



Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

*к.м.н., доц. Михайленко Д.С.
отдел патологической анатомии с группой
молекулярной генетики*

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Актуальность проблемы совершенствования лабораторной диагностики РМП

Ежегодно в мире регистрируют более 330 тыс. случаев рака мочевого пузыря (РМП), представляющего собой актуальную проблему в современной онкологии. Около 90% случаев РМП представлены уротелиальной карциномой; у 80% пациентов наблюдаются поверхностные и у 20% - мышечно-инвазивные опухоли.

Основной метод неинвазивной лабораторной диагностики – цитологический анализ мочи. Его чувствительность, в среднем, составляет 40-50% и падает до 25% при высокодифференцированных и небольших по размеру опухолях. Пока не получили широкого распространения более чувствительные маркеры NMP22 и UBCII, которые анализируют в моче, тест UroVysion (FISH). По-прежнему остается актуальным совершенствование лабораторной диагностики РМП, снижение количества ненужных цистоскопий при диагностике и обнаружении рецидива РМП.

Опухолевые клетки при РМП слущиваются в мочевыводящие пути, присутствуют в осадке мочи, и в них могут быть выявлены мутации и другие генетические изменения, характерные для опухоли. В первую очередь, интерес представляют те генетические изменения, на основе которых можно диагностировать РМП (в том числе, рецидивы заболевания) и выделять прогностические группы среди пациентов.

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Генетическая гетерогенность первичных опухолей: теория «полей канцеризации»

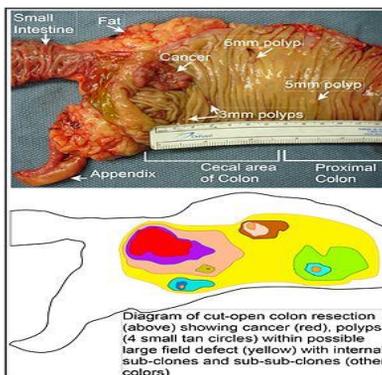
Поле канцеризации – участок эпителия, клетки которого накопили большее по сравнению с соседними участками количество мутаций в генах, вовлеченных в канцерогенез.

Именно в этом участке эпителия появление опухолевых клонов наиболее вероятно.

на примере колоректального рака

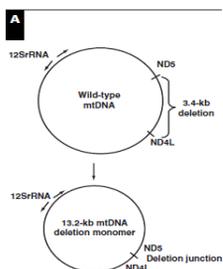
Frequency of finding epigenetic reductions in protein expression of DNA repair genes in sporadic cancers and in adjacent field defects

Cancer	Gene	Frequency in Cancer	Frequency in Field Defect	Ref.
Colorectal	MGMT	46%	34%	[18]
Colorectal	MGMT	47%	11%	[19]
Colorectal	MGMT	70%	60%	[20]
Colorectal	MSH2	13%	5%	[19]
Colorectal	ERCC1	100%	40%	[21]
Colorectal	PMS2	88%	50%	[21]
Colorectal	XPF	55%	40%	[21]
Head and Neck	MGMT	54%	38%	[22]
Head and Neck	MLH1	33%	25%	[23]
Head and Neck	MLH1	31%	20%	[24]
Stomach	MGMT	88%	78%	[25]
Stomach	MLH1	73%	20%	[26]
Esophagus	MLH1	77%-100%	23%-79%	[27]



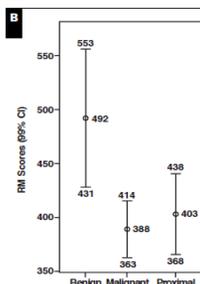
I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Имеют ли генетические изменения в предопухолевых состояниях практическую ценность?

