



**LAUREA MAGISTRALE BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA -
Curriculum Biosanitario e della Nutrizione**

Corso di ONCOLOGIA

18 novembre 2019

Patologia Molecolare del Gene-definizioni

- ✓ GENOTIPO: costituzione genetica di un individuo
- ✓ FENOTIPO: manifestazioni osservabili derivanti dall'interazione del genotipo con l'ambiente
- ✓ POLIMORFISMO: cambiamento della sequenza di DNA privo di effetti fenotipici; sono varianti normali, presenti in più dell'1% della popolazione
- ✓ VARIANTE PRIVATA: polimorfismo riscontrato solo in una famiglia o in un piccolo numero di famiglie correlate tra loro
- ✓ MUTAZIONE: cambiamento permanente della sequenza di DNA che comporta effetti fenotipici; è indispensabile stabilire le correlazioni genotipo-fenotipo

Patologia Molecolare del Gene

CLASSIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI

- ✓ Mutazioni puntiformi: variazioni della sequenza che interessano uno o pochi nucleotidi
 - ✓ Mutazioni silenti
 - ✓ Mutazioni missense
 - ✓ Delezioni/inserzioni *in frame*
 - ✓ Mutazioni nonsense
 - ✓ Mutazioni frame-shift
 - ✓ Mutazioni di splicing
 - ✓ Mutazioni nelle regioni regolatrici della trascrizione

- ✓ Alterazioni geniche strutturali
- ✓ Mutazioni dinamiche

- ✓ Mutazioni silenti: non alterano la sequenza aa. Sono generalmente innocue. Eccezione: mut che interferiscono con lo splicing.
- ✓ Mutazioni missense: sostituzione di un aa con un altro. E' necessario stabilire se si tratta di una vera mut (= patogenetica):
 - Riscontrata precedentemente in altri pz con stessa condizione?
 - Mut *de novo*?
 - Sostituzione aa non conservativa?
 - Mut in regione conservata della proteina?

- ✓ Delezioni/inserzioni in frame: inserimento o eliminazione di un numero di nucleotidi multiplo di 3 nella regione codificante. Le conseguenze dipendono dal ruolo del dominio alterato nella proteina.
- ✓ Mutazioni nonsense: inserimento di un codone di STOP. Conseguenze: instabilità dell'mRNA, sintesi di proteina troncata, exon skipping.
- ✓ Mutazioni frame-shift: inserimento o delezione di uno o due nucleotidi. Conseguenze: instabilità dell'mRNA, sintesi di proteina troncata, exon skipping.

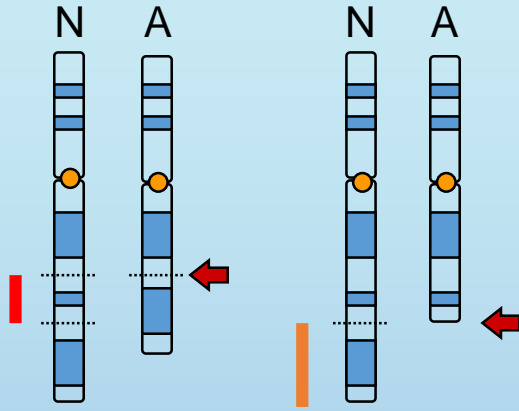
✓ Mutazioni di *splicing*:

- mutazioni nei siti canonici di splicing (GT o AG all'inizio o alla fine dell'introne)
- Mut nella sequenza consenso del sito di biforcazione
- Mut sequenza ESE (Exonic Splicing Enhancers)
- Sostituzione di una base in un sito criptico di splicing.
- Conseguenze: *exon skipping*, *intron retention*, inclusione di una parte di un introne nel trascritto maturo, esclusione di una parte di un esone nell'mRNA

A. delezioni

interstiziale

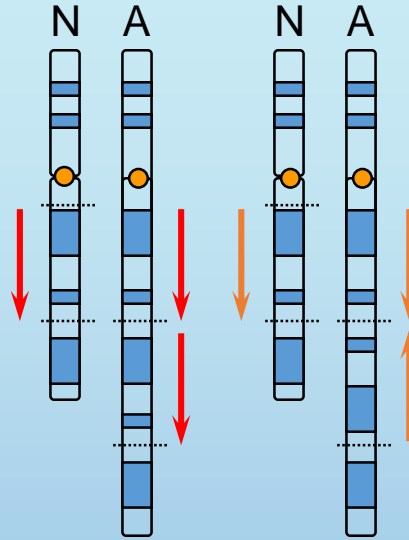
terminale



B. duplicazioni

tandem

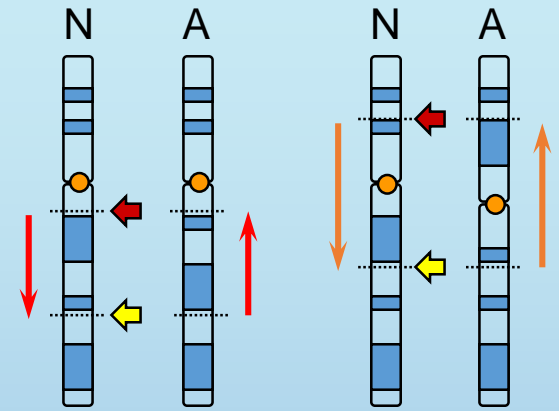
invertita



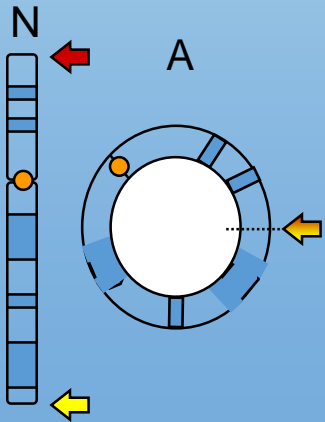
C. inversioni

paracentrica

pericentrica



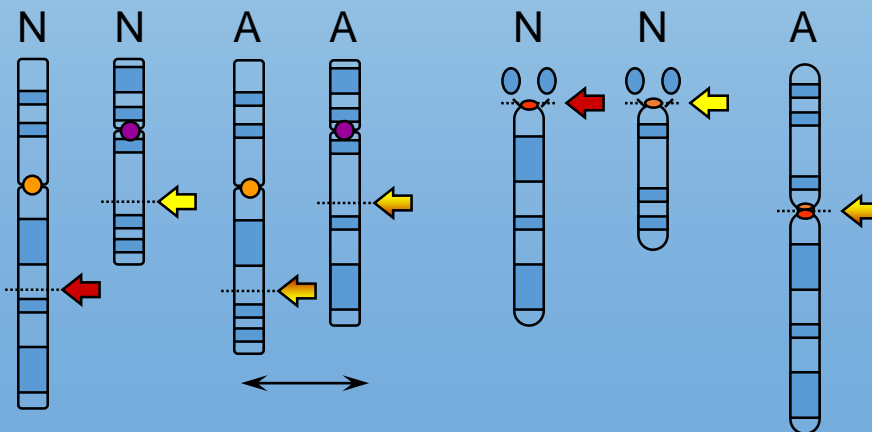
D. cromosoma ad anello



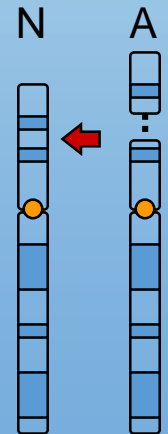
E. traslocazioni

reciproche

robertsoniane

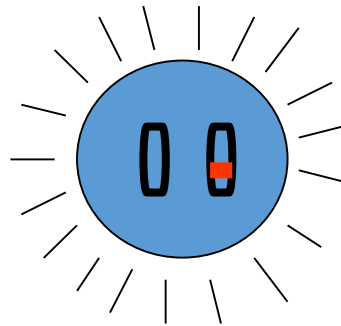


F. sito fragile



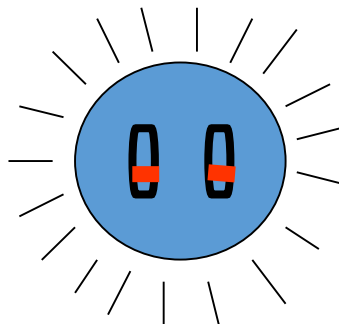
ONCOGENI/ONCOSOPPRESSORI

Oncogeni: controllo positivo della proliferazione

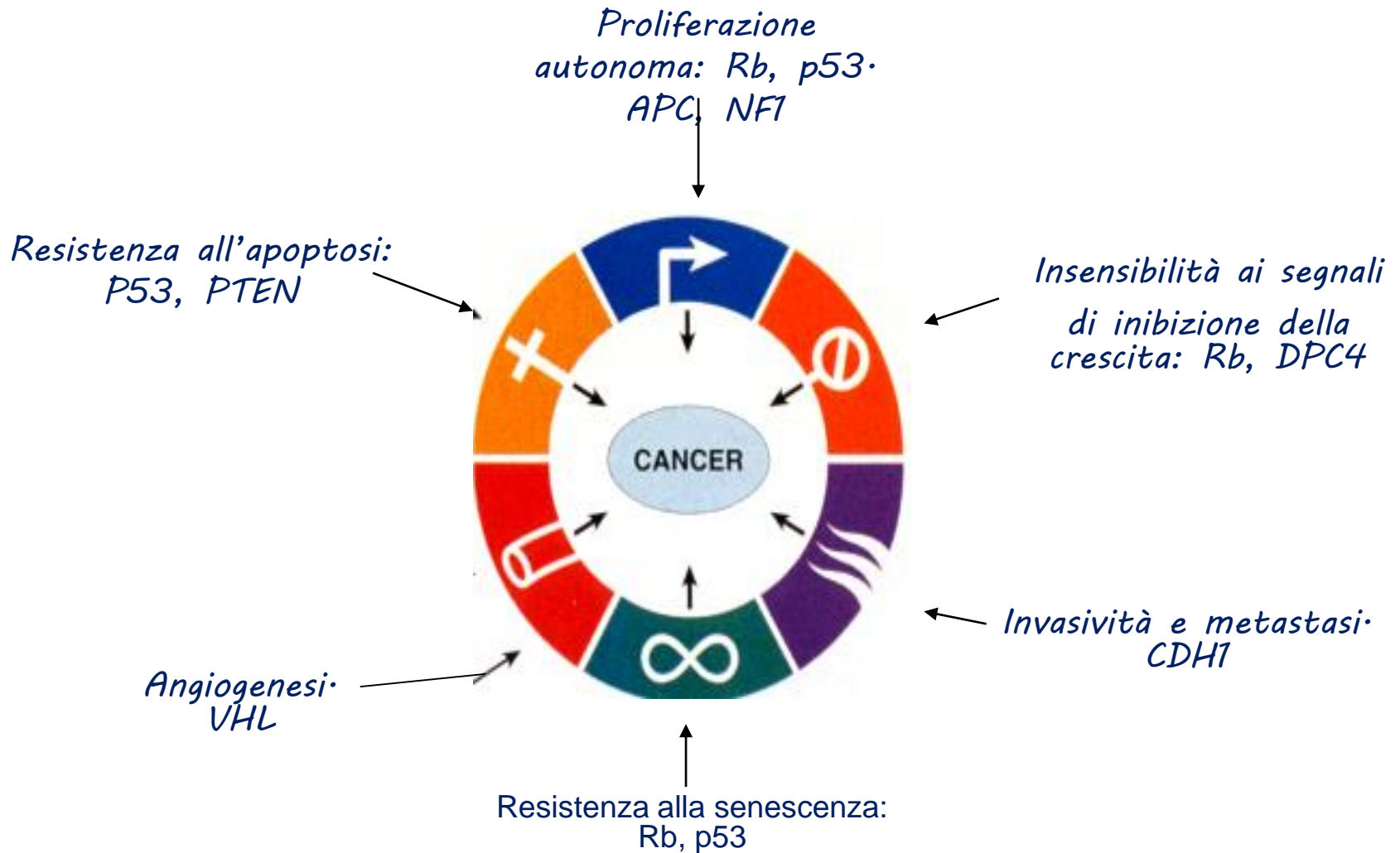


Oncosoppressori suddivisi in:

