

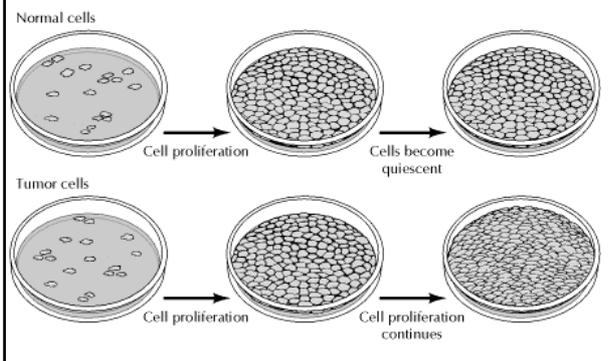
Transformación celular y tumores

- Proto-oncogenes, oncogenes
- Genes supresores
- Control del ciclo celular
- Pasos en el proceso de formación de una célula tumoral
- Cambios genéticos en el desarrollo del carcinoma de colon
 - Influencia del mesénquima en el desarrollo de tumores epiteliales
- Clasificación molecular de los tumores

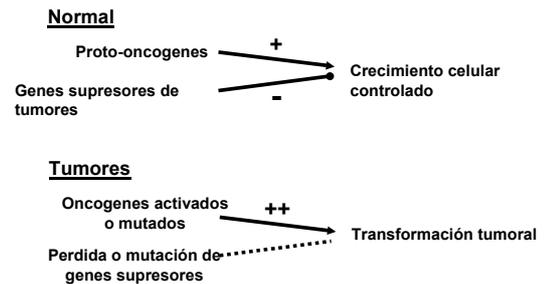
Características de las células en cultivo (paralelo a lo que ocurre in vivo)

- **células Normales primarias**: sobreviven poco tiempo en cultivo (días a semanas)
- **células Inmortalizadas (líneas establecidas)**: inmortalizadas, pero no transformadas
 - dependencia de anclaje (prefieren adhesión a placa de cultivo)
 - dependencia de suero (requieren factores de crecimiento)
 - inhibición por contacto (paran de crecer cuando están a confluencia)
- **células Transformadas** forman tumores cuando se inyectan a animales pero no necesariamente invaden, dan metástasis y matan
 - no necesitan anclaje para dividirse
 - menor dependencia de factores de crecimiento
 - no tienen inhibición por contacto
- **células Tumorales y metastásicas**: completamente transformadas e inyectadas a animales migran, invaden tejidos, dan metástasis y matan al animal

Inhibición por contacto



Genes responsables de la transformación celular



Oncogenes son generalmente dominantes (ganancia de función)

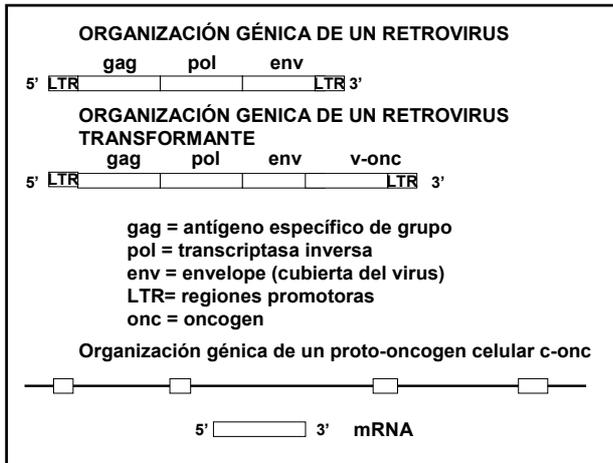
- proto-oncogenes mutados (and "activated")
- proto-oncogenes capturados por retrovirus y mutados en el proceso
- genes virales propios del virus que se comportan como oncogenes

Genes supresores de tumores son recesivos (pérdida de función)

- pérdida de un gen o región cromosómica por delección
- pérdida de la función génica por mutaciones puntuales que inactivan