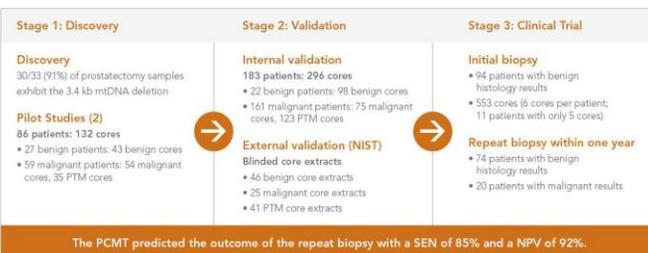


Диагностика рака предстательной железы осуществляется методом 12-игольной биопсии. Вследствие морфологической гетерогенности и мультифокальности опухоли небольшие аденокарциномы могут не попасть в биоптаты. В то же время, делецию 3,4 т.п.н. в мтДНК несут 70% аденокарцином и прилегающий к ним эпителий «поля канцеризации». Эту делецию выявляют методом ПЦР в реальном времени. Результат анализа учитывают при решении о повторной биопсии для исключения ложноотрицательных результатов.

Robinson K. et al. Accurate prediction of repeat prostate biopsy outcomes by a mitochondrial DNA deletion assay // Prostate Cancer Prostatic Dis. – 2010; 13(2): 126-131; etc.



PROSTATE CORE MITOMIC TEST™



I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Молекулярный патогенез первичного поверхностного РМП

Нормальный уротелий

Гиперплазия

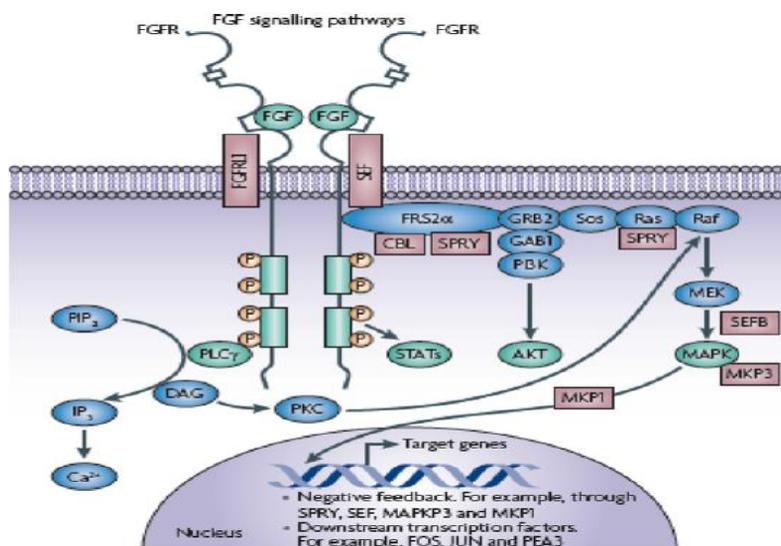
- делеции 9q-
- мутации *FGFR3*, *TERT*
- ген *TP53* «дикого типа»

Поверхностный РМП

- мутации *FGFR3* (50-80%)
- мутации *TERT* (60-70%)
- мутации *PIK3CA* (15-20%)
- мутации *HRAS* (9-12%), *ERBB2* (8%), *STAG2*, химера *FGFR3:TACC3*
- ген *TP53* «дикого типа»

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Сигнальный путь FGFR3



Pandith A.A. et al. Oncogenic role of fibroblast growth factor receptor 3 in tumorigenesis of urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 2013; 31: 398-406.

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Молекулярный патогенез мышечно-инвазивного РМП

Нормальный уротелий

Дисплазия / CIS

- мутации *TP53*, *TERT*
- амплификация *E2F3*
- aberrации хромосомы 9
- ген *FGFR3* и семейство *RAS* «дикого типа»

Мышечно-инвазивный РМП

- мутации *TP53* (50-60%), *TERT*
- мутации в генах сегрегации хроматид (*STAG1/2*, *ESPL1*, *SMC1-3*)
- мутации в генах ремоделинга хроматина (*UTX*, *KDM6A*, *MLL2*, *ARID1A*, *CREBBP*, *EP300*, *NCOR1*, *CHD6* – от 5 до 30% каждый)
- хромотрипсис: делеции *TP53*, *PTEN*, *FHIT*, амплификация *GRIN2A*, делеции хромосомы 9 (генов *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PTCH1*, *TSC1*, *BRINP1*), другие aberrации (2q-, 3p-, 5q-, 8p-, 10p+, 13q-, 17p-)
- ген *FGFR3* «дикого типа»

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Прогрессия и метастазирование РМП