- geni che controllano negativamente la proliferazione
- geni che controllano la stabilità del DNA



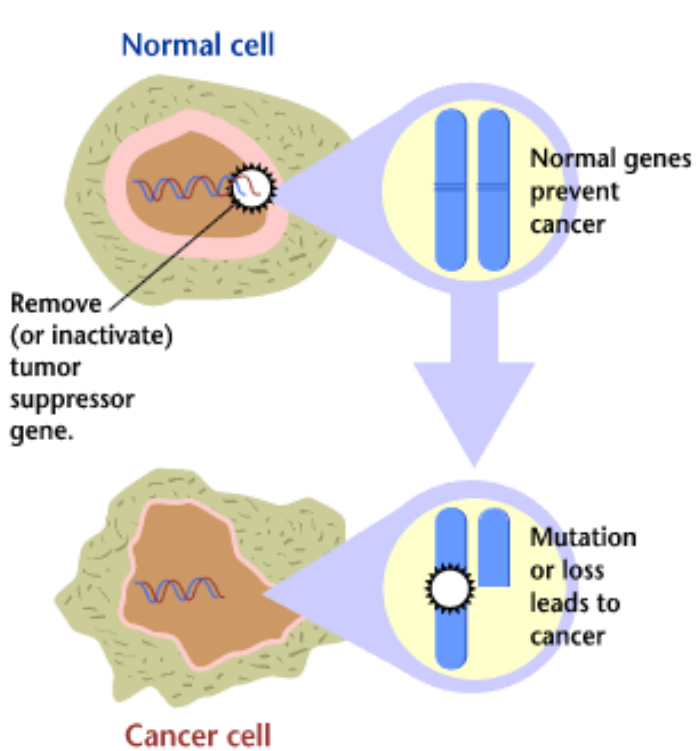
Caratteristiche del cancro ed oncosoppressori



Classe molto eterogenea, producono **fattori inibitori del ciclo cellulare o fattori pro-apoptotici o fattori coinvolti nel mantenimento della stabilità del genoma**

- geni direttamente coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare; es. *RB1* (p110); *TP53* (p53)
- geni coinvolti nella inibizione della crescita da contatto cellula-cellula; es. *NF2* (Nf2)
- geni coinvolti nella riparazione dei danni al DNA e nel mantenimento della integrità genomica; es. *BRCA1* e *BRCA2* (*Brca1* e *Brca2*); *MLH1* e *MLH2* (*Mlh1* e *Mlh2*)

Nelle cellule tumorale i geni oncosoppressori risultano:



Persi
Delezione genica

Alterati
mutazioni

Repressi
ipermetilazione

La mancata funzione dei geni oncosoppressori provoca trasformazione e progressione neoplastica

Le proteine da essi sintetizzate fanno parte di sistemi difensivi che mantengono l'integrità del genoma e che sono capaci di:

- rilevare la presenza di danni*
- bloccare la progressione del ciclo per consentire la riparazione del DNA*
- Innescare l'apoptosi (se il danno è irreparabile)*

*Per gli oncosoppressori, a differenza degli oncogeni, è necessario che **entrambe le copie** geniche siano mutate perché si abbia la perdita della loro funzione (“doppia dose genica”).*

L' esistenza dei geni oncosoppressori è stata ipotizzata sulla base di:

- ✓ Esperimenti di fusione in vitro tra cellule normali e cellule tumorali: talvolta si ha la correzione del fenotipo trasformato e restaurazione di un fenotipo normale;*
- ✓ Esistenza di tumori caratterizzati da piccole specifiche delezioni in omozigosi;*
- ✓ Studi sulle rare forme di tumori ereditari*

ONCOGENI

ONCOSOPPRESSORI

Sviluppo del tumore

Guadagno di
funzione

Perdita di
funzione

Azione a livello
cellulare

Dominante

Recessiva

Meccanismo

Attivazione di
un allele

Inattivazione di
entrambi gli alleli

Presenza m.
germinali

NO

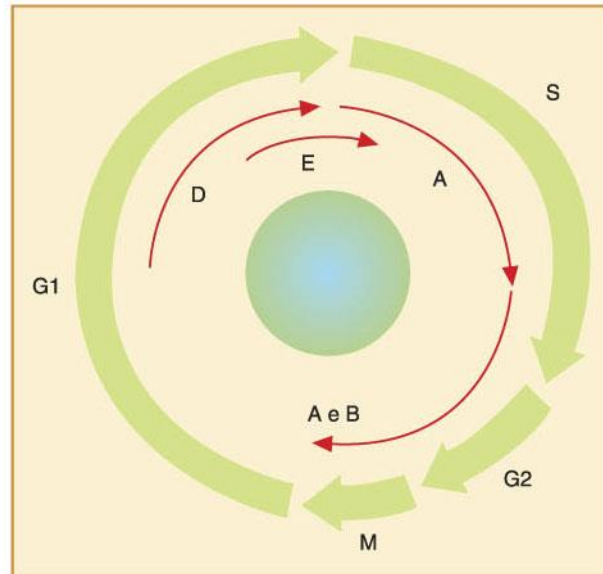
SI'

*Oncosoppressori:
Rb e p53*



*Fattori di crescita
(controllo positivo):
EGF, FGF, PDGF, TGFa
IGF I, IGF II
Fattori negativi:
IFN, TGFβ, TNF*

*Espressione genica:
Fos, jun, myc
Ciclina*

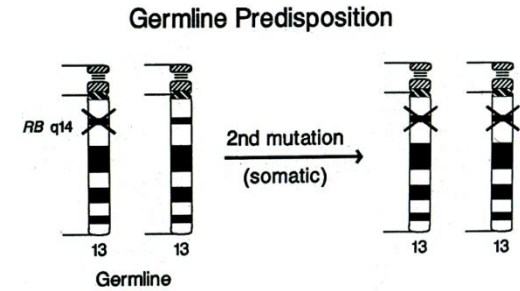


Retinoblastoma

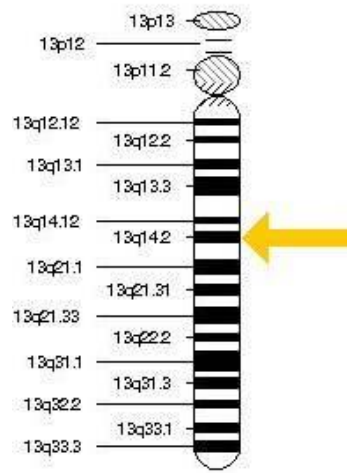
Raro tumore infantile (ca. 1/20000 nati)

60% forme sporadiche, unilaterali e monofocali, con età di insorgenza media: 29 mesi

40% forme ereditarie, trasmissione AD a penetranza incompleta, bilaterali e multifocali, età di insorgenza media: 15 mesi



Le mutazioni/delezione di Rb è associata a numerose neoplasie umane
Elevato rischio di osteosarcomi, sarcomi, ca della mammella, ca a piccole cellule del polmone e ca della vescica



RB1

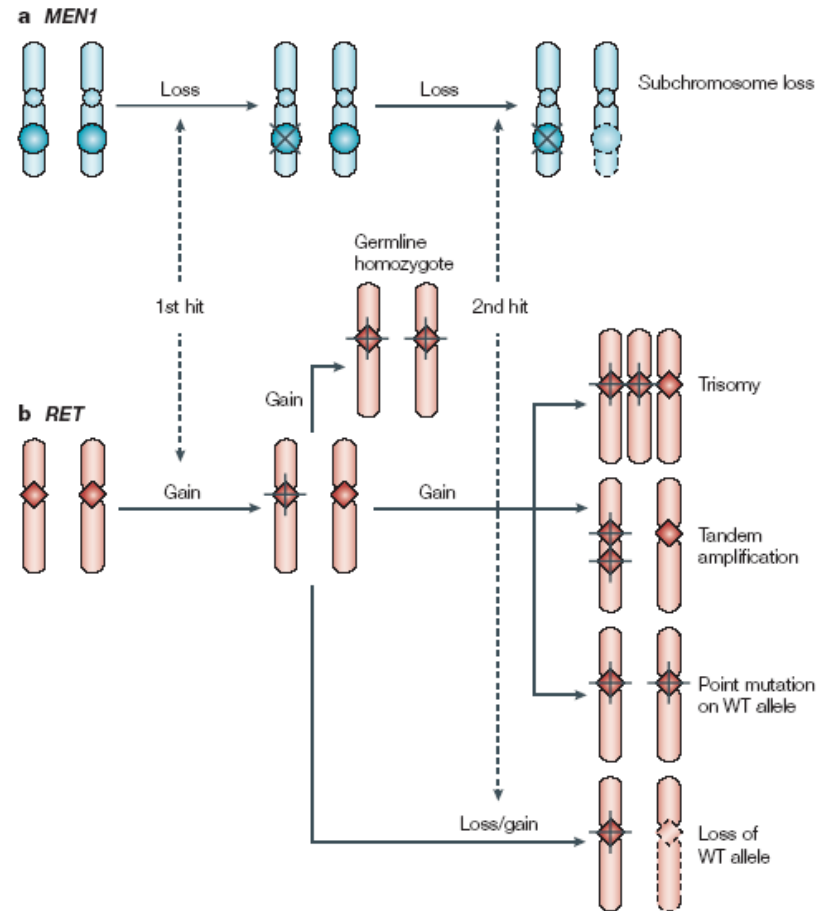
Il gene *RB1* è localizzato sul **cromosoma 13** e, in una piccola percentuale di pazienti, la mutazione ereditaria è dovuta ad una delezione o a una traslocazione di questa porzione del cromosoma

Il prodotto del gene *RB1* è la proteina **p110 Rb1** (110 kDa): è una fosfoproteina che viene ipo- (forma attiva) o iperfosforilata nei diversi stadi del ciclo cellulare ed ha un'importanza cruciale nel punto di controllo G1-S

Processo oncogenetico multifasico : " teoria dei due colpi " di Knudson

Due eventi mutazionali

Un allele del gene oncosoppressore può essere ereditato mutato da uno dei due genitori (eterozigosi), l'altro viene inattivato da un evento mutageno occasionale (omozigosi)



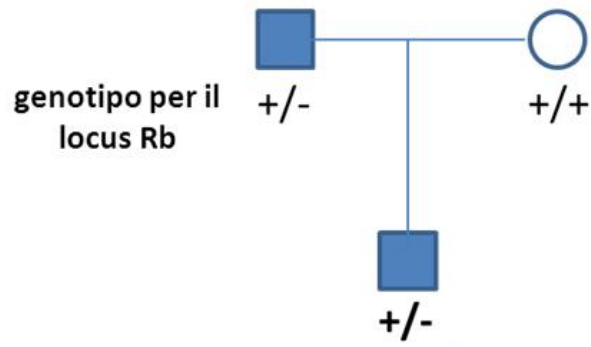
IPOTESI DEI DUE COLPI (KNUDSON)

