



Молекулярно-генетические исследования при раке почки

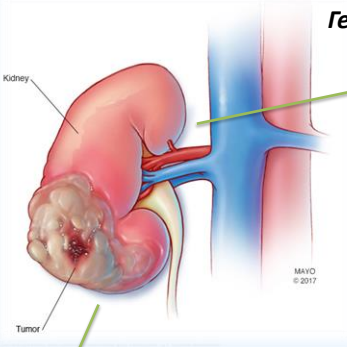
Татьяна Жинжило
ФГАУ «ЛРЦ» Минздрава России

Научно-практическая конференция "Онкоурология", Москва
29-30 сентября 2017 года

Диагностика и прогноз при раке почки (РП)

- **Диагноз** устанавливается на основании данных **инструментальных** (УЗИ/КТ-исследование органов брюшной полости и грудной клетки/радиоизотопное исследование костей скелета) и **патоморфологических методов исследования**
- Неспецифические клинические симптомы и низкая чувствительность инструментальных методов не позволяют идентифицировать РП на ранних стадиях
- Лечение метастатических форм ПЧК осложнено неэффективностью стандартной химиотерапии и иммунотерапии интерлейкином-2
- **Молекулярно-генетические маркеры** при РП обнаруживаются как в опухолевой ткани, так и в биологических жидкостях
- Дифференциальная диагностика, мониторинг опухолевого роста, прогноз и вероятность метастазирования при РП

Генетика рака почки



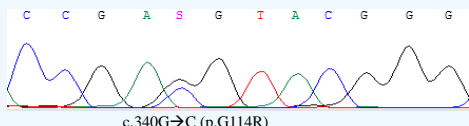
Наследственный (2-3% случаев РП)

- Новообразование почки +:
 - Билатеральное/мультифокальное
 - Ранний возраст манифестации (<45 лет)
 - Родственник с РП (1й/2й степени родства)
 - Случаи пневмоторакса
 - Изменения кожных покровов (лейиомы/фиброфолликуломы)
 - Сопутствующие опухоли: феохромоцитомы/парагангиома/гемангиобластома сетчатки, мозжечка/фибромы матки (<=30)
 - Лимфогангиолиматозис
 - Эпилепсия детского возраста (либо родственник 1й степени родства)
- Несветлоклеточная карцинома с нетипичными включениями
- Родственник с подтвержденным наследственным онкологическим синдромом (РП-часть клин.картины)

Спорадический

- Опухоли почечной лоханки и мочеточника (5%)
- Почечно-клеточные карциномы (95%):
 - Светлоклеточная (75%) (СКК)
 - Папиллярная (15%)
 - Хромобластная (5%)
 - Редкие формы и неклассифицируемые варианты (5%)

ДНК-диагностика наследственных форм РП заключается в секвенировании специфичного для синдрома гена по Сэнгеру



c.340G→C (p.G114R)

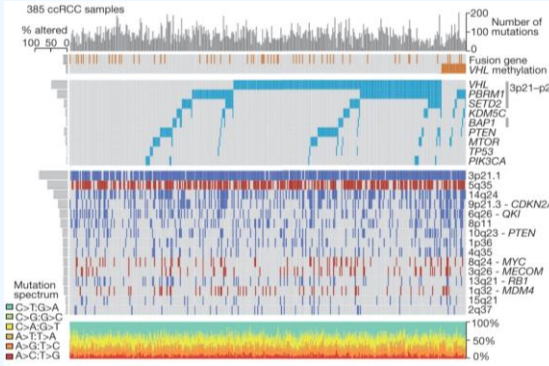
Мутации в ключевых генах **VHL, BPRM1, BAP1, SETD2, RASFF1, FHIT**

- Диф.диагностика по STR-маркерам (исследование аллельного дисбаланса)
- Мутации **VHL** – диф.диагностика наследственного и спорадического СКР

Полногеномное секвенирование при раке почки

Гены с высокой частотой мутаций при соматическом РП.