Virus transformantes

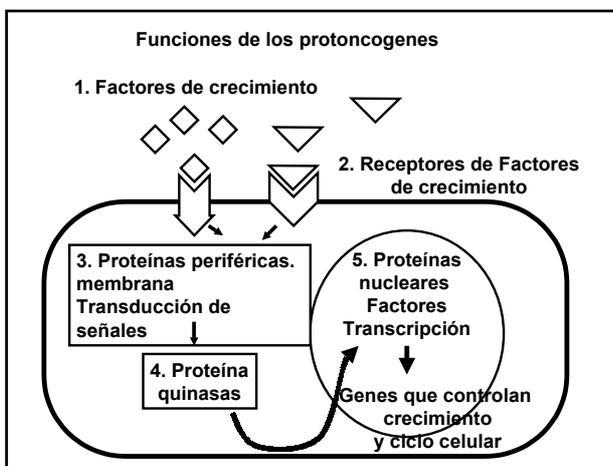
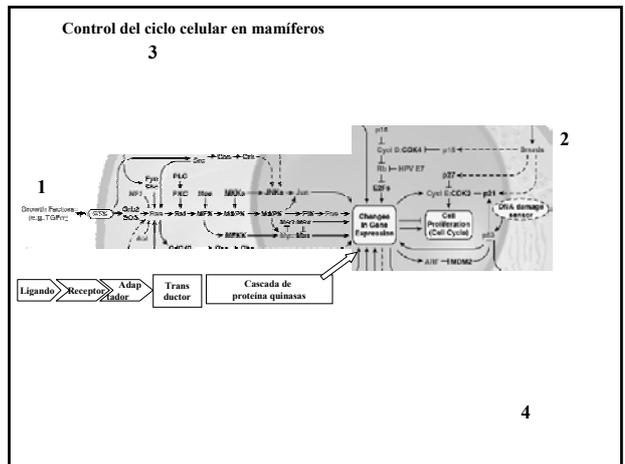
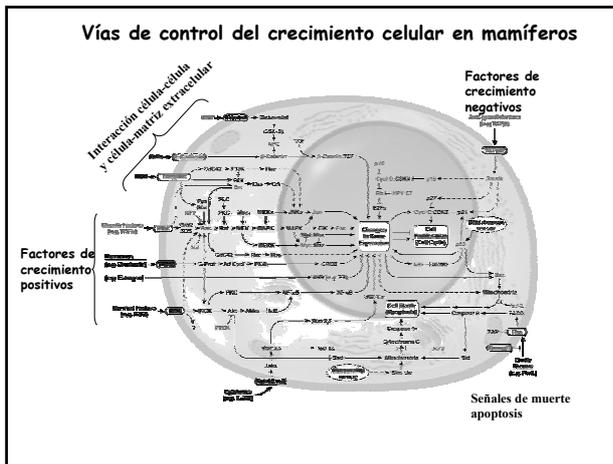
Clase de virus	tipo genoma	Oncogenes
adenovirus	ds DNA	E1A & E1B
papovavirus SV40 (mono)	ds DNA	Antígeno T
Polioma (humano)		
Papilomavirus Humano (HPV) 16 (cervix)	ds DNA	E6 y E7 inactivan p53 y pRb
retrovirus	ss RNA	proto-oncogenes mutados (oncogenes)



Oncogenes virales derivados de genes celulares normales

<u>Retrovirus</u>	<u>oncogen viral</u>	<u>proto-oncogen celular</u>
virus sarcoma de Rous	v-src	c-src (src)
sarcoma de monos	v-sis	c-sis (sis)
Harvey sarcoma murino	v-H-ras	c-H-ras (H-ras)
Kirsten sarcoma murino	v-K-ras	c-K-ras (K-ras)
FBJ osteosarcoma murino	v-fos	c-fos (fos)
mielocitomatosis Aviar	v-myc	c-myc (myc)
virus leucemia Abelson	v-abl	c-abl (abl)
eritroblastosis Aviar	v-erbB	c-erbB (erbB)

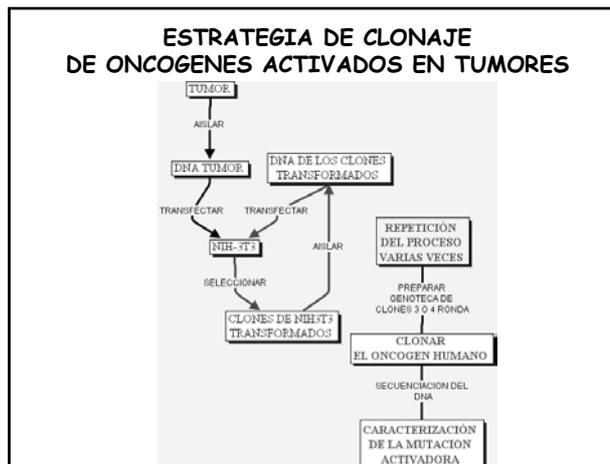
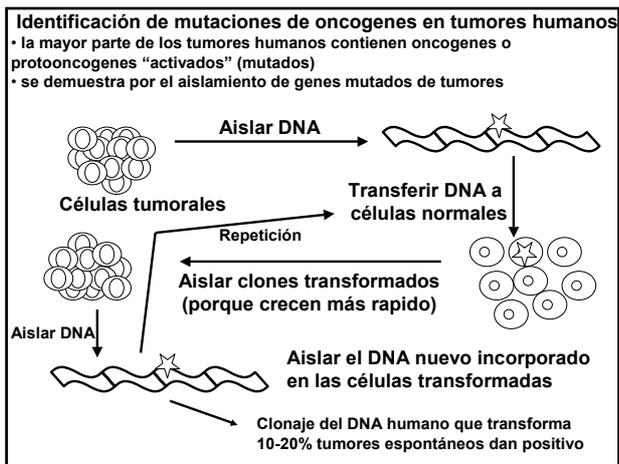
•oncogenes virales son ~80-99% homólogos a los proto-oncogenes
 •oncogenes viral en general son copias de mRNA celular y no tienen intrones