*Il tumore insorge quando entrambe le copie del gene *Rb* sono non funzionanti*

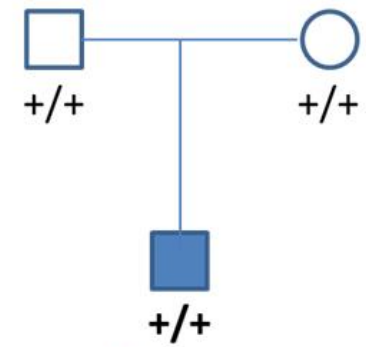
Nei casi sporadici devono verificarsi 2 eventi mutazionali nello 'stesso' retinoblasto

*Nei casi ereditari TUTTE le cellule sono portatrici di una mutazione a carico di *Rb*, è quindi sufficiente 1 solo evento mutazionale (a carico del secondo allele)*

RETINOBLASTOMA EREDITARIO



RETINOBLASTOMA SPORADICO



$+/-$ retinoblasti predisposti

nei casi ereditari : TUTTI (ca. 10^6);

nei casi non ereditari: i discendenti del retinoblasto che ha subito il 'primo colpo' (il loro no. dipende dalla precocità del 'primo colpo')

'primo colpo'

mutazione somatica in un retinoblasto

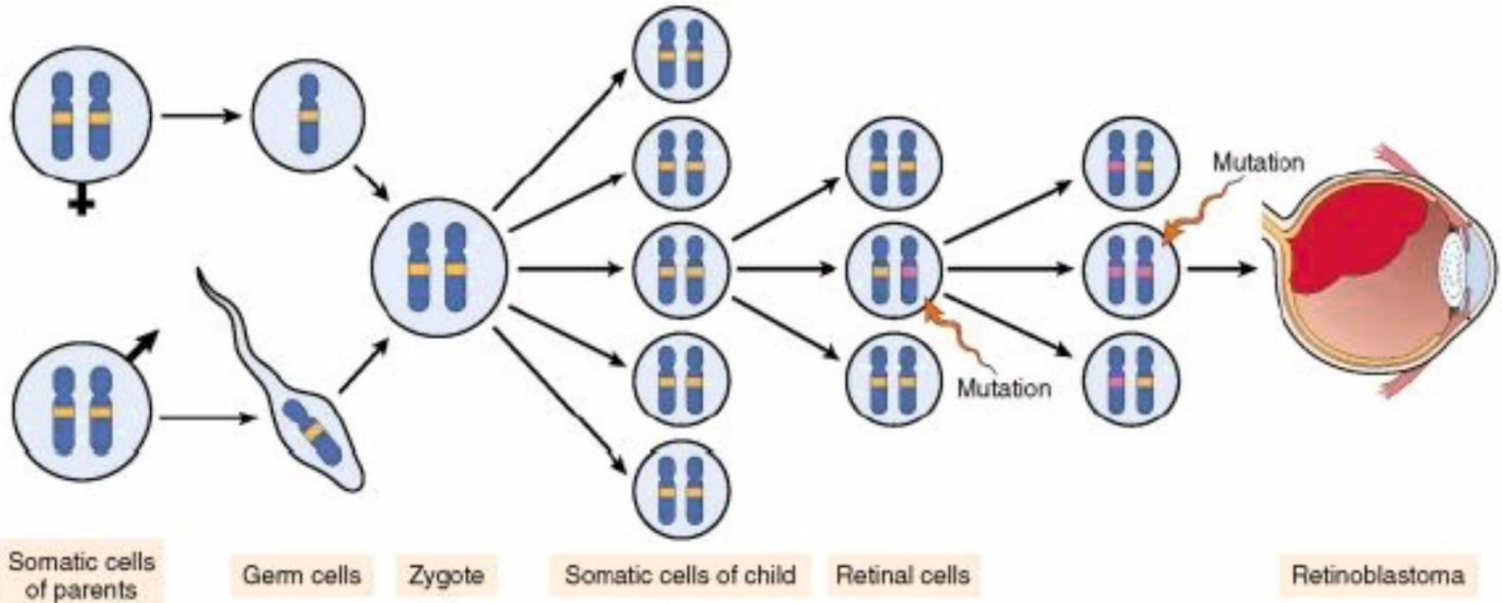
'secondo colpo'

mutazione in un retinoblasto predisposto

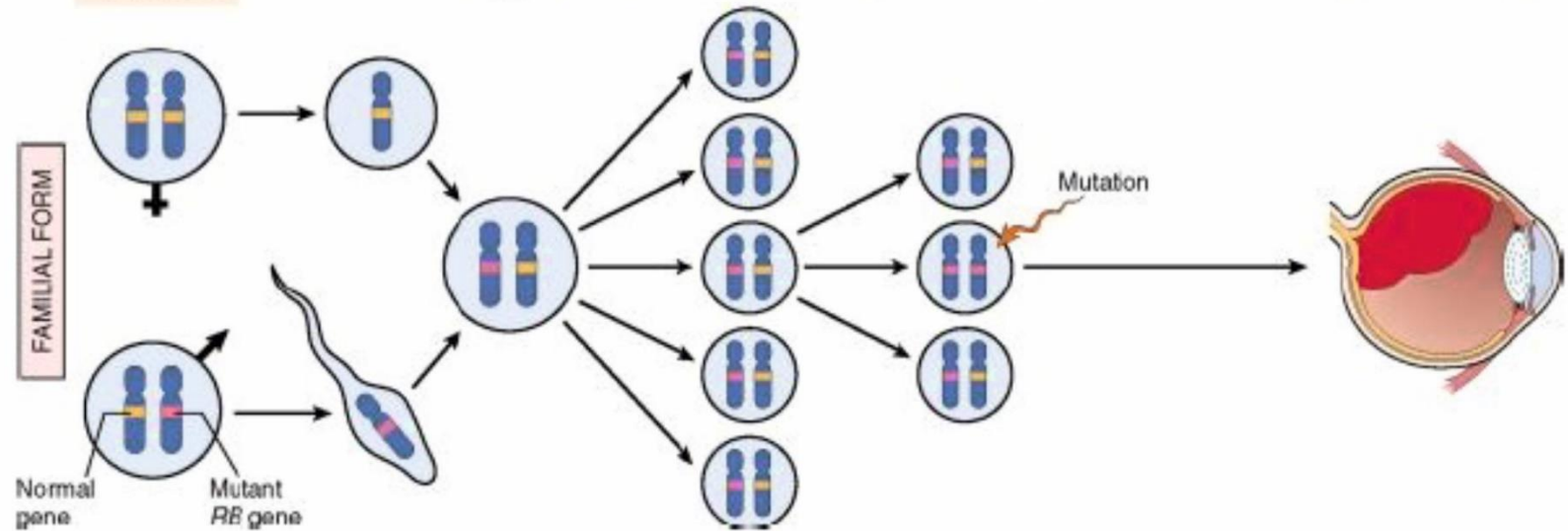
$-/-$ cellula tumorale

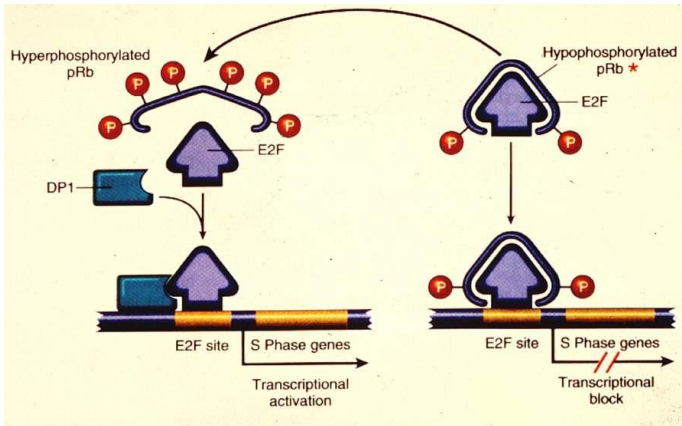
PATHOGENESIS OF RETINOBLASTOMA

SPORADIC FORM



FAMILIAL FORM





*p105 ipofosforilata lega il fattore E2F
blocca il ciclo cellulare*

*p105 iperfosforilata libera il fattore
di trascrizione E2F*

*Si complessa con DP1 e passa nel
nucleo*

dove

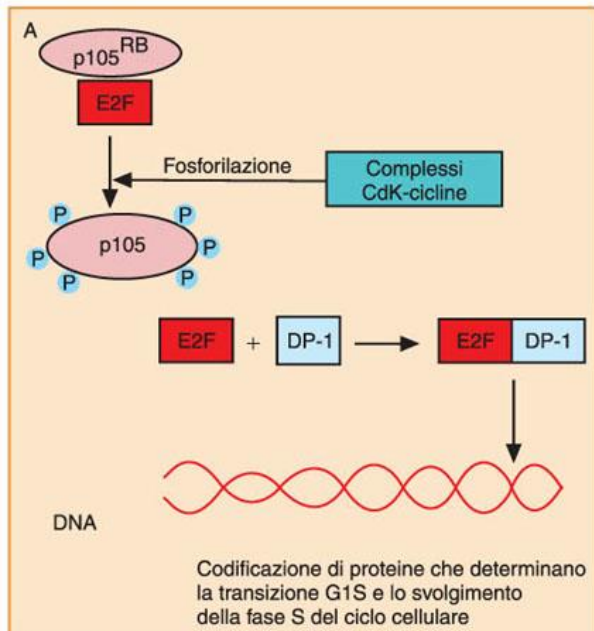
*attiva geni indispensabili per la
replicazione del DNA*

e

protooncogeni: es myc e myb

*che determinano l'avanzamento della
cellula*

della fase G1 alla fase S



Rb

esercita la sua azione modulatrice con intensità diversa nei vari citotipi

Rb

*è anche coinvolto nell'arresto irreversibile del ciclo della proliferazione:
senescenza*

Rb

*è coinvolto nella differenziazione cellulare:
Regola fattori di trascrizione tessuto-specifici*

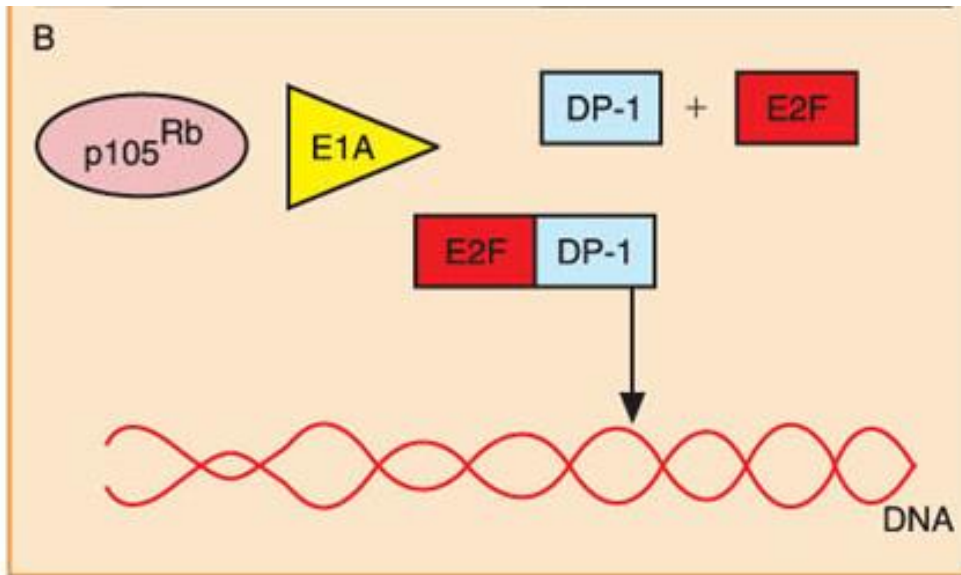
*Mutazioni Rb
nei tumori umani sporadici*



