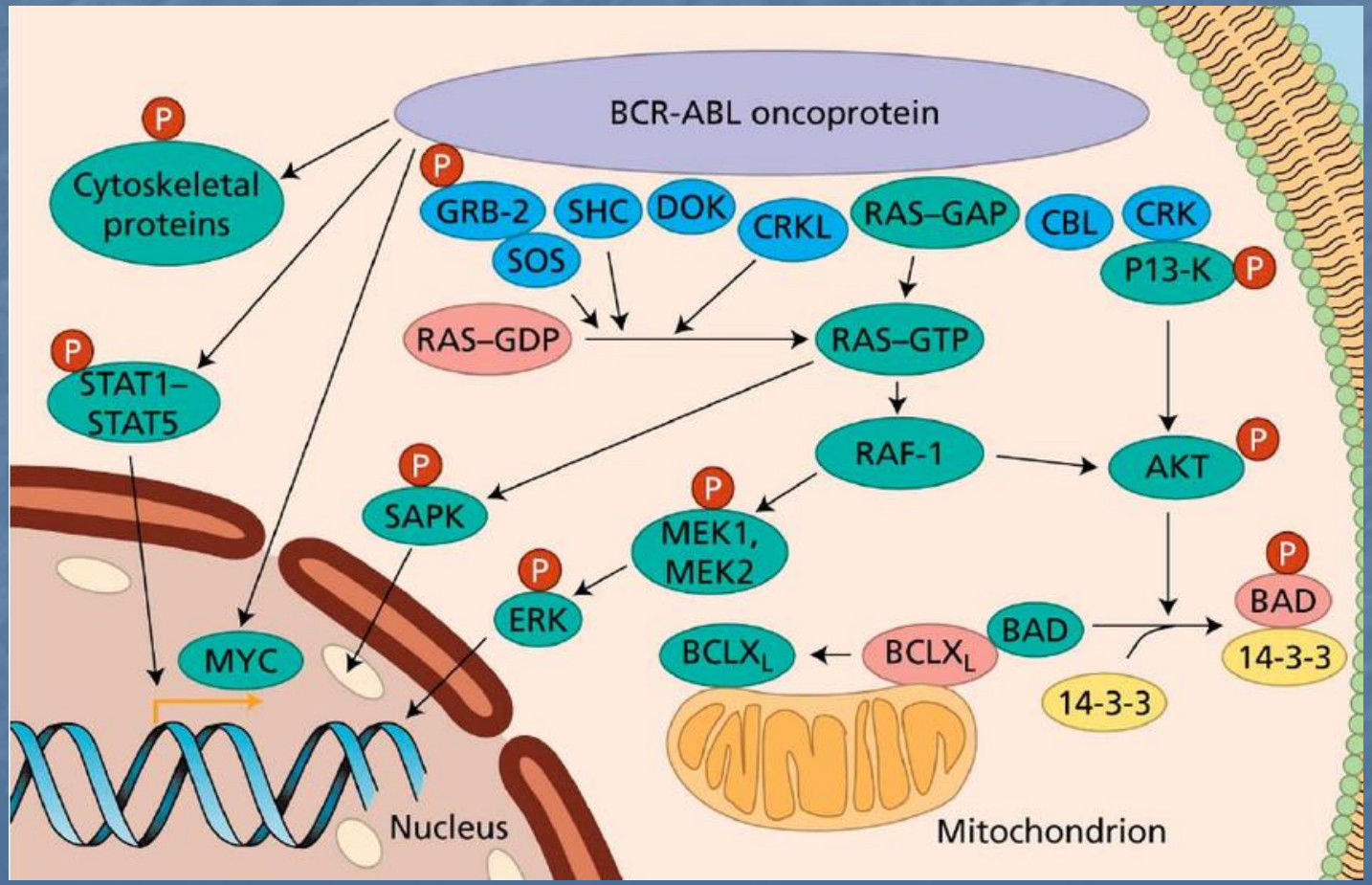


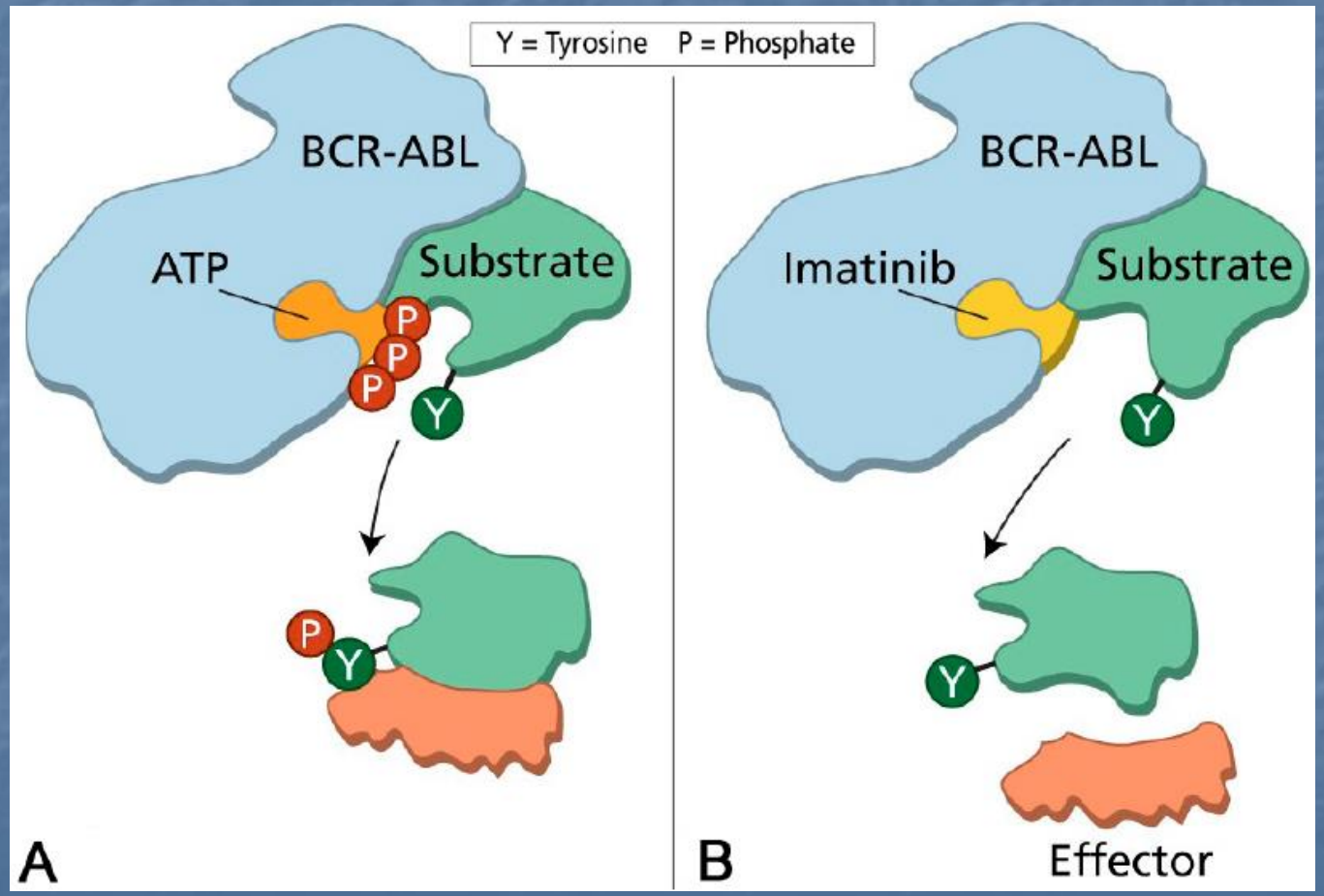
Детекция филадельфийской хромосомы при помощи флуоресцентной гибридизации in situ. А. Локализация проб в нормальных и перестроенных хромосомах. Б. Метафазная пластинка с Ph-хромосомой (указана стрелкой). В. Интерфазные ядра с Ph-хромосомой.