Algunas funciones de proto-oncogenes

<u>Proto-oncogen</u>	<u>función bioquímica</u>
1. Factores de crecimiento	
c-sis	Platelet derived growth factor
2. Receptores de factores de crecimiento	
c-erbB	Epidermal growth factor receptor
3. Transducción de señales	
H-ras	proteína- G pequeña p21
K-ras	proteína-G pequeña p21
4. Proteína quinasas	
c-abl	Proteína quinasa
c-src	Proteína quinasa
MAPK cascadas	Proteína quinasa
5. Proteínas Nucleares	
c-myc	factor de transcripción
c-fos	factor de transcripción
c-jun	factor de transcripción

} AP-1



Activación de proto-oncogenes en tumores humanos

Mecanismos de activación

- mutaciones puntuales
- reordenamientos cromosómicos o translocaciones
- amplificación génicas
- inserción de promotores:

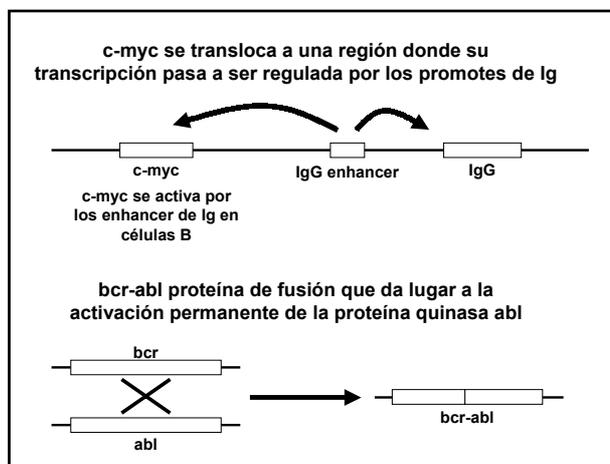
Mutaciones puntuales en la familia de genes ras

gen RAS	amino ácido			Tumor
	12	59	61	
c-ras (H, K, N)	Gly	Ala	Gln	normal
H-ras	Gly	Ala	Leu	carcinoma pulmón
K-ras	Val	Ala	Gln	carcinoma vejiga
	Cys	Ala	Gln	carcinoma pulmón
N-ras	Arg	Ala	Gln	carcinoma pulmón
	Val	Ala	Gln	carcinoma colon
	Gly	Ala	Lys	neuroblastoma
	Gly	Ala	Arg	carcinoma pulmón
				<u>Virus Sarcoma murinos</u>
H-ras	Arg	Thr	Gln	cepa Harvey
K-ras	Ser	Thr	Gln	cepa Kirsten

Reordenamientos cromosómicos y translocaciones

Tumor	Translocación	Proto-oncogen	
Burkitt	t(8;14)	80% de los casos	c-myc ¹
	t(8;22)	15% de los casos	
	t(2;8)	5% de los casos	
Leucemia mieloide crónica	t(9;22)	90-95% de los casos	bcr-abl ²
Leucemia linfocítica aguda	t(9;22)	10-15% de los casos	bcr-abl ²

¹c-myc se transloca al locus de IgG, aumenta expresión
²bcr-abl proteína de fusión bcr-abl, hace que la PTK abl esté permanentemente activa



Amplificación génica

Oncogen	Amplificación	Tumor
c-myc	~20-veces	leucemia y pulmón
N-myc	5-1,000- veces	neuroblastoma retinoblastoma
L-myc	10-20- veces	cáncer pulmón células pequeñas
c-abl	~5- veces	leucemia mieloide crónica
c-myb	5-10- veces	leucemia mieloide aguda carcinoma colon
c-erbB	~30- veces	carcinoma epidermoide
K-ras	4-20- veces 30-60- veces	carcinoma colon carcinoma adrenocortical

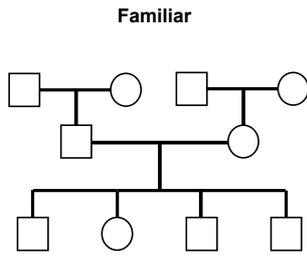
Genes supresores de tumores

Un gen supresor de tumores tiene una importante función en la célula normal, pero pueden inactivarse. La función normal es poner freno a la progresión de una célula en el ciclo celular.