Altri geni possono mimare la funzione di Rb

*Carcinoma a piccole cellule 90%
Carcinoma non a piccole cellule 10-15%
Ca prostata 20%
Ca mammella 10%
Ca vescica 20-50%
Leucemia mieloide cronica 20%
Glioma 15-20%
Ca esofago 15-50%
Ca fegato 15-30%*

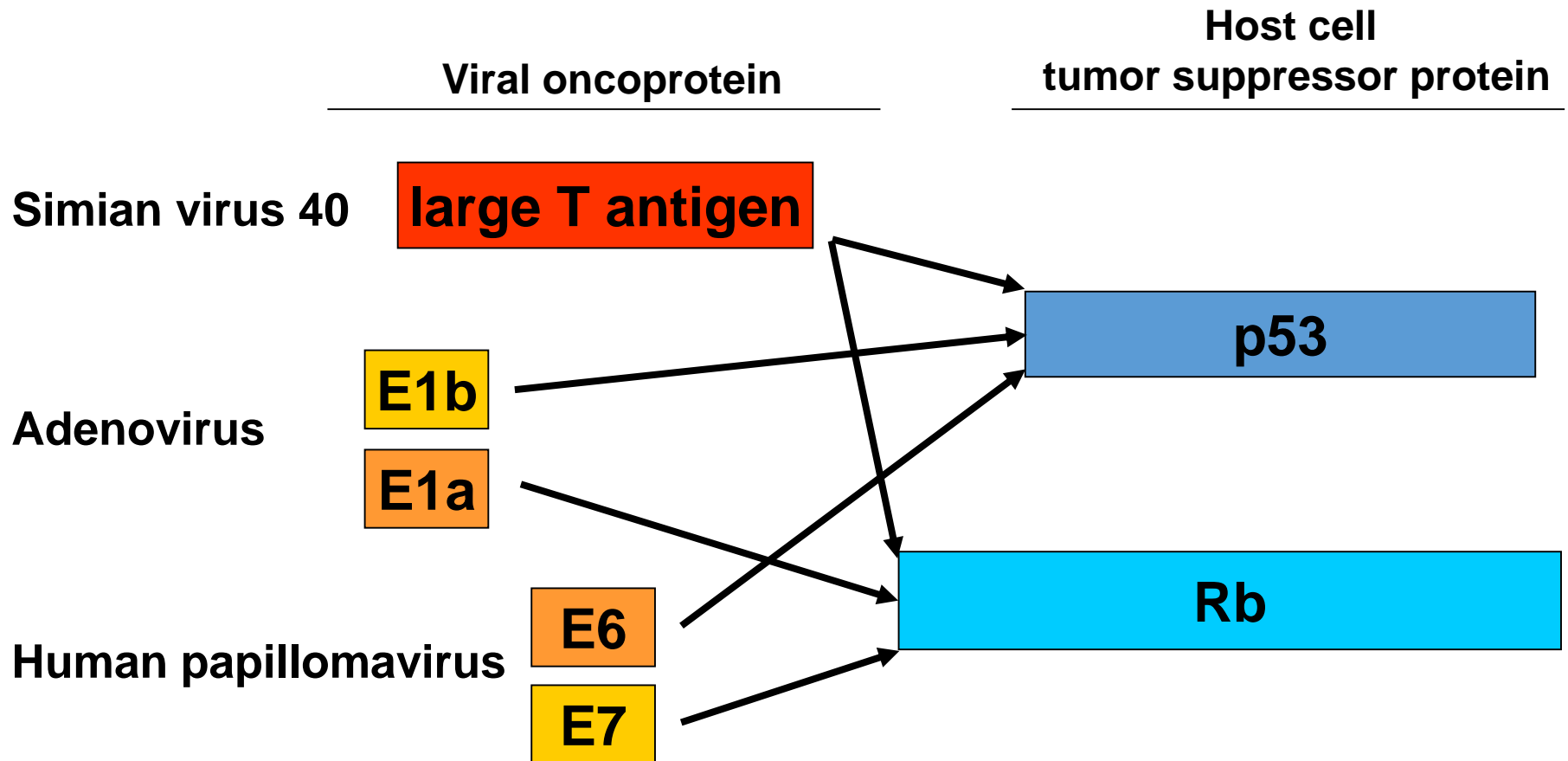
p105 mutato lascia il fattore E2F continuamente disponibile per la trascrizione genica



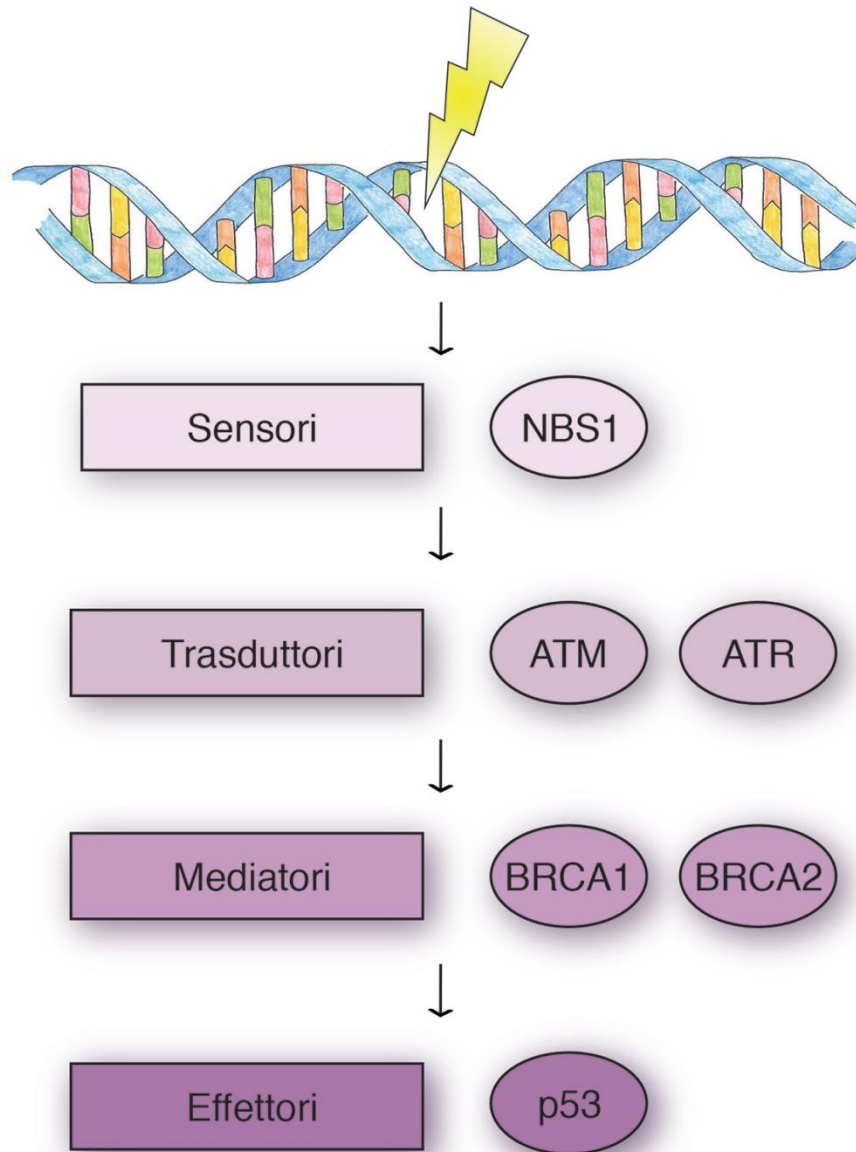
*Delezione o legame con
proteine virali*

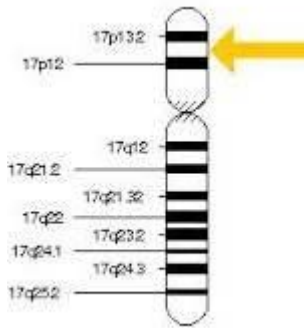
p105 iperfosforilato

Proteine virali possono inibire l'azione di oncosoppressori



GENI CARE TAKER





p53

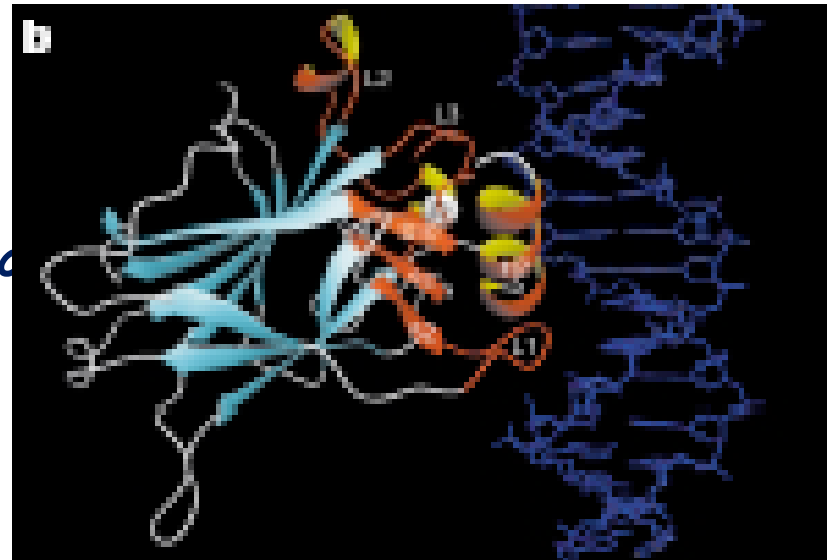
- ✓ *fattore di trascrizione*
- ✓ *regola l'espressione di oltre 300 geni*
- ✓ *proteina nucleare di 55kDa*