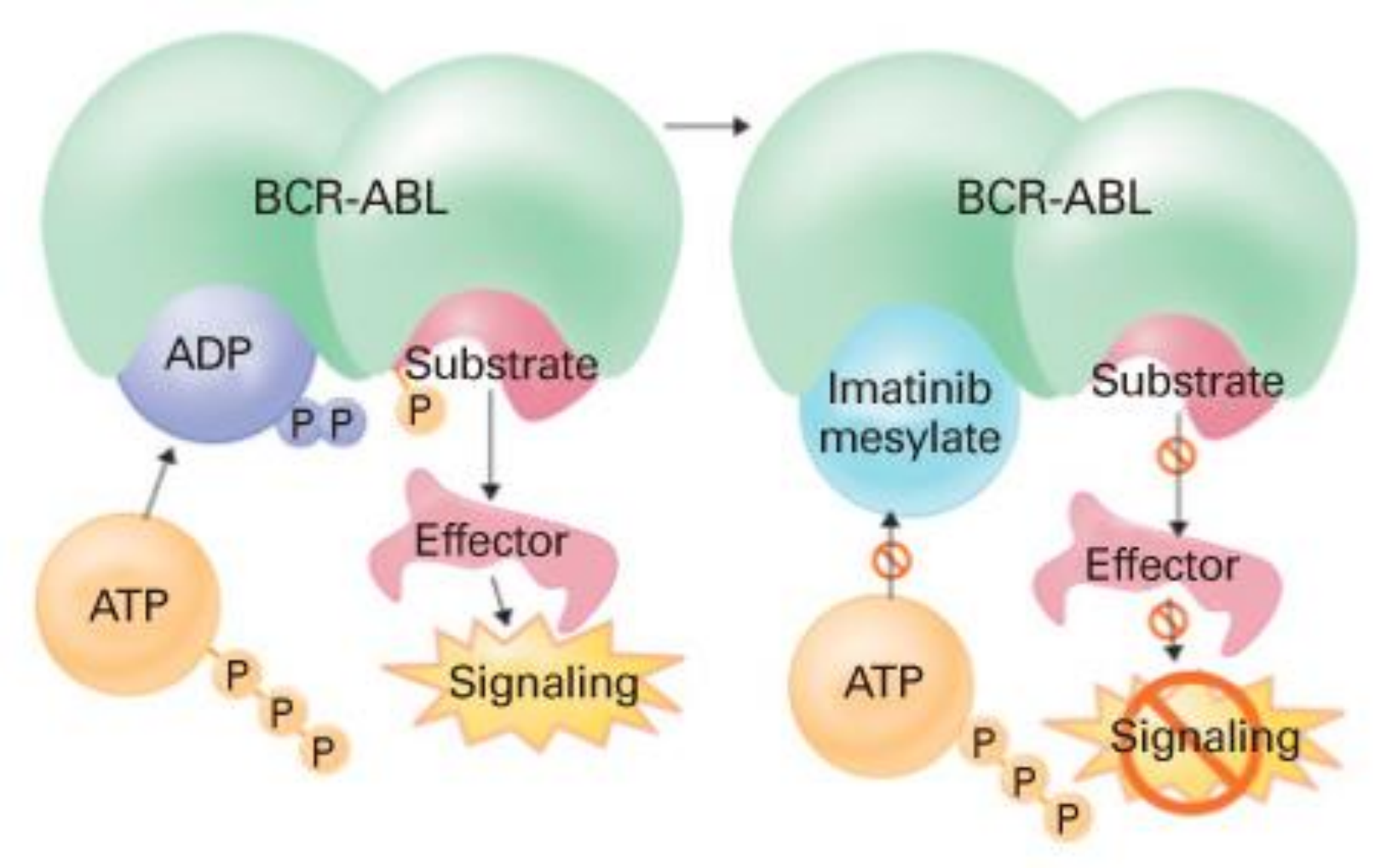
иматиниб

противолейкозный цитостатический препарат, один из представителей нового класса таргетных цитостатиков, избирательно воздействующих на клетки, имеющие те или иные характерные для опухолей генетические дефекты. Производится под торговыми наименованиями: Gleevec (Канада, Южная Африка и США), Glivec (Австралия, Европа и Латинская Америка), встречается под названием STI-571