Son por tanto genes que codifican para proteínas que inhiben la maquinaria que controla el ciclo celular.

Su inactivación favorece la proliferación celular

Formas esporádicas y familiares (Mendelianas) del cancer Knudson's two-hit hypothesis



Familiar

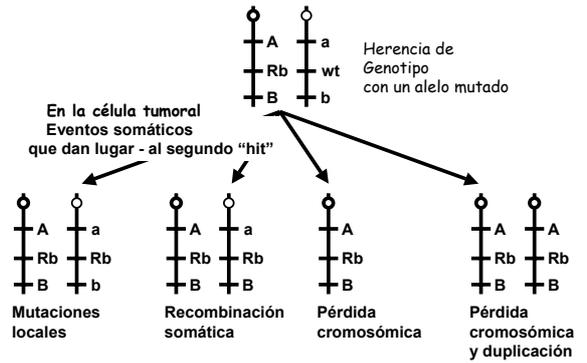
Gen supresor mutado en la línea germinal - heterocigoto para la mutación

Mutación somática del otro alelo

Tumores múltiples bilateral comienzo temprano

- dos mutaciones (dos hits) se requieren para la pérdida de función.
- El primer "hit" se hereda y el segundo "hit" es somático

Mecanismos cromosómicos que pueden dar lugar a la pérdida de función por pérdida de heterocigosis (LOH)



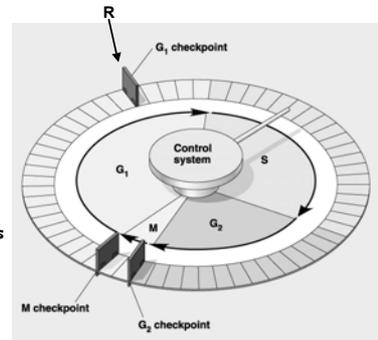
Para entender el mecanismo de acción de los genes supresores

Hay que entender los mecanismos de control del ciclo celular

Ciclo celular

Alternancia de fases.
S ⇒ M. M ⇒ S

Puntos de chequeo: Mecanismos que aseguran la correcta transición y completación de las fases del ciclo celular

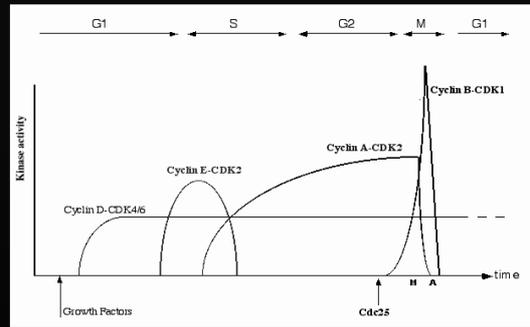


Mecanismos moleculares responsables del control del ciclo: reversibles: fosforilación defosforilación
irreversibles: proteólisis

Controlador Bioquímico del ciclo celular Complejos CDK- Ciclina.

CDK: Proteína Quinasa
Ciclina: Subunidad Reguladora

Cambios en los niveles de actividad de los complejos Cdk-ciclina durante las fases del ciclo

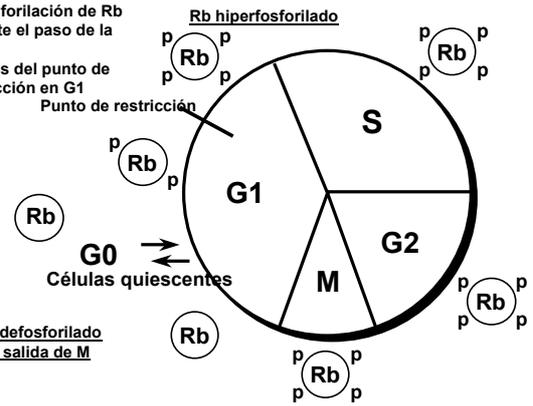


Control de la transición G0 a G1 y paso por el punto de restricción

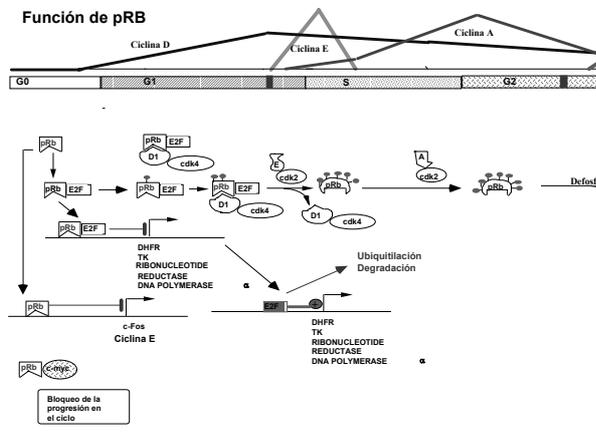
pRb: proteína del retinoblastoma

Cambios en la Fosforilación de Rb durante el ciclo celular

La fosforilación de Rb permite el paso de la célula a través del punto de restricción en G1