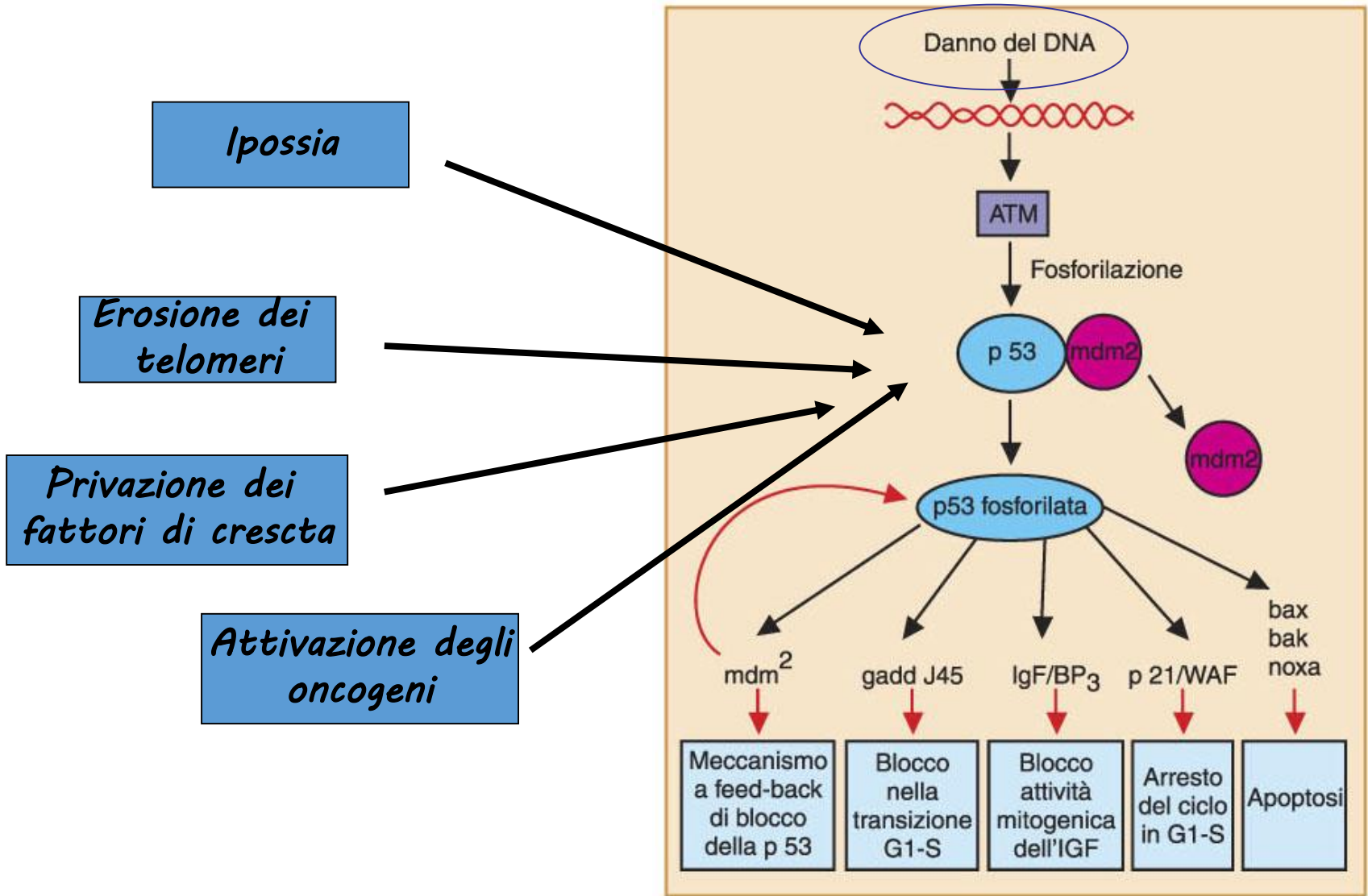
*p53 fosfoproteina nucleare che funziona da fattore trascrizionale
in grado di legare sequenze di DNA*

Controllo della proliferazione

*Attivano i meccanismi
di riparazione al DNA danneggiato*

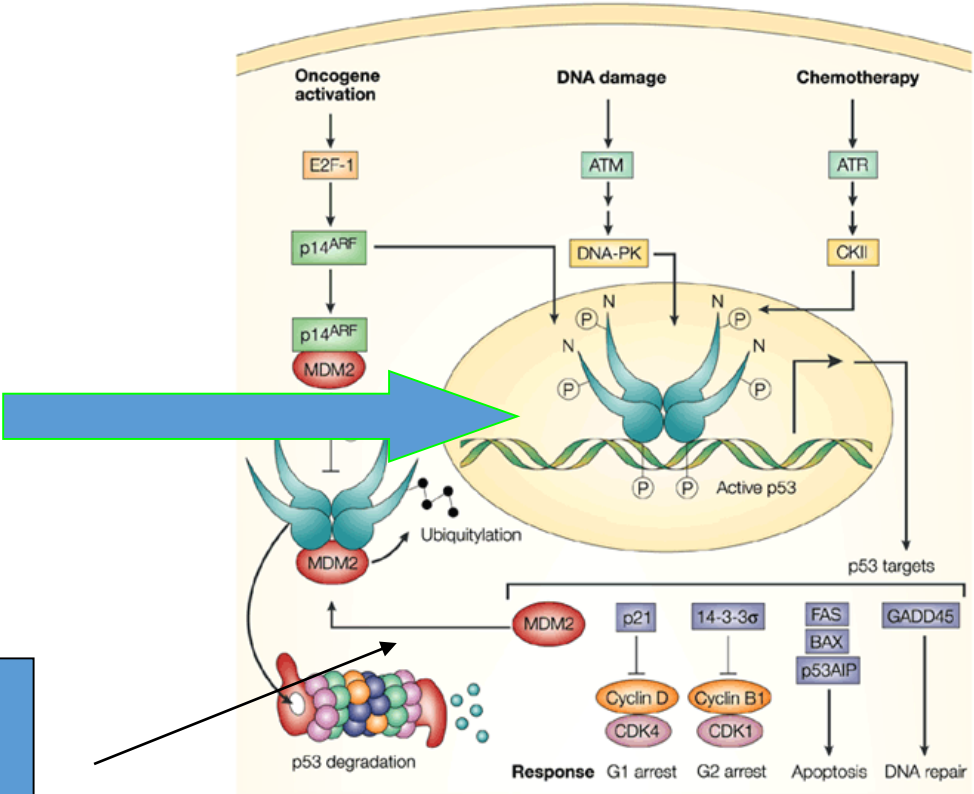
Apoptosi



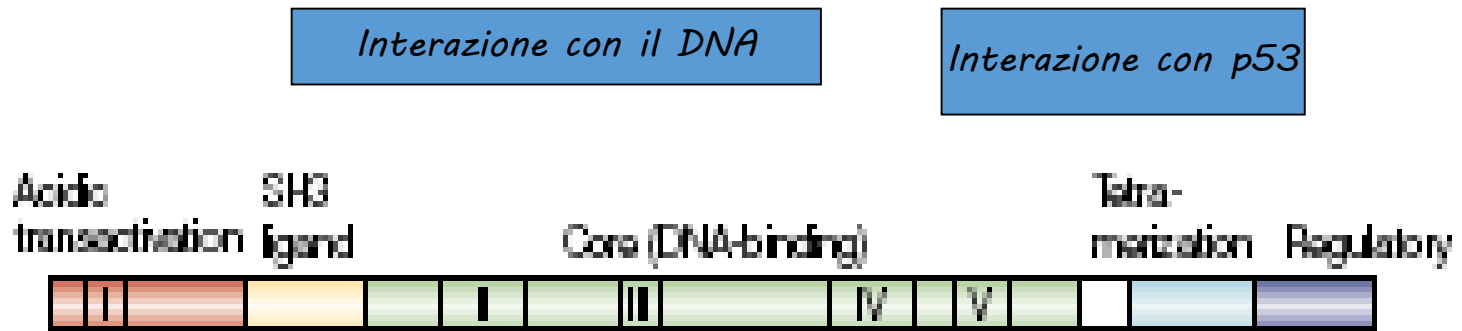


E' attiva come tetramero, anche mutazioni di un solo allele risultano in una p53 inattiva molto più stabile

*Ha una breve emivita
Viene inattivata da MDM2*



Nature Reviews | Cancer



Attiva geni che inibiscono la progressione del ciclo cellulare e inibisce quelli che ne favoriscono la progressione

Autoinibizione

Il gene mutato perde la capacità di agire come attivatore trascrizionale dei geni coinvolte nel ciclo cellulare

P53

mutata è molto frequente nei tumori umani sporadici

Ca ovarici ed esofagei 50%

Ca colon-retto pancreas e polmone 40-50%

Utero e mammella 25-30%

Sarcomi 15-20%

Sindrome di Li Fraumeni:

Mutazione germinali di p53

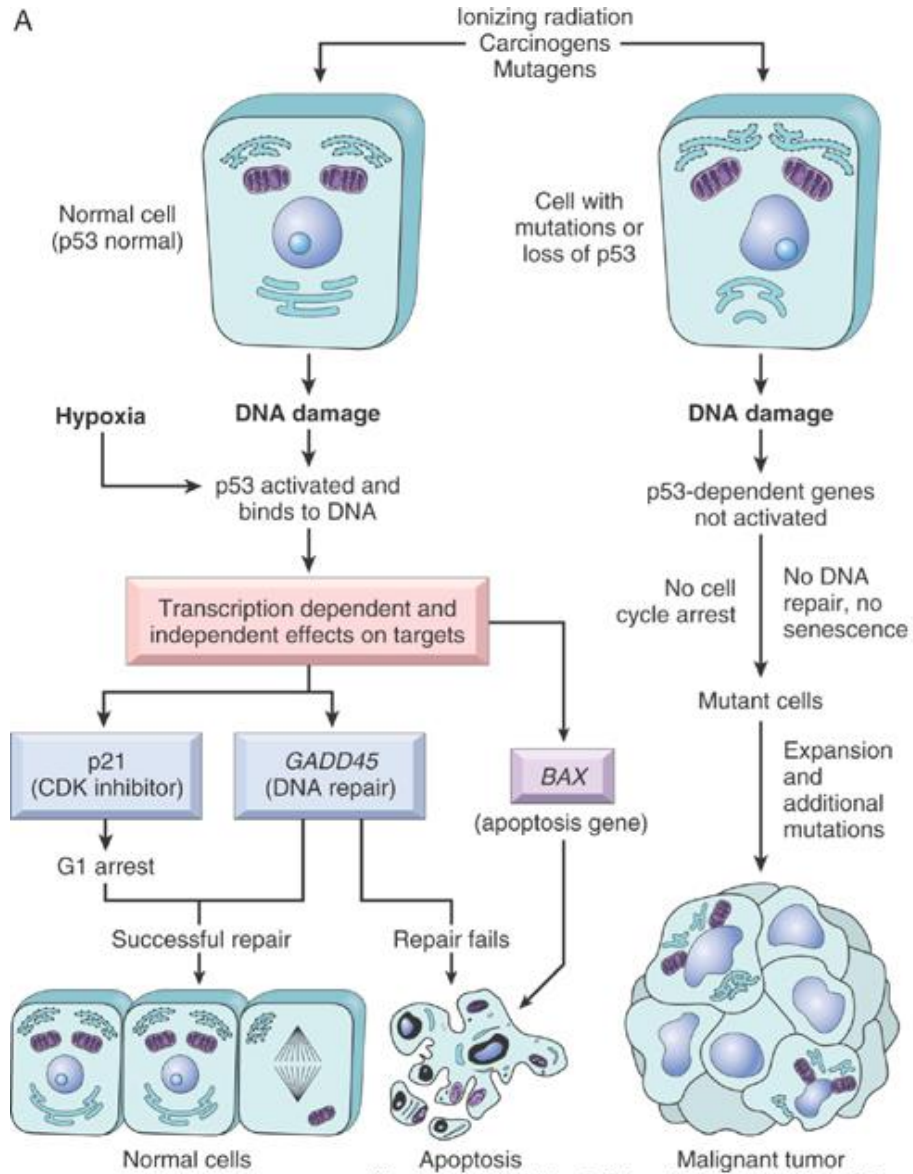
Alto rischio all'insorgenza di:

Sarcomi, leucemie, neoplasie alla mammella

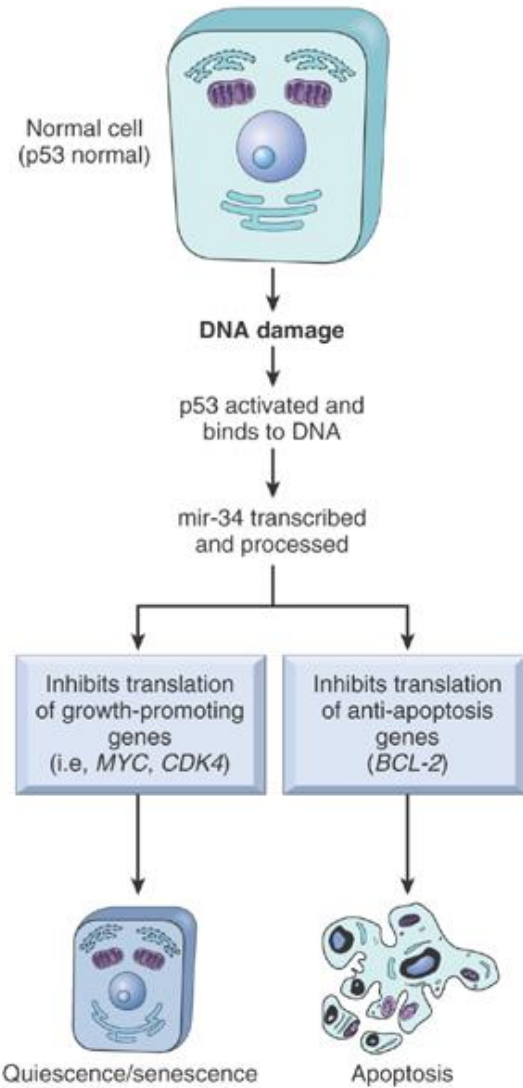
30% entro i 30anni

90% dopo i 65 anni

A



B



Kumar et al: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th Edition.
Copyright © 2009 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

| TUMORE | PERCENTUALE DI CAMPIONI CON p53 MUTATA |
|---|--|
| Leucemia mieloblastica acuta | 6 |
| Tumori del cervello | 10 |
| Tumore della mammella | 53-86 |
| Linee cellulari di linfoma di Burkitt | 60 |
| Tumore coloretale | 50 |
| Carcinomi epiteliali | 48 |
| Tumori esofagei | 50 |
| Carcinoma gastrico | 57 |
| Epatoma HBV positivo | 18 |
| Carcinoma del polmone a piccole cellule | 44-73 |
| Carcinoma del polmone non a piccole cellule | 45 |
| Adenocarcinoma polmonare | 57 |
| Carcinoma a cellule squamose del polmone | 34-82 |
| Astrocitoma maligno | 30 |
| Melanoma (primario) | 97 |
| Mieloma multiplo | 20 |
| Linee cellulari di neuroblastoma | 80 |
| Linee cellulari di osteosarcoma | 90 |
| Osteosarcomi | 41 |
| Carcinomi ovarici | 44 |
| Carcinomi pancreatici | 40 |
| Rabdomiosarcomi | 45 |
| Carcinomi a cellule squamose della laringe | 60 |
| Carcinomi tiroidei | 50 |

Tabella 2. Percentuale di mutazione del gene p53 in vari tumori umani.

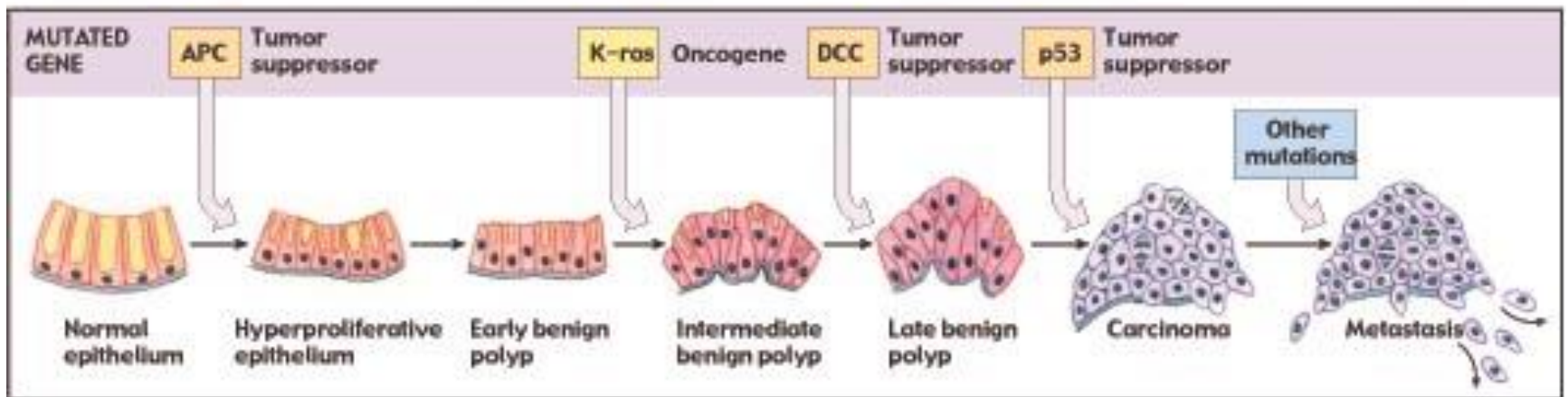
Meccanismo

- a. delezione dei suoi due alleli con conseguente mancanza della proteina >>>>>> oncosoppressore recessivo

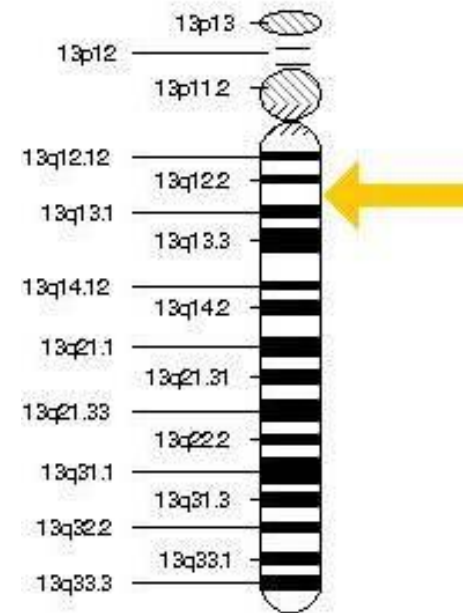
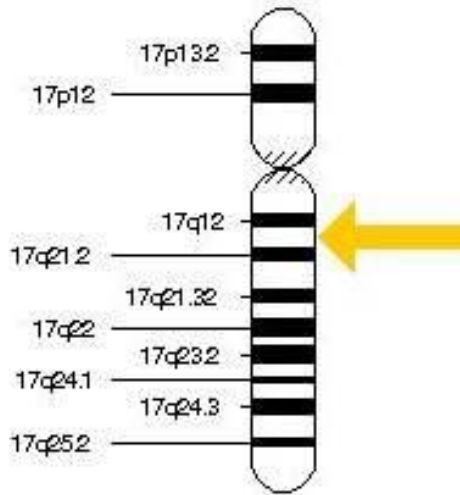
- b. mutazione in un solo allele >>>>>> proteina wild type e proteina mutata >>>>> tetramero con monomeri wt e mut >>>> complesso proteico non funzionante >>>> dominante

Inattivazione

- a. Cellule tumorali che presentano una p53 non funzionale possono continuare a **proliferare** attivamente anche in presenza di danni al genoma.
- b. L'aumento del **tasso di mutazione** aumenta il numero di oncogeni che diventano attivi e dei geni oncosoppressori che vengono inattivati.
- c. Mutazioni del pathway di p53 rendono le cellule tumorali **resistenti all'apoptosi**.
- d. Negli stadi iniziali della cancerogenesi, le cellule che hanno p53 non funzionale non esprimono più un fattore proteico (TSP-1) che viene secreto e inibisce l'angiogenesi >>>> **Lo sviluppo di una nuova rete di vasi sanguigni non è più inibita**