- Ингибитор тирозиновой протеинкиназы. Иматиниб эффективно ингибирует гибридную тирозинкиназу BCR-ABL, ген которой находится на «филадельфийской хромосоме» (Ph), образующейся вследствие реципрокной транслокации между 9-й и 22-й хромосомами, in vitro и in vivo.
- Иматиниб селективно подавляет пролиферацию и вызывает апоптоз клеточных линий, позитивных по Bcr-Abl, а также лейкозных клеток при Ph-положительном хроническом миелолейкозе и остром лимфобластном лейкозе.
- Кроме того, иматиниб является сильнодействующим ингибитором тирозинкиназной активности рецепторов фактора роста тромбоцитов (PDGF) и фактора стволовых клеток (SCF), а также подавляет клеточные реакции, опосредуемые этими факторами.
- In vitro иматиниб ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптоз клеток опухолей желудочно-кишечного тракта, имеющих мутации kit

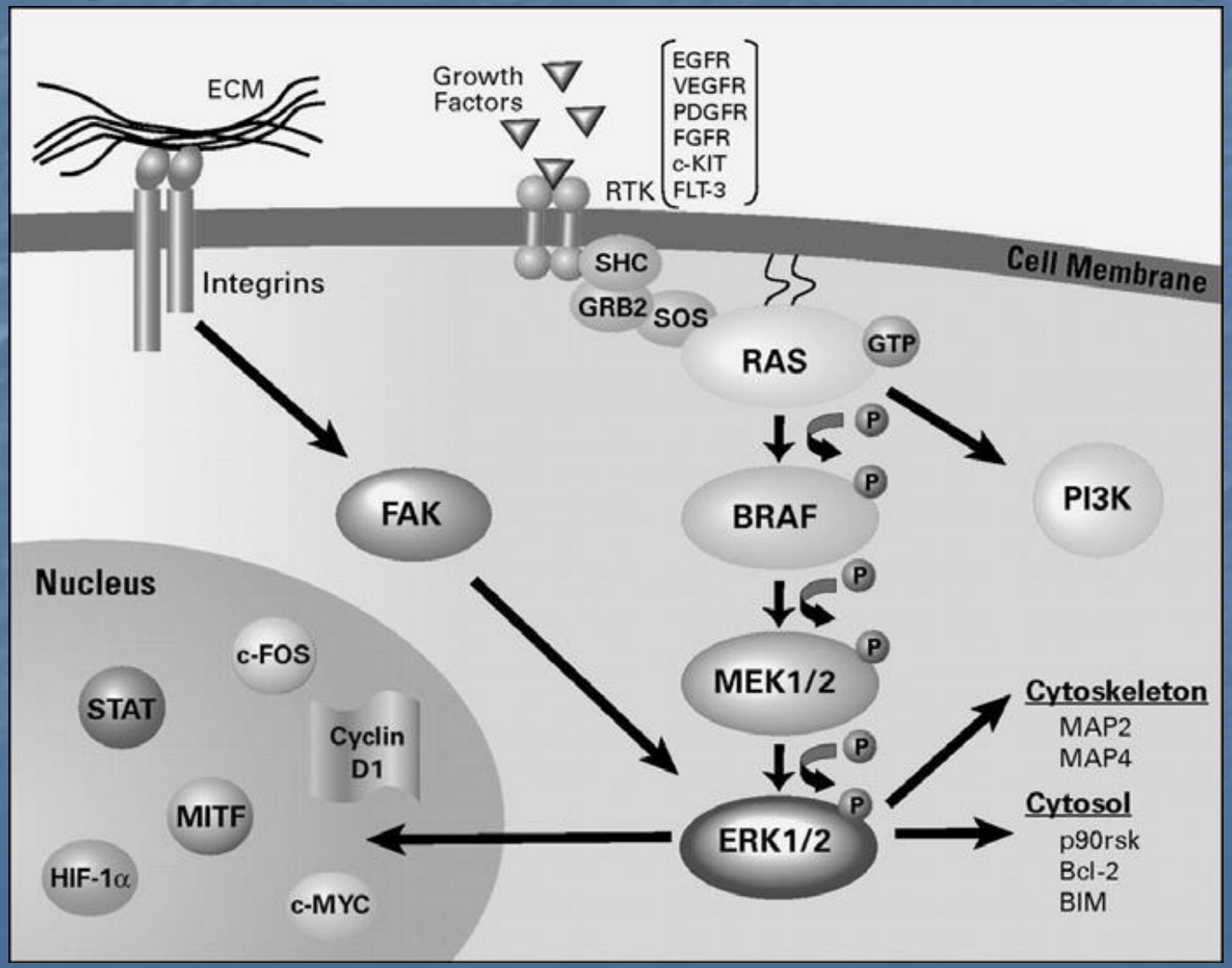

BCR-ABL oncoprotein
P
Cytoskeletal proteins
P
GRB-2
SHC
DOK
CRKL
RAS–GAP
CBL
CRK
SOS
P13-K
P
RAS–GDP
RAS–GTP
P
STAT1–STAT5
RAF-1
AKT
P
P
SAPK
P
MEK1, MEK2
P
ERK
P
BAD
BAD
14-3-3
MYC
BCLX$_L$
BCLX$_L$
14-3-3
Nucleus
Mitochondrion