Función de pRB



Las familias de los CKI o CDI : (inhibidores de los complejos cdk ciclina)

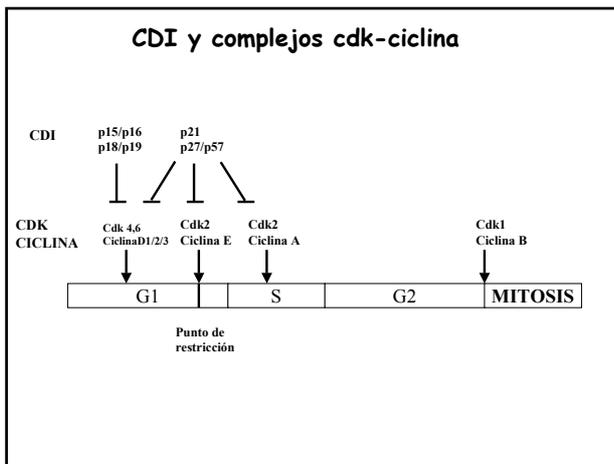
Función dual:
p21 CIP1/WAF1
p27 Kip1
p57 Kip2

Familia de las ankirinas:
p15 INK4b
p16 INK4a
p18 INK4c
p19 INK4d

Interacción con ciclina y con cdk

Interacción con cdk

Interactúan con otras proteínas



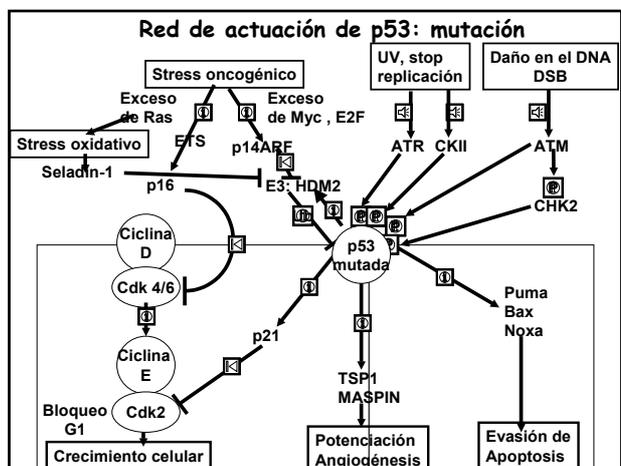
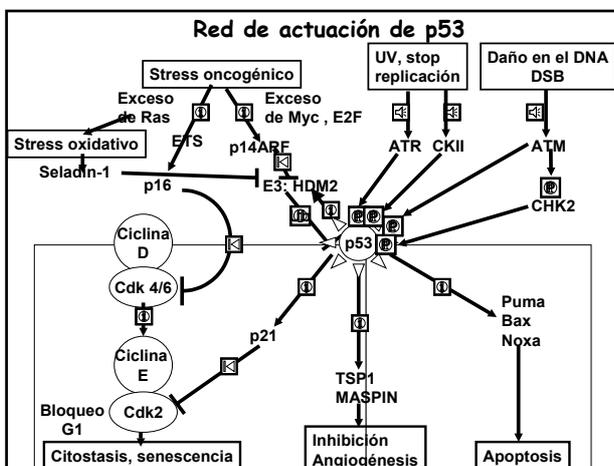
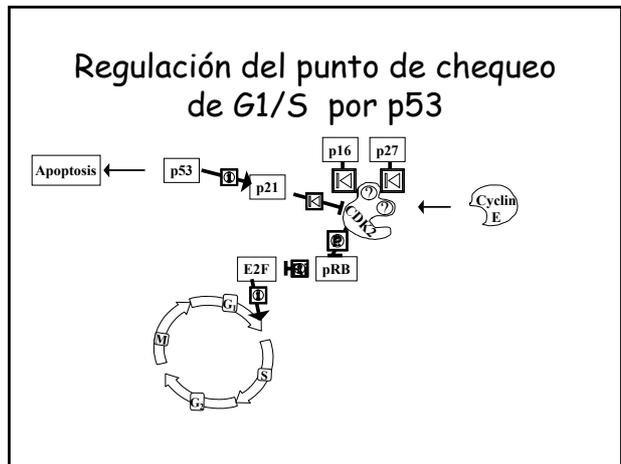
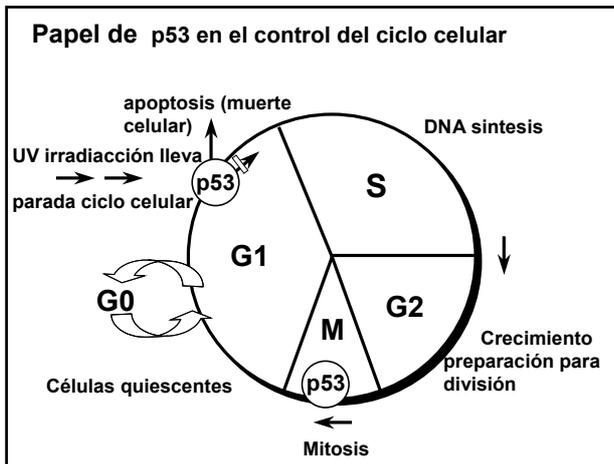
Chequeo por Daño en el DNA

