

Αδενοϊός Τροποποιημένος Μέσω Γενετικής Μηχανικής που Θανατώνει Επιλεκτικά τα Καρκινικά Κύτταρα: Παρουσίαση Ενός Πολλά Υποσχόμενου Συστήματος Γονιδιακής Θεραπείας

Βασίλειος Κ. Ζουμπουρλής, Σύλβια Σολακίδη
Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Περίληψη

Το άρθρο αυτό αναφέρεται σε ένα σύστημα γονιδιακής θεραπείας, που δίνει ελπίδες όσον αφορά τη δυνατότητα της Ιατρικής επιστήμης να στοχεύσει συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα και να τα θανατώσει, χωρίς να επηρεάζονται τα φυσιολογικά κύτταρα. Η δημιουργία, από την ONYX Pharmaceuticals, ενός ιού που έχει τροποποιηθεί μέσω γενετικής μηχανικής, με στόχο τη χρήση του στη θεραπεία ασθενών με καρκίνο, είναι ήδη πραγματικότητα. Επίσης, έχουν αρχίσει κλινικές δοκιμές για την πιθανή χρήση του ιού αυτού στη θεραπεία ασθενών με νεοπλασματική νόσο. Η παρούσα ανασκόπηση βασίζεται στη σχετικά πρόσφατη έρευνα που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό "Science" (274: 373-6, 1996), με τίτλο "An Adenovirus Mutant that Replicates Selectively in p53-Deficient Human Tumor Cells". Το άρθρο του "Science" είναι αρκετά τεχνικό, γι' αυτό παρουσιάζουμε εδώ στοιχεία για το θέμα σε λιγότερο τεχνική γλώσσα, με στόχο να δοθεί απάντηση σε δύο βασικά ερωτήματα: (α) γιατί έχει υιοθετηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος και (β) γιατί ο τροποποιημένος αδενοϊός δίνει ελπίδες για μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Για να εξηγήσουμε αυτές τις πληροφορίες, θα αναφερθούμε πρώτα σε βασικές γνώσεις που αφορούν τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την πρωτεΐνη p53, και έπειτα θα αναφερθούμε στις λεπτομέρειες της δράσης του γενετικά τροποποιημένου αδενοϊού. Ελπίζουμε ότι οι πληροφορίες που παραθέτουμε, θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση του συγκεκριμένου συστήματος γονιδιακής θεραπείας, που έχει προκαλέσει το ιδιαίτερο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

Λέξεις Ξυρετηγίου: καρκίνος, p53, αδενοϊός, E1A, E1B, γονιδιακή θεραπεία, κλινικές δοκιμές.

Εισαγωγικά στοιχεία για την πρωτεΐνη p53

Τα κύτταρα και η κυτταρική διαίρεση

Σε ένα πολυκύτταρο οργανισμό, η δυνατότητα επιβίωσης σαν κυτταρικό σύνολο επιβάλλει τη δημιουργία νέων κυττάρων, με τον ίδιο τουλάχιστον ρυθμό με αυτόν που τα κύτταρα πεθαίνουν. Για να γίνει όμως αυτό, πραγματοποιείται πρώτα αύξηση των συστατικών που θα μοιραστούν στα δύο κύτταρα, στην περίοδο του κυτταρικού κύκλου που ονομάζεται μεσόφαση και διακρίνεται στις φάσεις G₁, S (φάση σύν-

θεσης DNA) και G₂. Ακολουθεί η διαδικασία της μίτωσης (φάση M).

Εκτός από κάποια κύτταρα του δέρματος, τα κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών και ορισμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα του ανθρώπου είναι, συνήθως, σε κατάσταση μη διαίρεσης. Επιπλέον, ακόμη και όταν προκαλείται με ειδικό τρόπο η διαίρεση των κυττάρων (όπως συμβαίνει στα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που μας βοηθούν να αντιμετωπίσουμε τις λοιμώξεις), ο αριθμός των επιτρεπόμενων κυτταρικών διαιρέσεων προγραμματίζεται εκ των προτέρων και είναι περιορισμένος.

Η ρύθμιση του ευκαρυωτικού κυτταρικού κύκλου είναι κρίσιμη για τη φυσιολογική ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών. Η ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης περιλαμβάνει δύο επικαλυπτόμενα συστήματα. Αρχικά, απαιτούνται μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έναρξη της σύνθεσης του DNA και την έναρξη της μίτωσης. Ακολουθούν μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη μεταφορά των κυτταρικών πληθυσμών στη φάση του πολλαπλασιασμού ή την απομάκρυνσή τους από αυτή. Τα κύτταρα απομακρύνονται από τον μωτωτικό κύκλο κατά τη φάση G₁, αντιδρώντας σε αναπτυσσικά σήματα, και διαφοροποιούνται αφού περάσουν από ένα ενδιάμεσο στάδιο, το G₀. Τα κύτταρα του σταδίου G₀ μπορούν να επιστρέψουν στον μωτωτικό κύκλο μετά από ενεργοποίηση από ογκογονίδια και αυξητικούς παράγοντες. Οι κύριοι ρυθμιστές των γεγονότων αυτών είναι ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνικών κινασών, που ρυθμίζουν την ενεργότητα πρωτεϊνών (όπως της p53) μέσω φωσφορύλιωσης αυτών.

Η απώλεια του ρυθμιστικού ελέγχου οδηγεί στην κατάσταση που καλούμε "καρκίνο". Αν ένα μόνο από τα πλέον των 65 τρισεκατομμυρίων κυττάρων του ανθρώπινου σώματος χάσει τη δυνατότητα ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης, αυτή η απώλεια ρύθμισης μπορεί τελικά να οδηγήσει στον σχηματισμό ενός συμπαγούς όγκου ή σε πολλά κύτταρα που δεν συσσωματώνονται, αλλά διασκορπίζονται σε όλο το σώμα (μεταστατικός φαινότυπος).