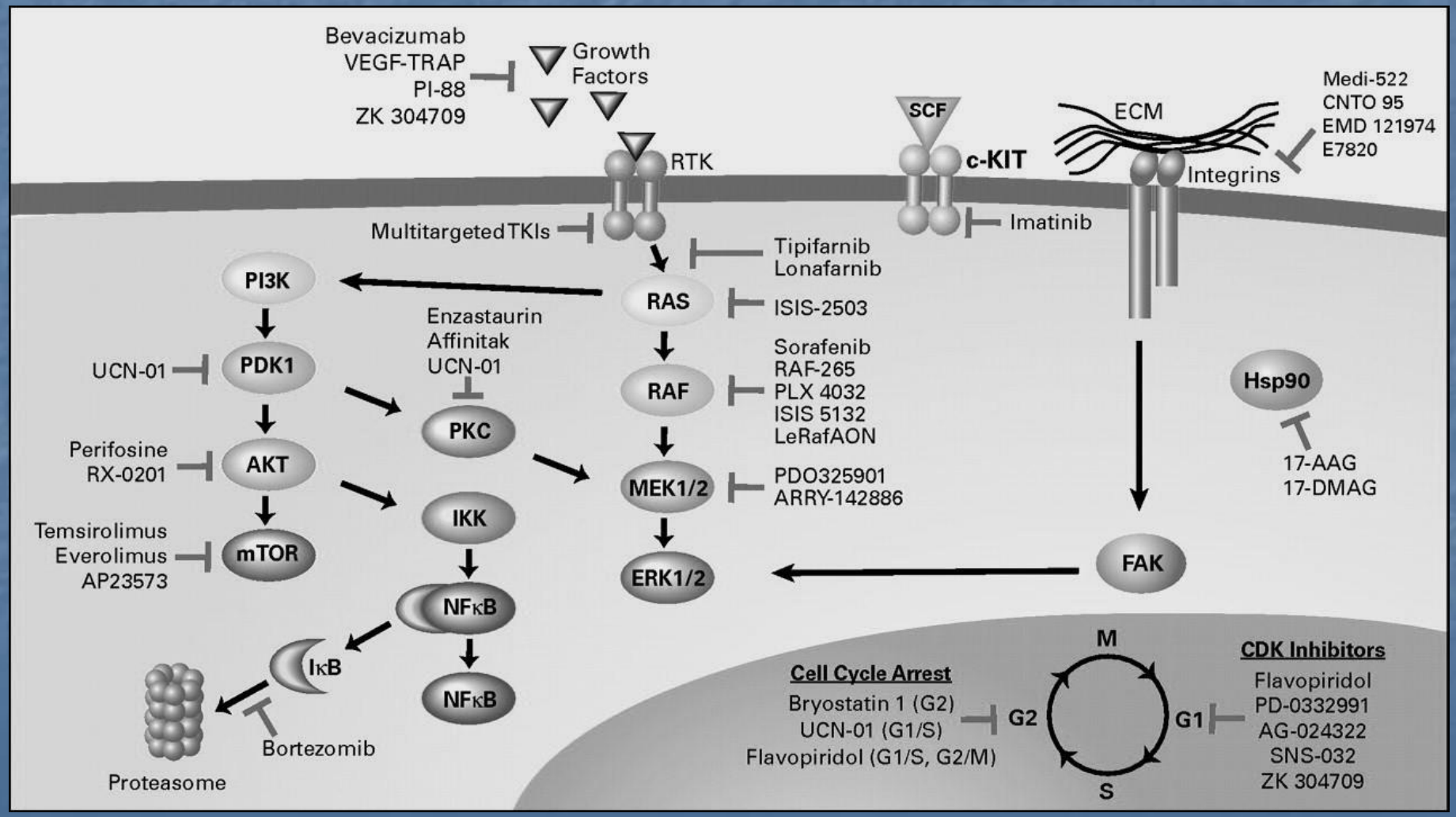

Y = Tyrosine P = Phosphate
BCR-ABL
ATP
Substrate
P
P
P
Y
P
Y
A
BCR-ABL
Imatinib
Substrate
Y
Y
B
Effector


BCR-ABL
ADP
P P
Substrate
P
Effector
ATP
P
P
P
Signaling
BCR-ABL
Imatinib
mesylate
Substrate
Effector
ATP
P
P
P
Signaling