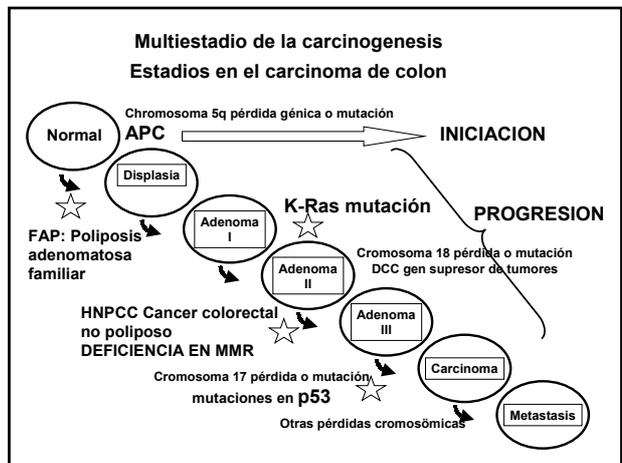
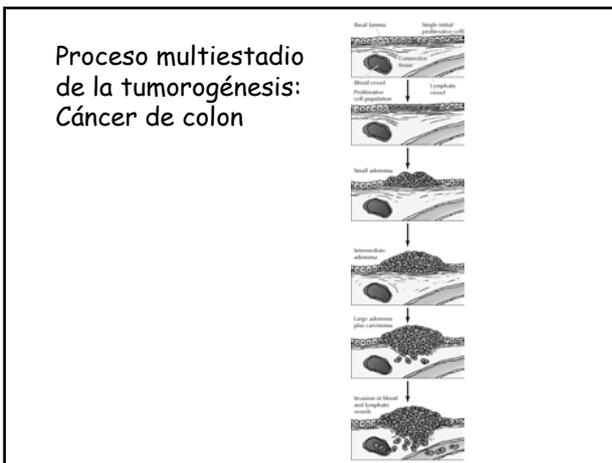
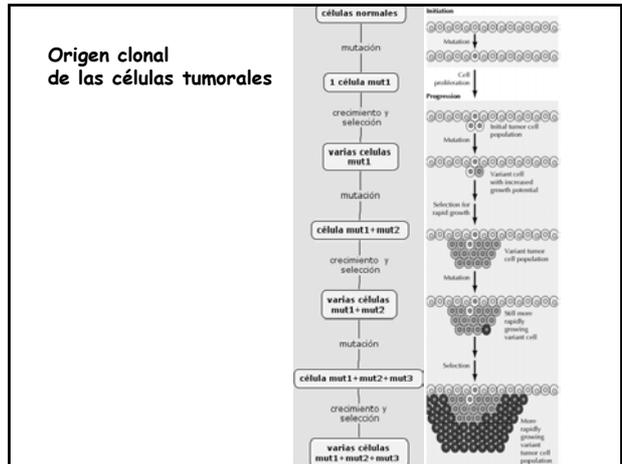
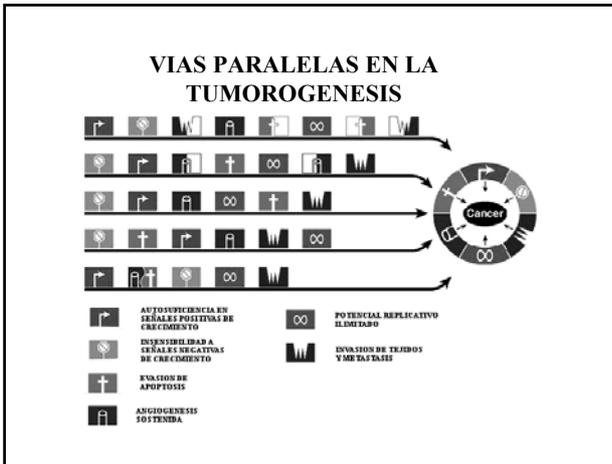
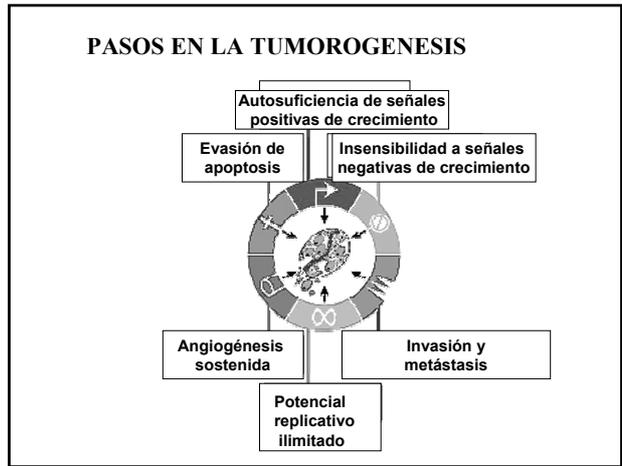
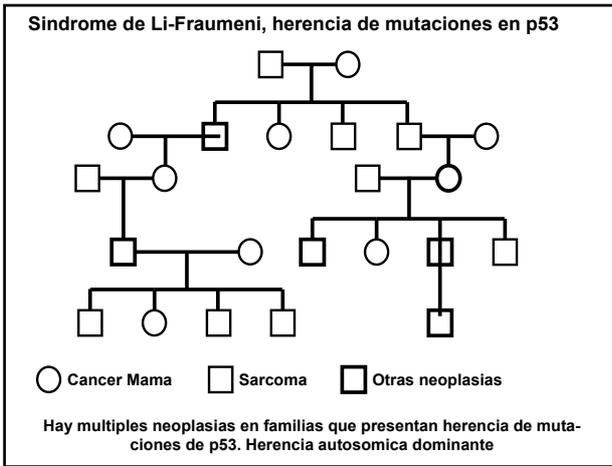
p53