Ген	% мутаций	№	Исследование NGS
VHL	52.3	417	TCGA
	39.6	107	Sato et al.
	51.5	342	Daiglish et al.
	27.6	98	Guo et al.
	53.7	67	Arai et al.
BPRM1	32.9	417	TCGA
	26.4	107	Sato et al.
	20.4	98	Guo et al.
	32.8	67	Arai et al.
	39.8	94	Scelo et al.
SETD2	11.5	417	TCGA
	4.4	342	Daiglish et al.
	4.1	98	Guo et al.
	9	67	Arai et al.
	29.8	94	Scelo et al.
BAP1	10.1	417	TCGA
	7.5	107	Sato et al.
	8.2	98	Guo et al.
	6	67	Arai et al.
	19.2	94	Scelo et al.



CI Creighton et al. Nature 499, 1-7 (2013) doi:10.1038/nature12222

- инактивация гена **VHL** – ключевое событие канцерогенеза
- BPRM1** – высокая чувствительность к анти-VEGF препаратам
- BAP1** – в обратной корреляции с мутациями в **BPRM1**, специфичные строго для СКК
- SETD2** – нарушение репарации ДНК, сплайсинга, геномная нестабильность

Анализ гетерогенности синхронных опухолей, генетическая характеристика подтипов СКК и идентификация **новых молекулярных мишеней для таргетной терапии**

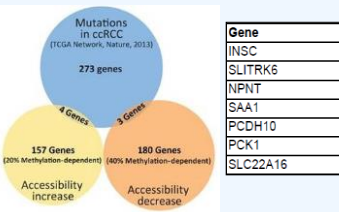
Экспрессионный профиль светлоклеточных карцином почек

Ген	Локус	Функциональная роль	Клиническая значимость
AQP9	15q	Трансмембранный белок водных каналов, экспонирован на эритроцитах и эпителии почечных канальцев	Резистентность к химиотерапии
CXCL1	4q21	Хемоаттрактант нейтрофилов	Ассоциирован с метастазированием
GATA3	10p15	Фактор эмбрионального миелоэритропоэза	Снижение экспрессии при опухолевой трансформации
TFAP2B	6p12	Фактор эмбриогенеза	Снижение экспрессии при опухолевой трансформации
VIM	10p13	Маркер мезенхимальных клеток	Специфичен для СКК, коррелирует со стадией и прогнозом
CA9	9p13.3	Фермент гидратации CO ₂	Специфичный маркер СКК
MCAM	11q23.3	Молекула клеточной адгезии, специфичная для эндотелия	Ассоциирован с метастазированием
VEGFR1	13q12	Рецептор фактора роста эндотелия сосудов	Специфичен для СКК, предиктивный маркер эффективности терапии
VEGFR2	4q11-q12	Медиатор VEGF-индуцированной пролиферации и роста эндотелия сосудов	Ассоциирован с ответом на терапию антиангиогенными препаратами
FN1	2q34	Клеточная адгезия и миграция, участвует в PI3K-AKT сигнальном пути	Ассоциирован с агрессивным опухолевым ростом

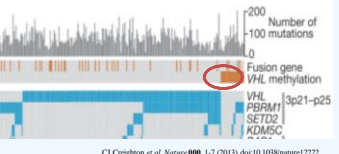
- при помощи анализа на экспрессионных микроочапах охарактеризованы группы генов, дифференциально экспрессирующиеся при РП
- среди часто упоминаемых – гены, вовлеченные в процессы ЭМТ, ангиогенеза и кодирующие молекулы клеточной адгезии

Метилирование при раке почки

Генетические и эпигенетические события при СКК – независимые процессы

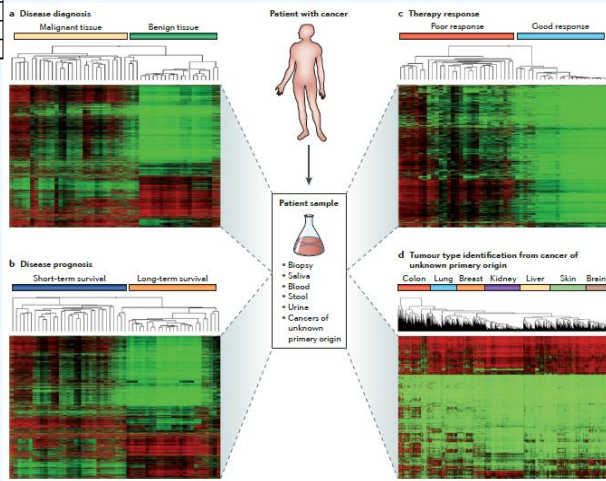


Gene
INSC
SLITRK6
NPNT
SAA1
PCDH10
PCK1
SLC22A16



Аберрантно метилированные гены при РП:

1. FHIT (до 60% РП)
2. RASSF1 (папиллярные карциномы, реже СКК)
3. VHL (специфично для СКК)
4. UQCRH
5. SFRP1
6. KILLIN

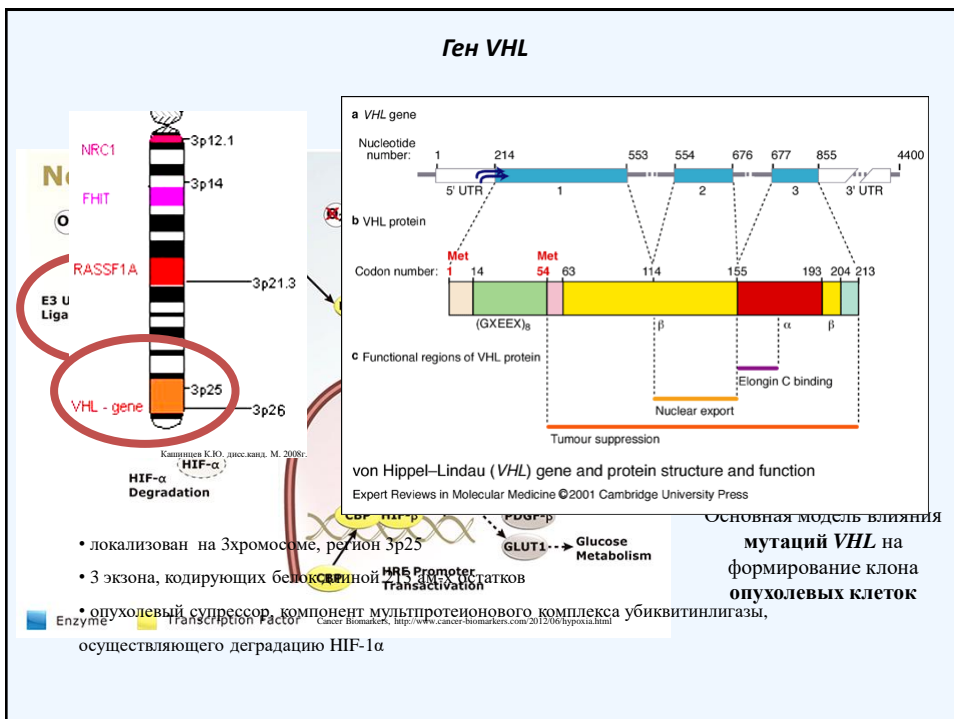


«эпигенетический» скрининг – перспективное направление персонализированной медицины

Nat Rev Genet. 2012 Oct;13(10):679-92.

Наследственный РП Основные формы			
Синдром	Ген локус функция	Патоморфологический тип	Не почечные клинические особенности синдрома
фон Хиппеля – Линдау (VHL)	<i>VHL</i> 3p25 опухолевый супрессор	светлоклеточный	Гемангиобластома ЦНС и сетчатки глаза, феохромоцитомы, кисты и нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы
Наследственный лейомиоматоз и почечно- клеточный рак почки (HLRCC)	<i>FH</i> 1q42.1 опухолевый супрессор	папиллярный тип 2	Лейомиоматоз кожи и матки
Синдром Берт-Хогг- Дьюба (BHD)	<i>FLCN</i> 17p11.2 опухолевый супрессор	хромофобный, папиллярный, онкоцитомы	Гамартомы волосяных фолликулов кожи, кисты легких, спонтанный пневмоторакс
Наследственный папиллярный рак почки (HPRC)	<i>MET</i> 7q34 протоонкоген	папиллярный тип 1	Неизвестно