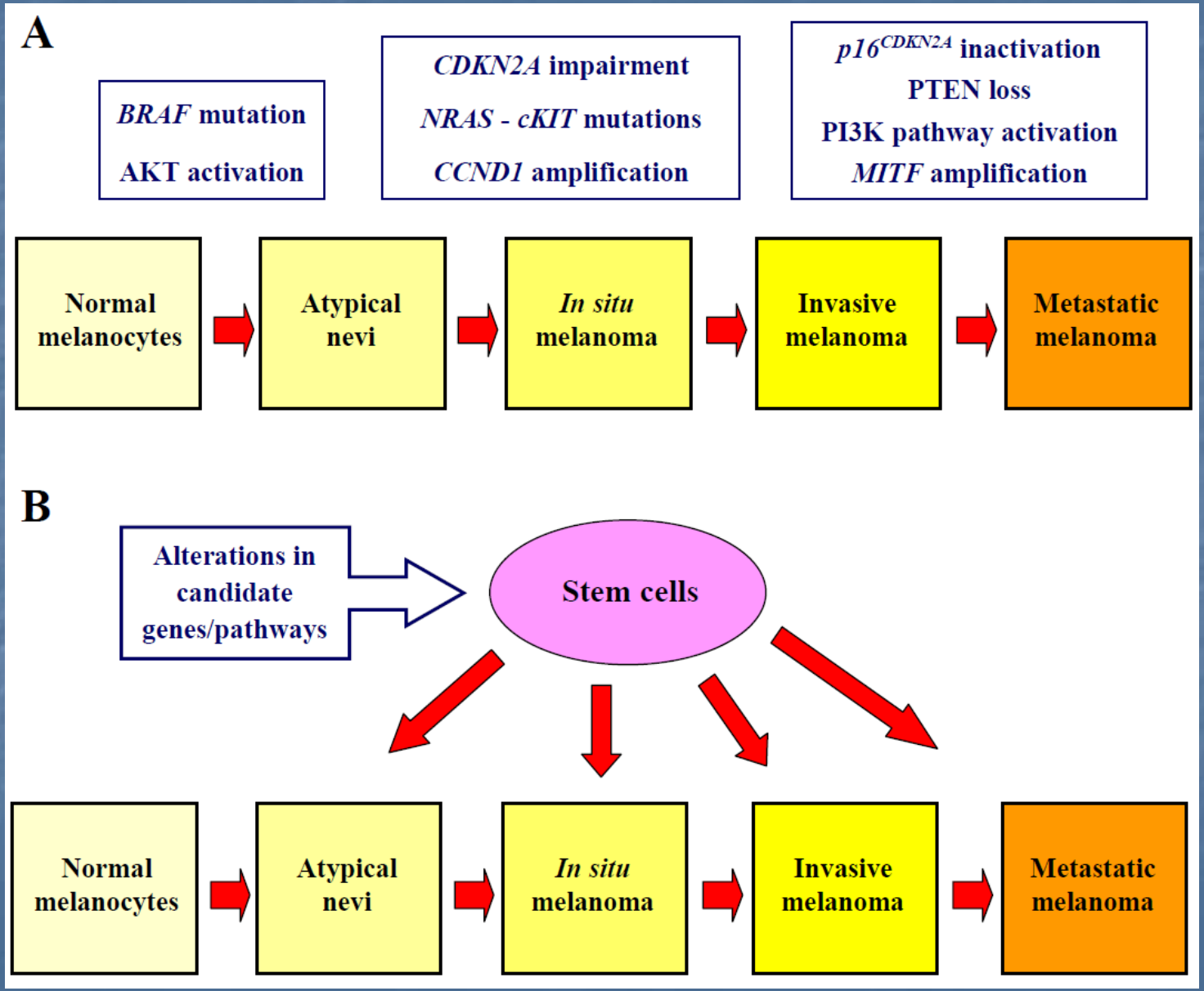
МЕЛАНОМА

МАРК (mitogen activated protein kinase) сигнальный каскадный путь



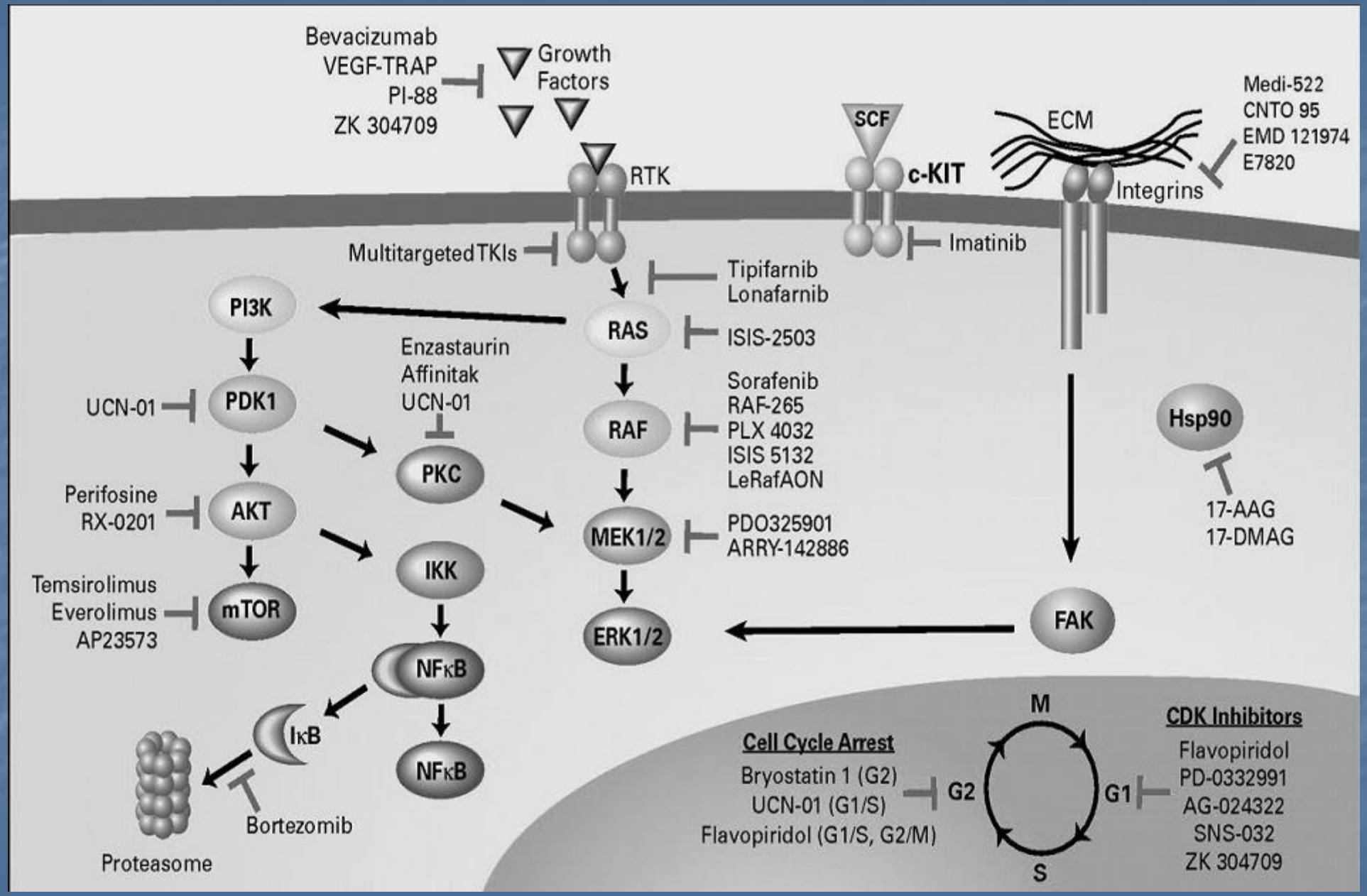

Bevacizumab
VEGF-TRAP
PI-88
ZK 304709
Growth Factors
RTK
SCF
c-KIT
ECM
Integrins
Medi-522
CNTO 95
EMD 121974
E7820
Imatinib
Multitargeted TKIs
Tipifarnib
Lonafarnib
PI3K
RAS
ISIS-2503
Enzastaurin
Affinitak
UCN-01
UCN-01
PDK1
Sorafenib
RAF-265
PLX 4032
ISIS 5132
LeRafAON
RAF
Hsp90
PKC
Perifosine
RX-0201
AKT
MEK1/2
PDO325901
ARRY-142886
17-AAG
17-DMAG
IKK
Temsirolimus
Everolimus
AP23573
mTOR
ERK1/2
FAK
NFκB
IκB
NFκB
Bortezomib
Proteasome
Cell Cycle Arrest
Bryostatin 1 (G2)
UCN-01 (G1/S)
Flavopiridol (G1/S, G2/M)
M
G2
G1
S
CDK Inhibitors
Flavopiridol
PD-0332991
AG-024322
SNS-032
ZK 304709