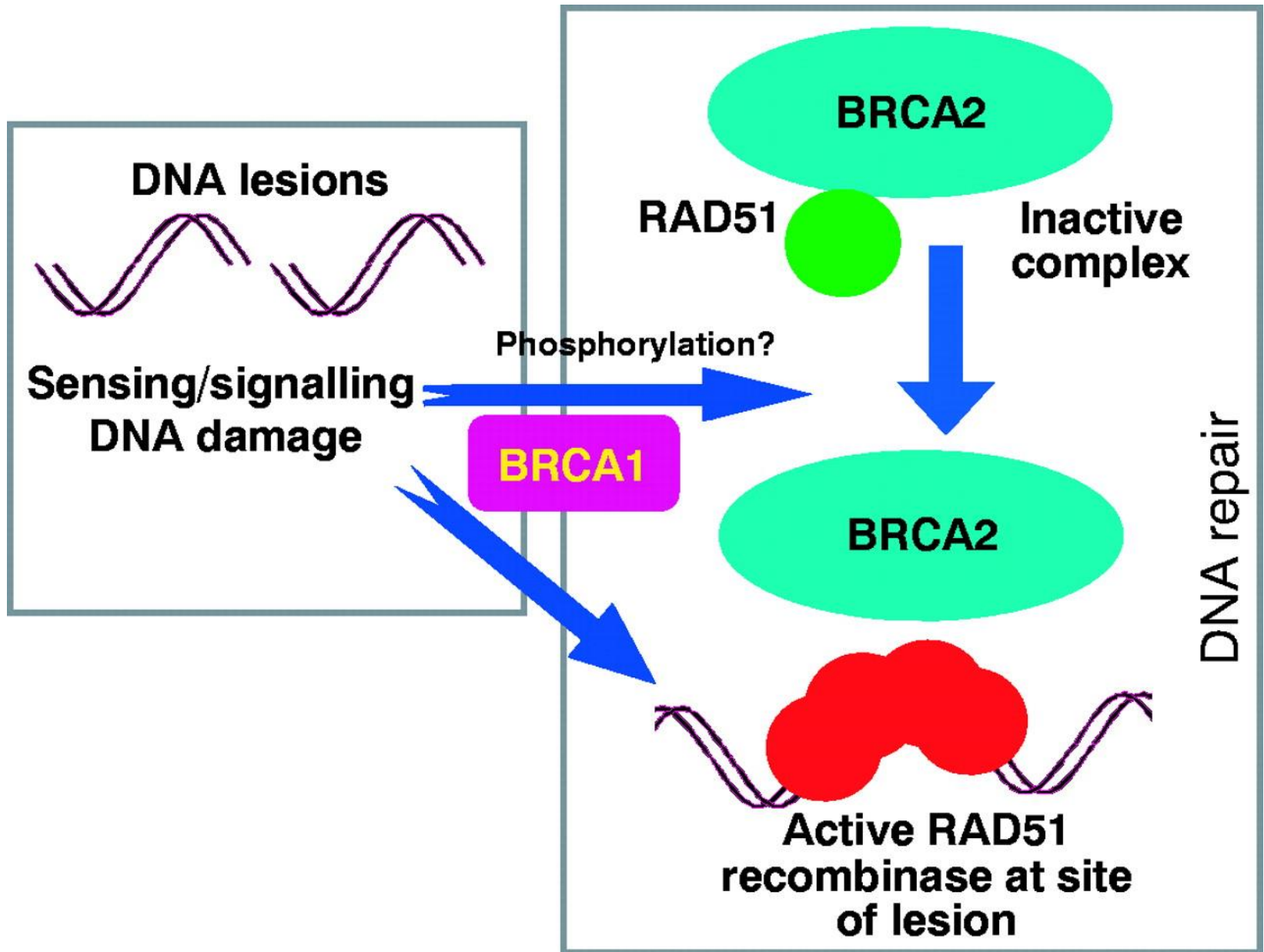


BRCA1 / BRCA2

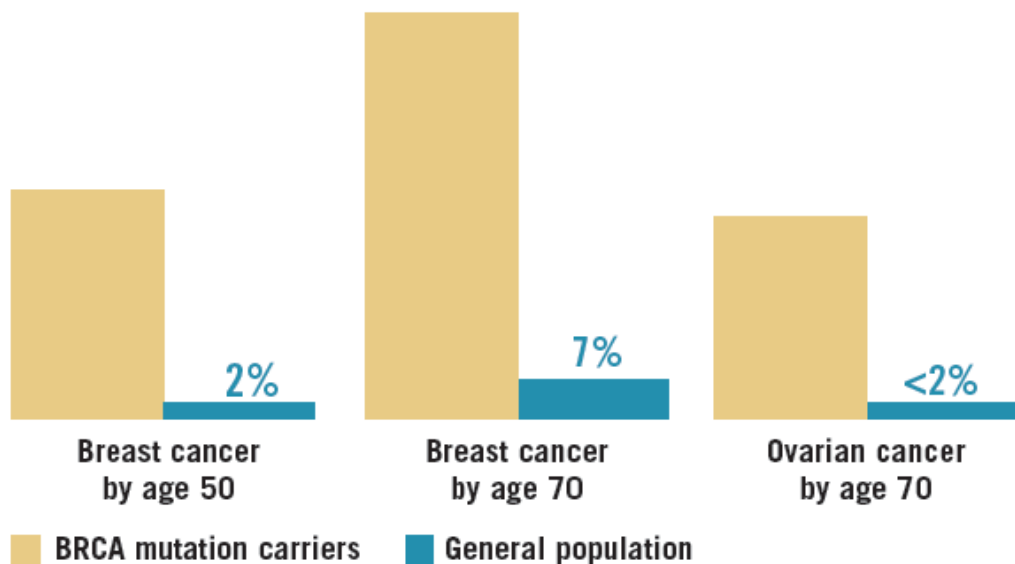


Sono state identificate oltre 600 mutazioni troncanti in BRCA1 e BRCA2.

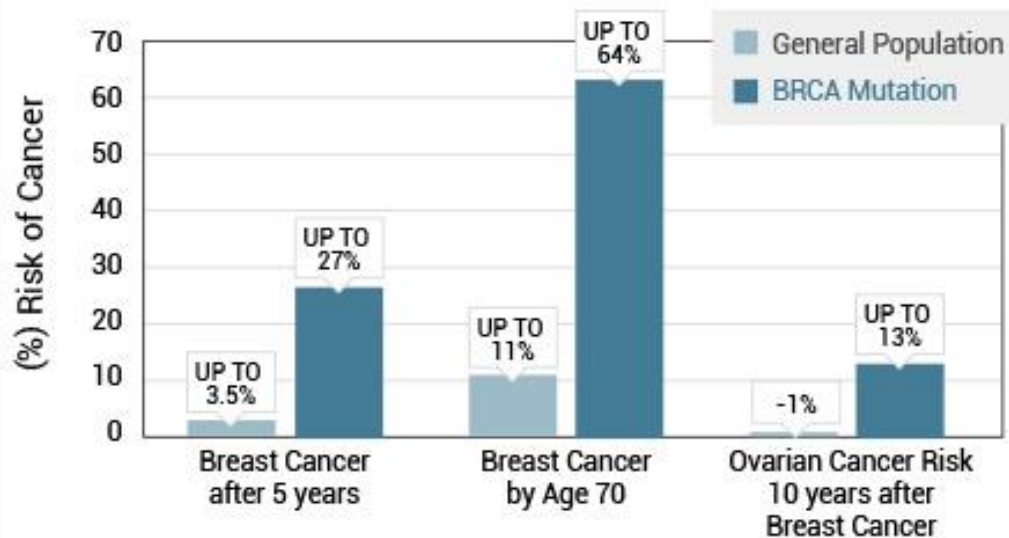
Le mutazioni a carico di questi geni sono responsabili dell'80% e 14% rispettivamente del cancro alla mammella e del 60% e 27% rispettivamente del cancro all'ovaio



BRCA Mutation Increases the Risk of Cancer



BRCA Mutations Increase Risk of a Second Cancer



Ciclina

Proteine regolatorie attive in particolari momenti del ciclo cellulare

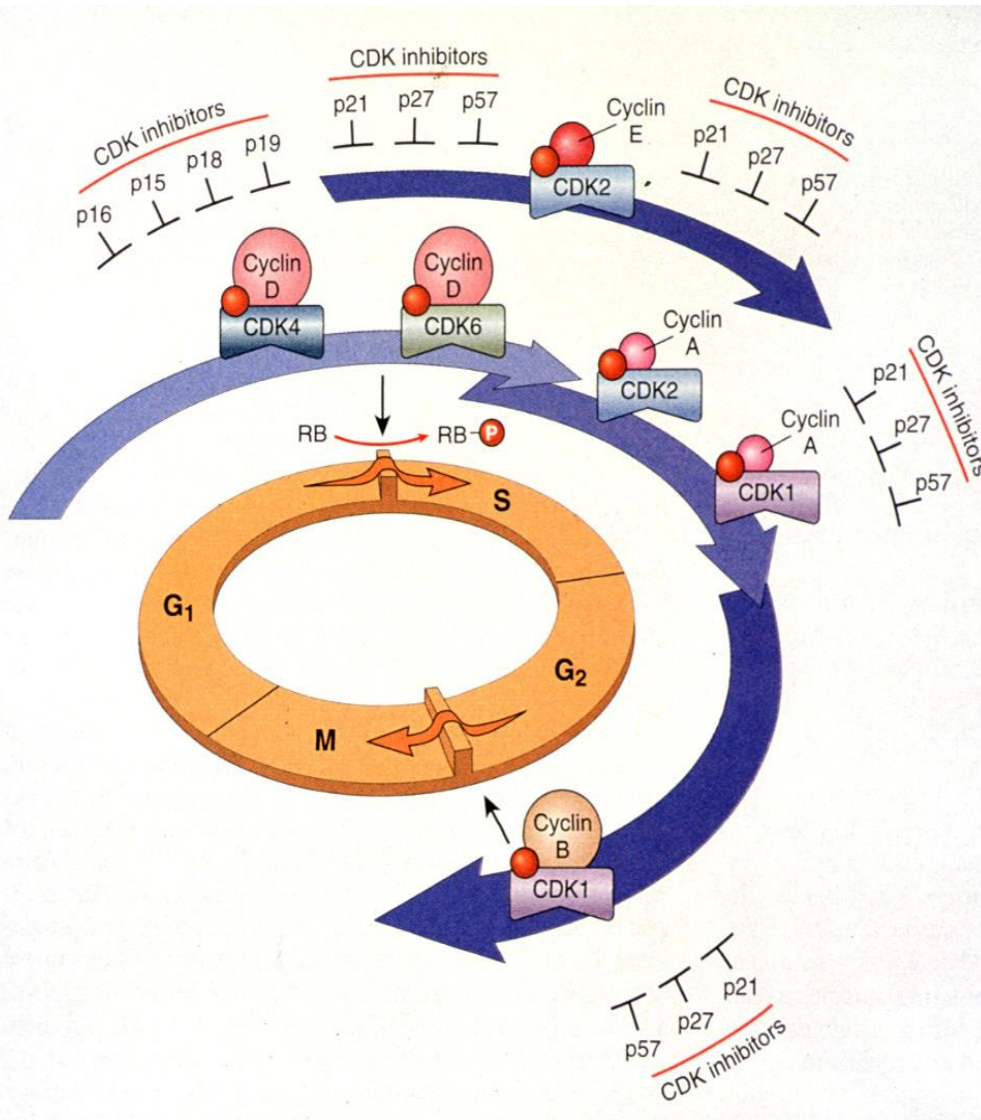
How do the cells overcome these checkpoints?
i.e. the negative controls in resting cells that prevent cell cycle progression?
Positive signals like:

Hormones (insulin)

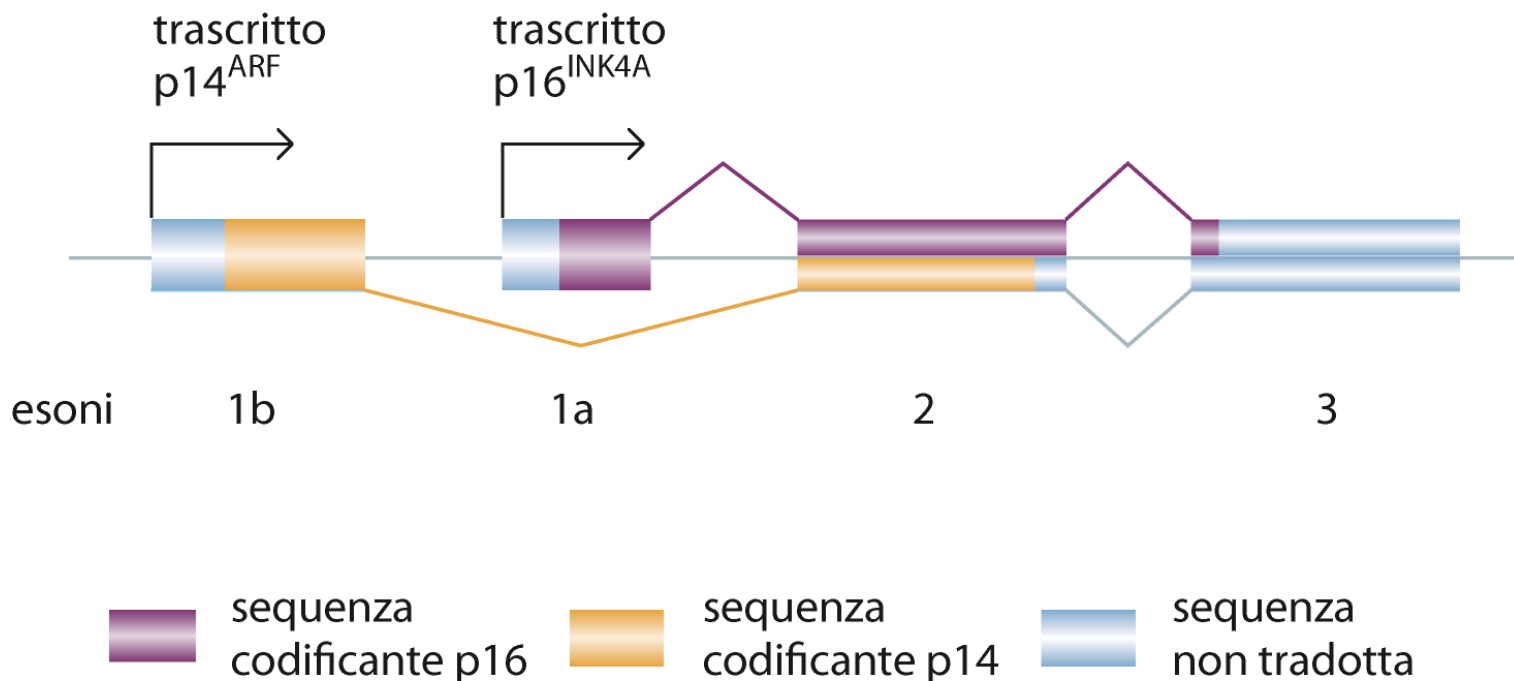
Growth factors (PDGF)