p53 es el "guardian del genoma"

- La proteína p53 es un factor de transcripción que regula el ciclo celular y la reparación del DNA
- El gen de p53 no se expresa (no hay mRNA, ni proteína) en un ciclo celular normal.
- El gen p53 se expresa (se produce mRNA y proteína) cuando se produce un daño en el DNA. Daño genotóxico (ejemplo: luz ultravioleta)

El gen p53 no es esencial

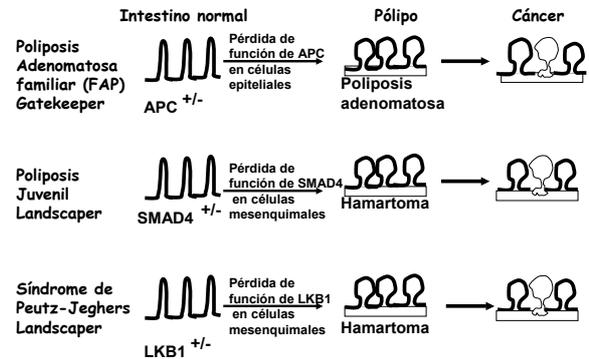




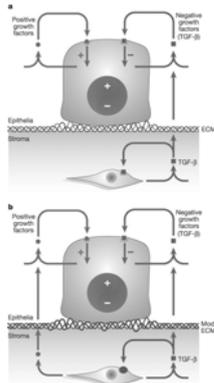
Carcinoma de colon factores de riesgo

Defecto	Prelesión	Riesgo de cáncer colorectal
Esporádico	Adenoma	5%
Cancerberos Gatekeepers FAP, mutación APC	Poliposis	> 95%
Genes cuidadores o vigilantes "caretakers" HNPCC mutaciones en MMR	Adenoma	70%
Genes paisajísticos "Landscape" estroma-epitelio Colitis ulcerosa	Hamartomas	10-20%

Susceptibilidad a cáncer de colon en relación a alteraciones en estroma



Respuesta del epitelio a la acción del estroma



Nature 432, 332 - 337 (18 November 2004); doi

- A) En condiciones normales: los fibroblastos controlan su crecimiento por acción del TGFβ. Y este regula negativamente el crecimiento epitelial, balanceando las señales proliferativas positivas que recibe el epitelio.
- B) Si hay una alteración en los fibroblastos y la señal de TGFβ ya no modula negativamente su crecimiento (mutación en SMAD4) Se produce un cambio fenotípico del fibroblasto secretando más matriz extracelular y produciendo factores positivos de crecimiento que desbalancean las señales que recibe el epitelio, promoviendo su proliferación