Рецидив поверхностного РМП и переход в инвазивный рак

- при сохранении мутаций *FGFR3* появляются мутации в генах семейства *RAS*
- делеции / мутации *TP53*, *RB1*
- aberrации 3p-, 11p-, 13q-, 17p

Мышечно-инвазивный РМП

Прогрессия и метастазирование первичной опухоли

- клональная эволюция и отбор в пользу комплексных мутаций *TP53*, *RB1*, амплификации *MDM2*
- биаллельные делеции 9p-, амплификации 1q, 12p

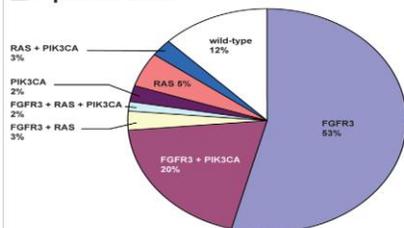
I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Мутации-драйверы в канцерогенезе РМП



Частые точковые мутации в онкогенах при РМП

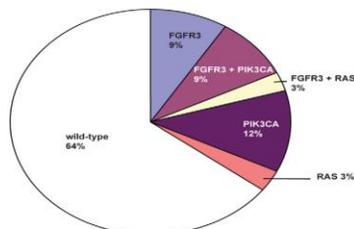
B pTa/T1 G1/2



Ген *FGFR3* локализован в области 4p16, содержит 19 экзонов.

«Горячие точки» мутагенеза находятся в 7 и 10 экзонах. Точковые активирующие мутации в нем описаны с частотой до 50% в опухолях из уротелия.

D ≥ pT2

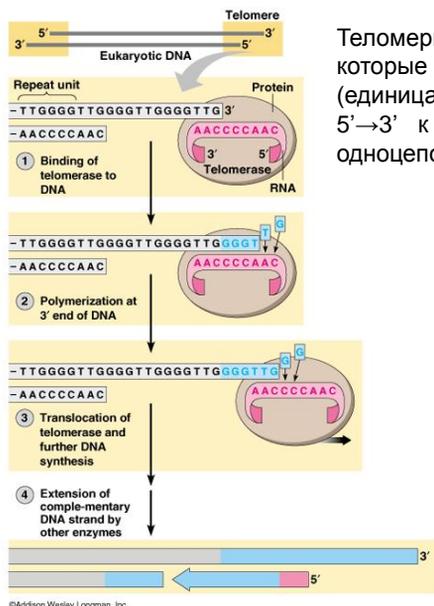


Мутации *FGFR3* ассоциированы с высокодифференцированным и опухолями РМП и ранними стадиями заболевания.

Kompier L.C. et al. *FGFR3*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* and *PIK3CA* mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. PLoS One. 2010; 5(11): e13821.

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Структура и функции теломеразы при РМП



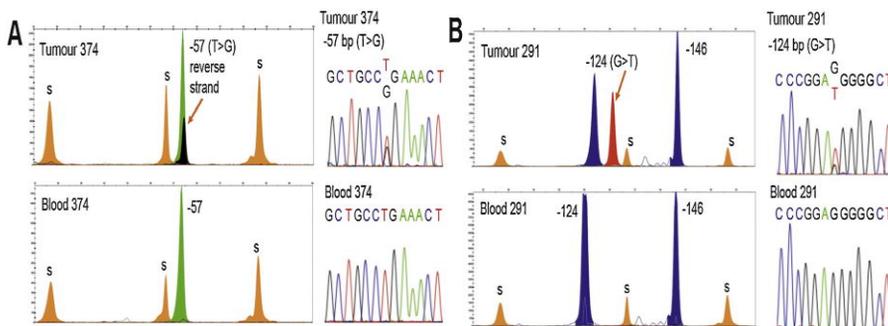
Теломеры – участки на концах хромосом, которые состоят из тандемного повтора (единица повтора – ТТАGGG) в ориентации 5'→3' к концу хромосомы и заканчиваются одноцепочным участком длиной от 50-400 н.