Меланома


A
BRAF mutation
AKT activation
CDKN2A impairment
NRAS - cKIT mutations
CCND1 amplification
p16CDKN2A inactivation
PTEN loss
PI3K pathway activation
MITF amplification
Normal melanocytes
Atypical nevi
In situ melanoma
Invasive melanoma
Metastatic melanoma
B
Alterations in candidate genes/pathways
Stem cells
Normal melanocytes
Atypical nevi
In situ melanoma
Invasive melanoma
Metastatic melanoma

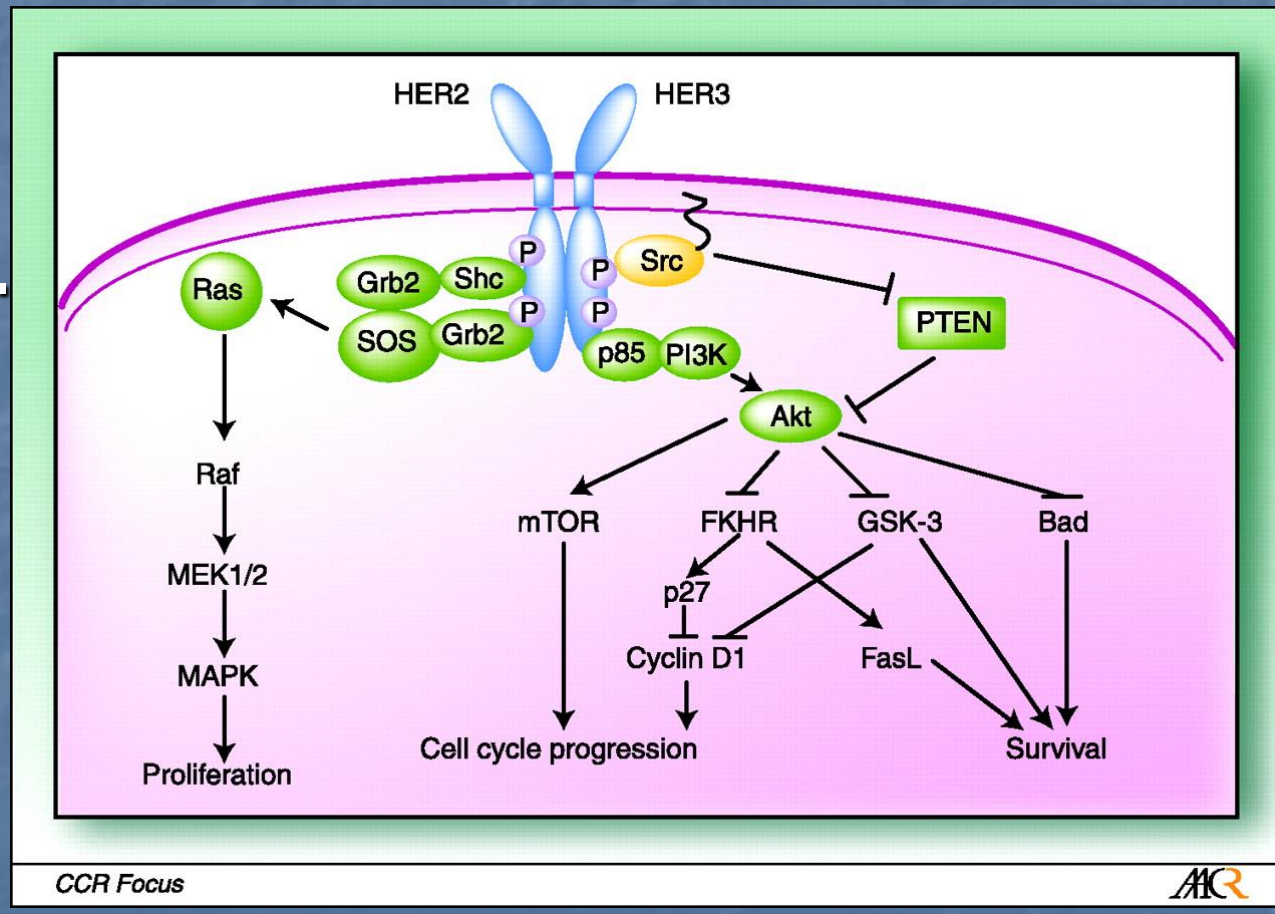
Диагностическая панель

Frequency	Type of melanoma	Genetic/molecular test
~5%	Uveal	*cKIT*^{mut} + *cKIT*^{ampl} + *GNAQ/GNA11*^{mut}
~5%	Mucosal	*cKIT*^{mut} + *cKIT*^{ampl} + *CCND1*^{ampl} + *CDK4*^{ampl} + *BRAF*^{mut}
~10%	Acral	*cKIT*^{mut} + *cKIT*^{ampl} + *CCND1*^{ampl} + *CDK4*^{ampl} + *BRAF*^{mut} + *NRAS*^{mut}
~15%	CSD	*CCND1*^{ampl} + *CDK4*^{ampl} + p53^{exp} + *cKIT*^{mut} + *cKIT*^{ampl} + *BRAF*^{mut} + *NRAS*^{mut}
~65%	Non-CSD	*BRAF*^{mut} + *NRAS*^{mut} + AKT3^{exp} + PTEN^{exp} + p16^{exp} + *CDK4*^{amp} + *MITF*^{amp}


Bevacizumab
VEGF-TRAP
PI-88
ZK 304709
Growth Factors
RTK
SCF
c-KIT
ECM
Integrins
Medi-522
CNTO 95
EMD 121974
E7820
Imatinib
Multitargeted TKIs
Tipifarnib
Lonafarnib
PI3K
RAS
ISIS-2503
Enzastaurin
Affinitak
UCN-01
UCN-01
PDK1
Sorafenib
RAF-265
PLX 4032
ISIS 5132
LeRafAON
RAF
Hsp90
17-AAG
17-DMAG
PKC
Perifosine
RX-0201
AKT
MEK1/2
PD0325901
ARRY-142886
IKK
Temsirolimus
Everolimus
AP23573
mTOR
ERK1/2
FAK
NFκB
IκB
NFκB
Bortezomib
Proteasome
Cell Cycle Arrest
Bryostatin 1 (G2)
UCN-01 (G1/S)
Flavopiridol (G1/S, G2/M)
M
G2
G1
S
CDK Inhibitors
Flavopiridol
PD-0332991
AG-024322
SNS-032
ZK 304709

HER2 (*Neu, ErbB-2, CD340*)

— мембранный белок, тирозиновая протеинкиназа семейства рецептора эпидермального фактора роста EGFR/ErbB, кодируемый геном человека ERBB2. Амплификация или повышенная экспрессия гена HER2 играет важную роль в патогенезе и прогрессировании определённых агрессивных типов рака молочной железы. Является важным биомаркёром и терапевтической мишенью этого заболевания.