ДНК-диагностика наследственных форм РП заключается в секвенировании специфичного для синдрома гена по Сэнгеру



Ген VHL Типы мутаций

Герминальные	Соматические
мутации сдвига рамки считывания, нонсенс-мутации, реже миссенс-мутации, препятствующие фолдису pVHL (VHL-синдром 1 типа без феохромоцитомы)	делеции/инсерции/комплексные мутации со сдвигом рамки считывания
Миссенс-мутации сайтов связывания с HIF1α и элонгином C (VHL-синдром 2 типа)	миссенс-мутации сайтов связывания с HIF1α и элонгином C

VHL protein (pVHL) structure with functional regions: HIF1α binding, Elongin C binding, and Tumor suppression.

Результаты собственных исследований:

- выборка из 58 парных образцов тканей СКК (опухоль и гистологически неизменная паренхима почки)
 - VHL – 53,4% (31/58)
- одонуклеотидные замены – 41,9% (13/31)
 - делеции – 32,2% (10/31)
 - инсерции – 16,1% (5/31)
- комплексные мутации – 6,5% (2/31)
- мутация сайта сплайсинга – 3,2% (1/31)

1 экзон	2 экзон	3 экзон
54,8% (17/31)	29% (9/31)	16,1%(5/31)

B. VHL: Pseudohypoxia

The VHL Complex Disrupted leads to HIF accumulation, resulting in VEGF, Glut1, and PDGF, TGFα, leading to Angiogenesis, Glucose Transport, and Autocrine Growth Stimulation.

Мутации сайта связывания с HIF и элонгином C нарушают функцию VHL как опухолевого супрессора

определение статуса VHL может стать дополнительным тестом при выборе того или иного таргетного препарата

Внутриопухолевая генетическая гетерогенность

A Regional Distribution of Mutations

B Phylogenetic Relationships of Tumor Regions

пациент с метастазирующей СКК

- в основании – мутации-драйверы («truncal») VHL и PBRM1
- опухолевая прогрессия характеризуется приобретением вторичных («branch») мутаций (SETD2, PTEN, TP53)
- только 31% соматических мутаций – общие для первичного очага опухоли
- однократная биопсия – представление о малом проценте генетических aberrаций опухоли
- на начальном этапе опухоль характеризуется выраженной гетерогенностью
- параллельная клональная эволюция субклонов, приобретение независимых мутаций, затрагивающих изменения одних и тех же ключевых компонентов сигнальных путей (активацию mTOR, нарушение ремоделирования хроматина, мутации PTEN и TP53) – **конвергентный путь** эволюции опухолевого клона
- **внутриопухолевая гетерогенность и одновременная конвергентная эволюция субклонов – актуальная проблема при подборе адекватной таргетной терапии**

Cell stimuli (eg. growth factors) → VEGFR → VEGF → mTORC1 → Akt → mTORC2 → S6K1 → p70S6 → mRNA translation → Cyclin D1, c-Myc → Cell growth and survival.

Cell stimuli → VEGFR → VEGF → VEGFR → PDGF → Autocrine Growth Stimulation.

Cell stimuli → VEGFR → VEGF → VEGFR → PDGF → Autocrine Growth Stimulation.

Cell stimuli → VEGFR → VEGF → VEGFR → PDGF → Autocrine Growth Stimulation.

Ключевые аспекты:

- **инактивация гена *VHL*** – ключевое событие канцерогенеза наследственных и спорадических форм рака почки
- высокая чувствительность методов молекулярной биологии – перспективное решение проблемы диагностики РП на ранних этапах
- рефрактерность большинства пациентов с метастатическим раком почки к таргетным препаратам – актуальная проблема, требующая дальнейших исследований в области генетики опухоли почек
- определение статуса *VHL* может стать дополнительным тестом при выборе того или иного таргетного препарата
- открытие новых часто мутирующих генов при СКК (*PBRM1*, *VAPB*, *SETD2* и др.) и появление понятия о конвергентной эволюции опухолевых клонов почки позволяет более обоснованно подходить к применению уже существующих или разрабатываемых таргетных препаратов