В ходе клеточного деления возникает проблема недорепликации 5'-концов геномной ДНК. Она решается достройкой концов теломер с помощью рибонуклеопroteина – фермента теломеразы. Теломераза в норме активна только в клетках зародышевой линии (половых клетках – предшественников яйцеклеток и сперматозоидов). Теломераза также активируется в злокачественных опухолях, представляя собой один из важных механизмов иммортализации.

1 ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Возможное расширение анализа мутаций *FGFR3*: мутации *PIK3CA* и *TERT*

Анализ мутаций *FGFR3* может быть дополнен активирующими миссенс-мутациями в 9 и 20 экзонах гена *PIK3CA* и мутациями в промоторе *TERT*. Мутации в «горячих точках» промотора *TERT* выявляют 60% случаев рака мочевого пузыря. Это транзиции в позициях 1295228 (C228T) и 1295250 (C250T), которые создают новые сайты связывания транскрипционных факторов ETS/ELK. Не ассоциированы со стадией заболевания. Основной метод тестирования в осадке мочи – SNaPshot.

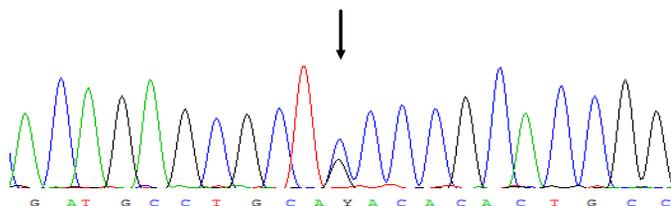


Hurst C.D., Platt F.M., Knowles M.A. Comprehensive mutation analysis of the *TERT* promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine // Eur Urol. – 2013., 5287.

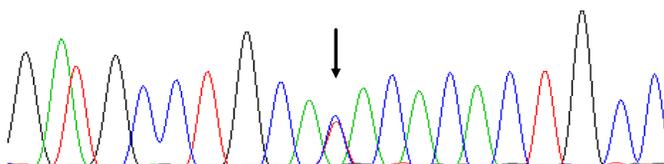
1 ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Примеры секвенирования мутаций в осадке мочи при РМП

A C A G A G C G C T S C C C G C A C C G G



Мутация
с.746C→G
(p.S249C)



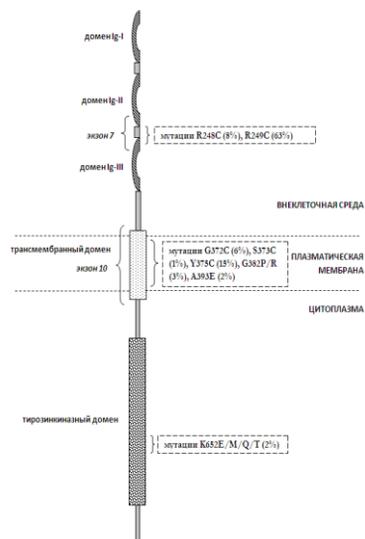
Мутация
с.1124A→G
(p.Y375C)

В 32% случаев РМП выявлены миссенс-мутации.

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Локализация и аннотация мутаций в осадке мочи при РМП

Активирующие мутации в *FGFR3*



Мутации гена *FGFR3* в исследованной выборке

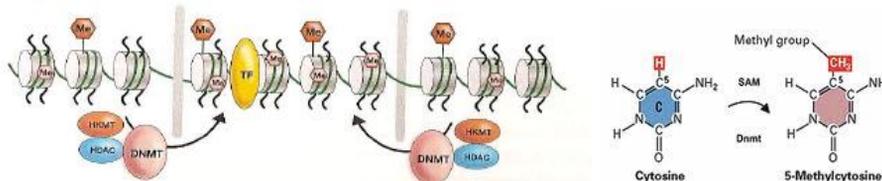
Кодирующая ДНК	Рецептор	rs, HGMD
с.746C→G	р.S249C	CM950470 rs121913483
с.753C→G	р.H251G	rs377554120
с.1124A→G	р.Y375C	CM960657 rs121913485
с.1144G→C	р.G382R	CM940785 rs28931614
с.1156T→C (2 случая)	р.F386L	HM040060 rs17881656

Обнаруженные однонуклеотидные замены представляли собой патогенные миссенс-мутации *FGFR3*