HER2- СТАТУС РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Рак молочной железы является основной причиной онкологической смертности среди женщин в мире. Он составляет почти 11% от числа всех онкологических заболеваний и занимает первое место в мире по распространенности. К счастью, во многих развитых странах смертность от рака молочной железы значительно снизилась за последние 20 лет, что обусловлено как появлением новых лекарственных средств (химиотерапии и биологических веществ), так и улучшением скрининга и раннего выявления опухолей.

- В здоровой ткани HER2 передает сигналы, регулирующие пролиферацию и выживаемость клеток, но гиперэкспрессия HER2 может обусловить злокачественную трансформацию клеток.
- Связь гиперэкспрессии HER2 и канцерогенеза лучше изучена на модели рака молочной железы, однако HER2 также является важным маркером рака желудка и пищеводно-желудочного перехода (16% рака желудка или пищеводно-желудочного перехода являются HER2-позитивными, то есть в них регистрируется гиперэкспрессия белка (ИГХ 2+/FISH-положительный или ИГХ 3+))
- Определение HER2 статуса крайне важно, так как на основании результата исследования принимается решение о тактике лечения пациента. Если опухоль HER2-позитивная, пациенту показана таргетная анти-HER2 терапия (Герцептин). При HER2-негативных опухолях такая терапия не показана в связи с ее низкой эффективностью.

Методы определения HER2-статуса

- Золотым стандартом HER2-исследования является патологоанатомическое исследование, при котором имеется возможность использования двух методов — ИГХ и гибридизации in situ.
- Иммуногистохимия (ИГХ) представляет собой метод микроскопии в светлом поле и позволяет одновременно с определением HER2-статуса оценить морфологию ткани, также является относительно простым, быстрым и недорогим методом и используется в большинстве патологоанатомических лабораторий
  - Образцы, оцененные как ИГХ2+, должны быть повторно протестированы с помощью гибридизации in situ для получения точного результата.
- Гибридизация in situ (FISH) — метод микроскопии в темном поле, в котором используются ДНК зонды, связанные с флуоресцентной меткой для количественного определения уровня амплификации гена HER2.
  - При этом зонд HER2 связывается с локусом гена HER2 на 17 хромосоме, а зонд CEP17 связывается с центромерным участком 17 хромосомы. Результат оценивается как соотношение числа копий гена HER2 к числу копий 17 хромосомы. FISH-положительным считается образец, в котором соотношение HER2:CEP17 больше или равно 2,0.
  - Гибридизация in situ часто используется для подтверждения неопределенных результатов ИГХ, но также может быть использована как начальный метод определения HER2 статуса опухоли молочной железы. Пациентки, чьи образцы оценены как положительные при гибридизации in situ при первичном ISH тестировании, направляются на анти-HER2-терапию. Когда ИГХ используется в качестве исходной методологии тестирования, гибридизация in situ должна выполняться при всех ИГХ 2 + результатах для подтверждения HER2 статуса и определения количественной оценки амплификации гена HER2.
  - Метод FISH менее чувствителен к вариациям предварительной обработки на преаналитическом этапе и этапе сбора материала; его интерпретация более объективная и количественная, чем при ИГХ. Метод FISH позволяет определить HER2- положительные случаи внутри неопределенной категории (ИГХ 2+). Однако иногда явление полисомии обуславливает появление ложно-отрицательных результатов гибридизации in situ при ИГХ 3+.
- Таргетная терапия наиболее эффективна у пациенток с гиперэкспрессией HER2 (ИГХ 3 + или ИГХ 2 + / ISH-положительные). Считается, что пациентки, образцы которых были оценены как ИГХ 3 + имеют положительный HER2 статус, а ИГХ 0/1 + имеют отрицательный. ИГХ 2 + образцы считаются неопределенными и должны быть повторно протестированы с помощью гибридизации in situ. Образцы ИГХ 2 + / ISH-положительные, классифицируются как HER2-позитивные.
- При наличии сомнений относительно результата, оцененного как ИГХ 3+ проводят повторное определение HER2 статуса с использованием другого метода.

Молекулярная диагностика онкозаболеваний

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В КЛЕТКАХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Ген	Кодируемый белок и его функция	Характер генетических нарушений	Частота нарушений
ERBB1	тирозинкиназный рецептор EGF	гиперэкспрессия	> 50%
ERBB2 (HER2/neu)	p185 - тирозинкиназный рецептор	гиперэкспрессия амплификация	25-30%
Семейство генов RAS	p21RAS - переносчик внутриклеточного сигнала	мутации	20-30%
c-MYC	c-myc - фактор транскрипции, регулирует клеточный цикл и активность теломеразы	гиперэкспрессия амплификация	50%
PRAD1	циклин Д1 - в комплексе с циклин-зависимой киназой 4 стимулирует переход клетки из состояния GO в фазу G1 клеточного деления	Гиперэкспрессия амплификация	25-47%

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В КЛЕТКАХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Ген	Кодируемый белок и его функция	Характер генетических нарушений	Частота нарушений
RB	pRb - контролирует вход в S-фазу, регулируя активность фактора транскрипции E2F	мутации отсутствие синтеза pRb	3% 20-30%
CDKN2	p16INK4 - ингибитор комплекса циклин Д1 и циклинзависимой киназы 4, предотвращает начало клеточной пролиферации	мутации делеции	10% 20%
p53	p53 -фактор транскрипции; регулирует клеточный цикл и апоптоз, контролирует целостность генома	мутации	50%

Онкомаркеры

- Канцерогенез является комплексным и многостадийным процессом, при котором структурно и функционально нарушается работа многих генов и путей регуляции.