Cytokines (interleukins, IL1-18)

Rb e p53



CDKN2A → codifica per 2 proteine strutturalmente non correlate



p16 (o INK4A) → agisce a monte di *RB1* inattivando le chinasi che fosforilano pRB (forma inattiva). La sua assenza causa quindi, indirettamente, un aumento della fosforilazione di pRB, cioè della sua forma inattiva

p14 (o ARF) → blocca il gene *MDM2* che, a sua volta, blocca p53 (la lega e la degrada); quindi l'assenza di p14 causa, in maniera indiretta, la diminuzione di p53

Oncogeni e Oncosoppressori in terapia

Target therapy e farmaci molecolari

- La comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e lo sviluppo dei tumori ha consentito di identificare una serie di molecole che svolgono un ruolo chiave nella proliferazione cellulare tumorale, sviluppo e diffusione (metastatizzazione) dei tumori.
- Molte delle proteine coinvolte in questi processi sono state oggi identificate come possibile bersagli (target) per lo sviluppo di nuove terapie antitumorali specifiche selettive.

Anticorpi monoclonali

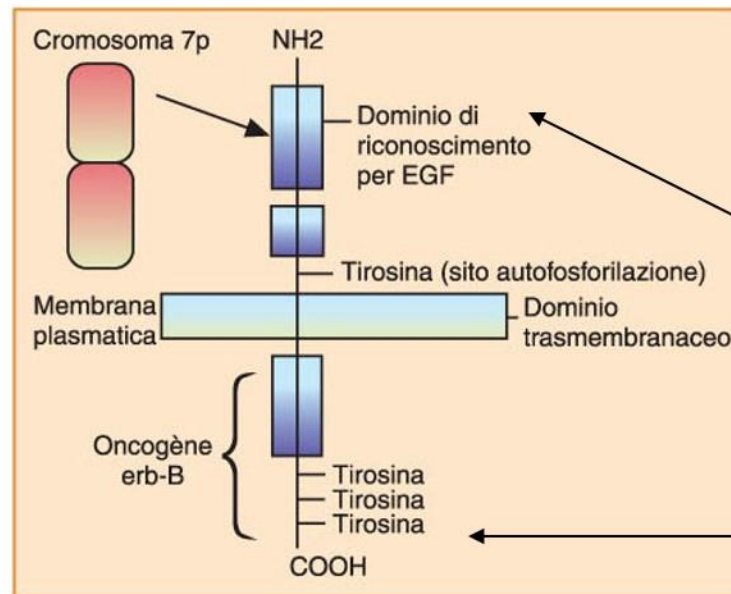
- Sono diretti in genere contro i domini esterni di molecole che svolgono diverse funzioni tra cui recettori di fattori di crescita.
 - Rituximab (anti CD20);
 - In combinazione con la chemio nei linfomi
 - Bevacizumab (anti VEGF fattore angiogenetico)
 - in combinazione con la chemio nei tumori del colon retto, mammella e polmone, da solo in quelli del rene
 - Trastuzumab (anti erbB-2)
 - In combinazione con la chemio nei tumori mammella che esprimono erbB2
 - Cetuximab e panitumumab (anti EGFR)
 - In combinazione con la chemio nei tumori colon-retto se non sono presenti mutazioni di K-ras e Raf-1 che causano resistenza

ERB B1, gene normale del EGFR è iperespresso:

80% del ca squamocellulare del polmone, 50% glioblastomi, 80-100% t. testa-collo

ERB B2, HER-2/NEU è amplificato:

25% ca mammella e ovaio, polmone, stomaco e ghiandole salivari



Monoclonali che contrastano l'attività di EGFR

CETUXIMAB

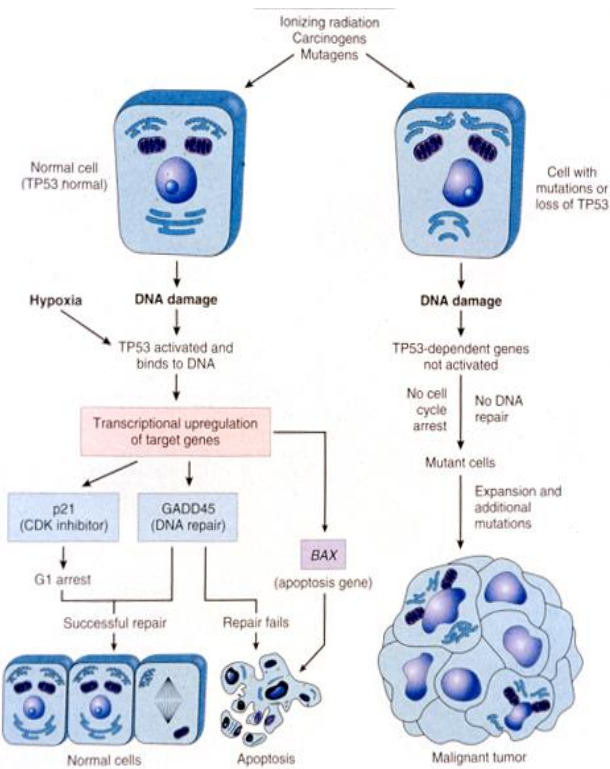
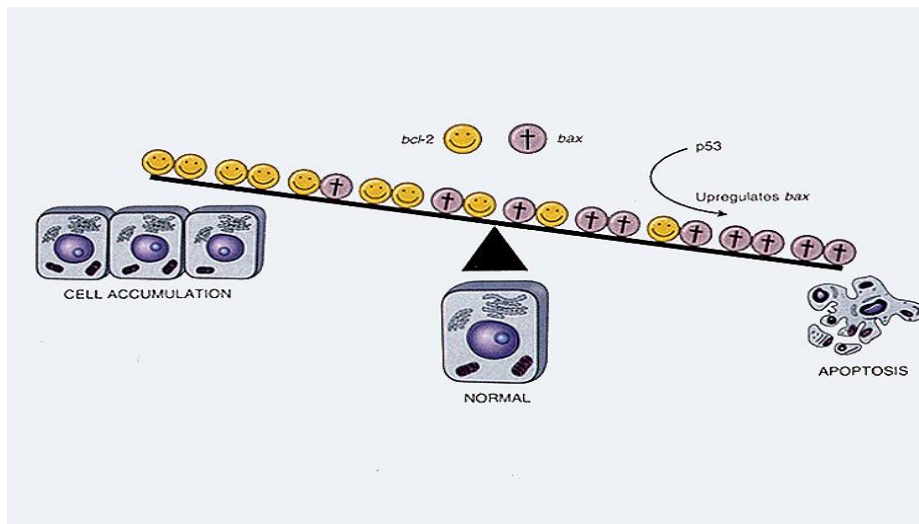
ERLOTINIB
GEFINITIB

■ Figura 24.14 - Struttura del recettore per l'EGF il cui gene è mappato nel braccio corto del cromosoma 7 e del prodotto dell'oncogene v-erb B che è una forma troncata di questo recettore, costituita soltanto dalla sua porzione intracitoplasmatica costitutivamente attivata.

Piccole molecole

- Piccole molecole
 - Imatinib (Inibitore di bcr-abl e c-kit, tirosin chinasi)
 - nella leucemia mieloide cronica, nei GIST
 - Erlonitib e Gefitinib (anti-EGFR)
 - Tumori del polmone
- Piccole molecole multitarget
 - Lapatinib (anti-EGFR e anti-erbB2):
 - Tumori mammella resistenti
 - Sunitinib (anti-VEGF-R1 e R3, PDGFR, c-kit),
 - GIST
 - Sorafenib (anti-VEGF-R2 e R3, PDGFR, c-kit, MAPK, raf-1)
 - epatocarcinoma
 - etc

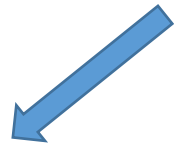
| Farmaco | Marcatore molecolare | Neoplasia | Indicazioni |
|--------------------------|---|-------------------------|--|
| Trastuzumab | HER2 iperespressione/ amplificazione | Carcinoma mammario | T adiuvante/metastatico in combinazione con CT o agenti ormonali o in monoterapia |
| Lapatinib | HER2 iperespressione/amplificazione | Carcinoma mammario | II L - LA/metastatico: Lapatinib + CT Metastatico: Lapatinib + inib aromatasi non eleggibile CT |
| Pertuzumab | HER2 iperespressione/amplificazione | Carcinoma mammario | LA/metastatico: Pertuzumab + trastuzumab +CT |
| Trastuzumab emtasine | HER2 iperespressione/amplificazione | Carcinoma mammario | II linea - LA/metastatico |
| Trastuzumab | HER2 iperespressione/amplificazione | Carcinoma dello stomaco | Metastatico |
| Imatinib | c-Kit (mutazioni) | GIST | Metastatico, adiuvante alto rischio |
| Cetuximab | All RAS (wild type) | Carcinoma colon retto | Metastatico in combinazione con CT Metastatico pretrattato monoterapia |
| Panitumumab | All RAS (wild type) | Carcinoma colon-retto | Metastatico in combinazione con CT Metastatico pretrattato monoterapia |
| Gefitinib | mEGFR | Adenoca. polmone | LA/metastatico |
| Erlotinib | mEGFR | Adenoca. polmone | LA/metastatico |
| Afatinib | mEGFR | Adenoca. polmone | LA/metastatico |
| Osimertinib | mEGFR + T790M | Adenoca. polmone | LA/metastatico pre-trattato con inibitori di EGFR |
| Crizotinib | Traslocazione ALK o ROS1 | Adenoca. polmone | LA/metastatico |
| Alectinib | ALK + | Adenoca. polmone | LA/metastatico; I L e pretrattato con crizotinib |
| Ceritinib | ALK+ | Adenoca. polmone | LA/metastatico II L |
| Vemurafenib | mBRAF (V600E) | Melanoma | Metastatico |
| Dabrafenib | mBRAF (V600E) | Melanoma | Metastatico |
| Dabrafenib +Trametinib | mBRAF (V600E) | Melanoma | Metastatico |
| Vemurafinib+ Cobimetinib | mBRAF (V600E) | Melanoma | |



Mutazioni di p53 sono associate ad una ridotta risposta ai chemioterapici e alla radioterapia

Approcci terapeutici

STRATEGIE DI RIATTIVAZIONE DI p53:



p53 mutato



p53 wild type

Piccole molecole
che ripristinano
la funzione di
p53 mutato

PRIMA-1

Piccola molecola che previene
la degradazione di p53
attraverso MDM2 e riattiva
l'apoptosi in cellule tumorali.

RITA

(Reactivation of p53 and Induction of cell cycle Apoptosis)