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Метилирование ДНК в канцерогенезе

Метилирование цитозина в составе CpG-динуклеотидов – один из основных механизмов инактивации генов-супрессоров в процессе канцерогенеза при всех типах опухолей



Основной рутинный метод определения aberrантно метилированных генов в осадке мочи – метилспецифическая ПЦР в реальном времени

Выделение ДНК из осадка мочи

Бисульфитная конверсия

Метилспецифическая ПЦР-РВ с положительным контролем (известный метилированный образец или обработанная метилазой ДНК, и контролем на полноту конверсии, например, *MYOD1*)

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Гиперметилированные последовательности как маркеры РМП

Проблемы:

- метилирование отдельного гена-супрессора, за редкими исключениями, не является специфичным для определенного типа опухоли
- в зависимости от используемого метода и участка анализируемого CpG-островка разные исследователи получают разные частоты метилирования гена-супрессора в одном и том же типе опухоли

Выводы: в диагностических целях (особенно при анализе ДНК из осадка мочи)

- необходим консенсус по дизайну праймеров/зондов
- валидированная на независимых выборках методика
- исследовать не один, а несколько генов-супрессоров с высокой частотой метилирования при РМП

Ген	Частота метилирования при раке мочевого пузыря, %
<i>RASSF1</i>	35-70
<i>RARB2</i>	25-68
<i>CDKN2A</i>	73
<i>CDH1</i>	63-87
<i>APC</i>	30-69
<i>TWIST1+NID2</i>	78 (в моче)

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Соматические мутации при РМП с прогностическим значением

Ген	Изменение	Интерпретация
<i>TP53</i> , <i>RB1</i>	Инактивирующие мутации, протяженные делеции, в т.ч. биаллельные	Неблагоприятный прогноз, высокий риск метастазирования.
<i>ERBB2</i>	Амплификация и гиперэкспрессия гена (или активирующие миссенс-мутации в киназном домене при микропапиллярной уротелиальной карциноме)	Применение таргетных препаратов, направленных против HER2 (трастузумаб, пертузумаб, лапатиниб).
<i>PIK3CA</i>	Активирующие миссенс-мутации E542K и E545K	Возможность использования ингибиторов PIK (МК-2206).
<i>FGFR3</i>	Активирующие миссенс-мутации в 7 и 10 экзонах	Применение ингибиторов рецепторов FGFR: пазопаниб, патопаниб, антител к нормальному и мутантному рецептору PRO-001, R3Mab, малых синтетических ингибиторов TKI258 (или довитиниб, «Новартис»), AZD4547 («Астра-Зенека»), PD173074 («Пфайзер»), BMC-582664 (или бриватиниб, «Бристоль Майерс») и др.
	Вторичная миссенс-мутация V555M	Резистентность к AZ12908010 и, возможно, к другим малым синтетическим ингибиторам
<i>TERT</i>	Активирующие мутации в промоторе: 124G→A, -146G→A	Применение ингибиторов теломеразы (BIBR1532, теломестатин).

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.

Резюме

1. Результаты молекулярно-генетических исследований РМП в последние годы, в т.ч. с применением NGS, позволили установить два основных патогенетических пути, которые приводят к развитию инвазивных и неинвазивных первичных опухолей из уротелия. Также были охарактеризованы наиболее частые мутации-драйверы – потенциальные мишени для разработки диагностических тест-систем.
2. В нашей работе в 32% случаев РМП выявлены активирующие миссенс-мутации в гене *FGFR3* в осадках мочи. В настоящее время идет исследование экзонов 9 и 20 *PIK3CA*, промотора *TERT*. Анализ соматических мутаций в осадке мочи в дальнейшем может быть использован как дополнительный тест при неинвазивной диагностике РМП, возможно, в комбинации с aberrантно метилированными локусами.
3. Вторичные мутации *FGFR3*, мутации/делеции *TP53* и *RB1*, последствия хромотрипсиса и другие нарушения, возникающие в ходе клональной эволюции опухоли при РМП, характеризуют риск метастазирования и чувствительность к таргетным препаратам.

I ежегодный конгресс ассоциации онкопатологов, г. Москва, 22 – 23 апреля 2016 г.