Clasificación molecular de los tumores

Metodología: estudios de transcriptoma, "gene profiling". Estudio de los niveles de expresión de todos los genes comparando tejido Normal vs. Tejido Tumoral o diferentes tipos de tumores

Definición de las clases de tumores: Definición de clases previamente no reconocidas

Predicción de clases de tumores: Adscripción de determinadas muestras de tumores a clases previamente reconocidas

¿Por qué la clasificación molecular de tumores?

- Porque cuanto mas precisa sea la clasificación molecular más preciso será el tratamiento
- Porque tumores similares en el curso de la terapia dan respuestas diferentes .
- Para diseñar terapias específicas contra tipos de tumores patogenéticamente distintos y maximizar la efectividad terapéutica.

Ejemplo: ALL y AML

- Diferenciación entre leucemia linfoblástica aguda (ALL) y Leucemia mieloide aguda (AML).
- En la actualidad aplicar el tratamiento de una leucemia mieloide crónica a una linfoblástica aguda da pobres resultados, y al revés.
- No existe una única prueba diagnóstica que diferencie las dos formas de leucemia aguda

Transcriptoma diferencial de leucemias agudas

- 38 muestras de médula ósea de pacientes con AL (27 ALL, 11 AML)
- Preparar mRNAs de todas las muestras
- Hibridar con un array de oligonucleótidos correspondientes a 6817 genes humanos

Establecimiento de los genes predictores

- De todos los genes que se analizaron se encontró que con solo estudiar la expresión de 50 de ellos se podía predecir con 99.99% de fiabilidad si una muestra de médula ósea correspondía a AML o ALL
- Se realizó el test de validación con 34 leucemias y se comprobó que la precisión en la clasificación era de un 100%

Resultados de expresión obtenidos con esos 50 genes predictores

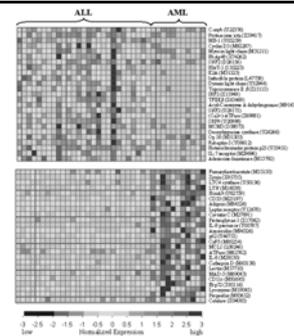
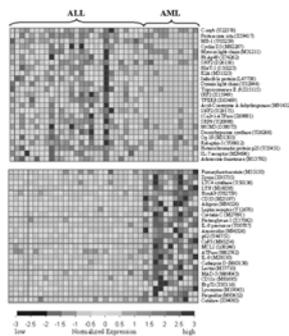
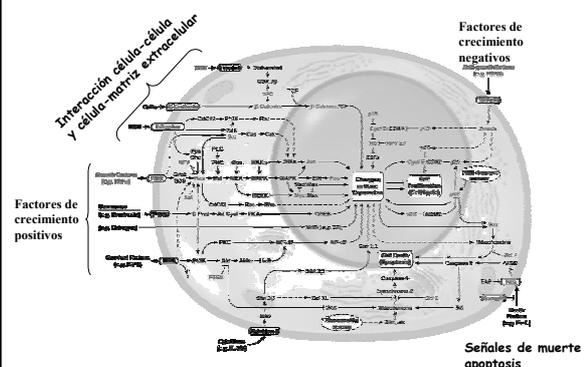


Figure 3b. Genes distinguishing ALL from AML. The 50 genes most highly correlated with the ALL/AML class distinction are shown. Each row corresponds to a gene, with the columns corresponding to expression levels in different samples. Expression levels for each gene are normalized across the samples such that the mean is 0 and the standard deviation is 1. Expression levels greater than the mean are shaded in red, and those below the mean are shaded in blue. The scale indicates standard deviations above or below the mean. The top panel shows genes highly expressed in ALL, the bottom panel shows genes more highly expressed in AML. Note that while these genes as a group appear correlated with class, no single gene is uniformly expressed across the class, illustrating the value of a multi-gene prediction method. Science. 1999 Oct 15;286(5439):531-7.

Aplicaciones de perfiles de expresión a diferentes tipos de tumores

- Definición de subtipos de cáncer de prostata
- Cáncer de mama y definición de perfiles de expresión de tumores con capacidad favorecida de metástasis.
- Cáncer de Páncreas.
- Otros muchos tipos de tumores

Vías de control del crecimiento celular en mamíferos



**Premios
Principe
de Asturias
de Ciencia
2004
Vinieron
y se
fueron**