- Для наиболее точной молекулярной диагностики типов опухоли требуется анализ системы маркеров.

Молекулярная диагностика онкозаболеваний

Современные методы молекулярной биологии позволяют эффективно проводить комплексный анализ определенного типа опухоли и ДНК-диагностику для конкретного пациента

Таблица комбинации опухолевых маркеров

Заболевание	Главный	Второстепенный
Рак желудка	РЭА, СА 242	
Рак прямой и сигмовидной кишки	РЭА, СА19-9, СА 242	
Рак поджелудочной железы	СА 19-9, СА 242	РЭА,СА-125
Рак желчного пузыря и желчных путей	СА 19-9	АФП
Мелкоклеточный рак легкого	НСЕ	
Рак легких	РЭА	
Рак молочной железы	СА 15-3	РЭА
Рак яичника	СА 125	
Рак тела матки	СА 125	
Рак простаты	ПСА, свПСА	
Рак мочевого пузыря	РЭА	
Нейробластома	НСЕ	
Злокачественная меланома	НСЕ	
Карциноид	НСЕ	

Главный маркер – маркер с высокой чувствительностью и специфичностью к определенному виду опухоли.

Второстипенный маркер – его определение проводится, как правило, паралельно с определением главного маркера. Он имеет более низкую чувствительность и специфичность для данной опухоли, в комбинации с главным маркером повышает вероятность выявления опухоли.

Онкомаркеры

(системы молекулярных маркеров в ДНК-диагностике онкозаболеваний)

Молекулярно-биологические технологии позволяют не только выявлять наиболее характерные маркеры для определенных типов опухолей, но и решать другие задачи практической молекулярной диагностики онкозаболеваний.

В связи с этим в молекулярно-генетической диагностике в онкологии можно условно выделить 4 основных направлений:

1. **Диагностика наследственных форм рака**
2. **Молекулярные маркеры, определяющие неблагоприятный прогноз заболевания**
3. **Молекулярные маркеры микрометастазов**
4. **Маркеры, позволяющие определить заболевание на ранних стадиях опухолеобразования**

Онкомаркеры
Диагностика наследственных форм рака

Определена взаимосвязь между мутацией конкретного гена и предрасположенностью к возникновению определенного типа опухоли (ретинобластома, нефробластома, феохромоцитома, гиперплпзия паращитовидных желез, ганглионейромы слизистой губ, щек, языка).

Генотипирование позволяет изменить тактику медико-генетического консультирования:

1. Нет необходимости рассчитывать риски возникновения опухоли у потомства.
2. Определение мутации конкретного гена в семье позволяет эффективно проводить пренатальную диагностику на ранних стадиях беременности.

Онкомаркеры
Диагностика наследственных форм рака

В случае отсутствия мутации риск заболевания у ребенка общепопуляционный, в случае наследования мутации существует возможность проведения профилактических мероприятий на различных этапах жизни в зависимости от характера заболевания (прерывание беременности, профилактическая хирургия, терапия, диспансерное наблюдение пациента)

Онкомаркеры
(молекулярные маркеры, определяющие неблагоприятный прогноз заболевания)

Под неблагоприятным прогнозом развития заболевания подразумевают злокачественность опухоли, ее инвазивность, метастатический потенциал, низкий процент выживаемости.

- **К настоящему времени накоплены сведения о молекулярно-генетической структуре определенных опухолей, установлены постоянно-выявляемые и характерные для каждой нозологической формы молекулярно-генетические маркеры.**

- **Вместе с тем продолжается поиск и уже найден ряд маркеров для определенных видов новоообразований определяющих прогноз заболевания (РМЖ, рак предстательной железы, немелкоклеточный РЛ, опухоли поджелудочной железы, колоректальные опухоли)**

Онкомаркеры
(молекулярные маркеры, определяющие неблагоприятный прогноз заболевания)

Немелкоклеточный РЛ	Колоректальные опухоли
Гиперэкспрессия генов циклинзависимых киназ Cdc25A и Cdc25B	Повышенная экспрессия генов катепсина B, p53, тимидилсинтетазы
Снижение экспрессии ингибитора клеточного цикла p27	Экспрессия генов витамина D
	Отсутствие экспрессии p21

Практическая значимость: ранняя идентификация маркеров неблагоприятного прогноза позволяет принять решение о проведении более агрессивной терапии с момента первичной диагностики.

Онкомаркеры
(молекулярные маркеры микрометастазов)

- **Единичные метастатические клетки достаточно сложно определить цитологическими, биохимическими и иммунологическими методами.**
- **Молекулярные методы (ПЦР с праймерами на обратно транскрибируемую мРНК, выделенную из анализируемого образца) позволяют определить экспрессию опухольспецифических генов, характерных для метастатической клетки и идентифицировать ее среди множества неизменных клеток**
- **(**Эффективность почти 100%

  Чувствительность 1 клетка на 4 млн -10 млн лимфоцитов периферической крови**.**

- **Меланома – меланомаассоциированный антиген**
- **РМЖ - цитокератин-19 (СК19)**

Практическая значимость: диагностика микрометастазов в крови, лимфатических узлах и костном мозге (особенно в случае высокоинвазивных опухолей) позволяет контролировать эффективность лечения и необходима в период ремиссии.

Онкомаркеры
(маркеры, позволяющие определить заболевание на ранних стадиях опухолеобразования)

Ранние события в геноме трансформированной клетки

- Появление аномального метилирования

(метилирование гена p16 свидетельствует о возникновении РЛ, мочевого пузыря, колоректальных раках за 3-5 лет до появления клинических проявлений)

- Мутации генов

(мутации генов p53, K-ras с высокой вероятностью свидетельствуют о наличии злокачественного процесса)

Практическая значимость: Мониторинг молекулярных маркеров, которые обнаруживаются задолго до появления клинических признаков позволяет вовремя начать более тщательную диагностику и превентивную терапию.