Συμμετοχή της πρωτεΐνης p53 στο σύστημα ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης

Ενα από τα σημαντικότερα συστατικά στοιχεία του συστήματος ρύθμισης της διαίρεσης είναι η πρω-

τεΐνη p53 (πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 53kDa).

Η λειτουργία της πρωτεΐνης p53 στο κύτταρο είναι σύνθετη. Πρόκειται για έναν ισχυρό μεταγραφικό παράγοντα, που όταν ενεργοποιηθεί, καταστέλλει τη μεταγραφή μίας ομάδας γονιδίων, που σχετίζονται με την επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης, και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου.

Ενα ορισμένο ποσό λειτουργικής p53 πρέπει να είναι διαθέσιμο μέσα σε κάθε κύτταρο, ώστε να διατηρεί την κατάσταση καταστολής της κυτταρικής διαίρεσης. Παρουσία της p53, ένα κύτταρο εισάγεται στη φάση G₀ του κυτταρικού κύκλου ή πραγματοποιείται άρση της φάσης G₁ στην κατάλληλη χρονική στιγμή.

Συμμετοχή της πρωτεΐνης p53 στη διαδικασία της απόπτωσης

Στην πρωτεΐνη p53 έχει αποδοθεί ρόλος «φύλακα» του γονιδιώματος: όταν το DNA υποστεί κάποια αλλοίωση (που μπορεί να οφείλεται στην έκθεση των κυττάρων στην υπεριώδη ακτινοβολία ή σε ορισμένες χημικές ουσίες, στο ότι το DNA του κυττάρου διαταράσσεται από έναν DNA-ιό ή στο ότι ένα γεγονός προκαλεί κάποιου είδους παρεμβολή στο DNA, πράγμα που οδηγεί σε ακατάλληλα σήματα ενεργοποίησης των κυττάρων), επάγεται αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης p53, η οποία με τη σειρά της επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₁, ώστε να επιτραπεί η επιδιόρθωση του DNA (από έναν αριθμό διαφορετικών ενζύμων) πριν από τον διπλασιασμό του γονιδιώματος. Με τον τρόπο αυτό η δράση της p53 εμποδίζει τη μεταφορά αλλοιωμένης γενετικής πληροφορίας στην επόμενη κυτταρική γενιά. Αν η αλλοίωση που έχει υποστεί το κύτταρο είναι ανεπανόρθωτη, υπάρχουν κυτταρικά υλικά που αλληλεπιδρούν και δίνουν σήμα στην πρωτεΐνη p53, η οποία επάγει ένα μηχανισμό κυτταρικής αυτοκτονίας, που ονομάζεται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση. Ο οργανισμός προστατεύεται, συνεπώς, από τον πολλαπλασιασμό κυττάρων που έχουν υποστεί αλλοιώσεις.

Η απόπτωση είναι μία μορφή ενεργο-εξαρτώμενου κυτταρικού θανάτου, που λαμβάνει χώρα σε απόκριση κάποιων ερεθισμάτων. Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από μία σειρά μορφολογικών και βιοχημικών γεγονότων, που τη διακρίνουν από τον κυτταρικό θά-

Παρεμβάσεις σε ευρύτερα περιβαλλοντικά θέματα

* Παρεμβάσεις σε θέματα που σχετίζονται με τον αγροτικό τομέα και τον τουρισμό, καθώς και σε ποικίλα ζητήματα με σοβαρές περιβαλλοντικές διαστάσεις (Ολυμπιάδα 2004, αναθεώρηση του άρθρου 24 του Συντάγματος, Διαρθρωτικά Ταμεία, εκτροπή Αχελώου κ.ά.).

Προτεραιότητες και δράσεις

Στο ξεκίνημα του νέου αιώνα συνεχίζονται οι δράσεις του WWF Ελλάς στην Πρέσπα, τη Δαδιά, τη Ζάκυνθο, αλλά και στο ευρύ πεδίο της προστασίας των δασών της χώρας μας. Παράλληλα, η Οργάνωση θέτει σε εφαρμογή και μία σειρά από καινούριες δράσεις, που είναι ιδιαίτερα σημαντικές βάσει της στρατηγικής της:

- * Προστασία των οικοσυστημάτων του Αιγαίου σε επιλεγμένα μικρά νησιά, με έμφαση στη διατήρηση της μικρής κλίμακας παράκτιας αλιείας.
 - * Πιλοτικό πρόγραμμα διαχείρισης υδατικών πόρων σε χειμάρρους της Κύπρου, με δυνατότητες εφαρμογής στα Ελληνικά νησιά.
 - * Χορήγηση υποτροφιών για εφαρμοσμένη περιβαλλοντική έρευνα.
 - * Εκπόνηση προγράμματος περιβαλλοντικής εκπαίδευσης, ώστε οι άχαρες σχολικές αυλές να μετατραπούν σε φιλόξετους χώρους με μεσογειακά φυτά.
 - * Ίδρυση και λειτουργία κέντρου ενημέρωσης στο Μικρό Πάπιγκο, με έμφαση στη σχέση ανθρώπου και φύσης στην Πίνδο.
 - * Μελέτη της εξάπλωσης του τσακαλιού (*Canis aureus*) στην Ελλάδα, με στόχο την προώθηση τεκμηριωμένων μέτρων προστασίας του είδους.
 - * Μελέτη των δελφινιών σε συγκεκριμένες περιοχές στην Ελλάδα, με στόχο τη διατύπωση κατάλληλων μέτρων προστασίας.
- Το πρόγραμμα του WWF Ελλάς στοχεύει:
- (α) στη συλλογή πληροφοριών που θα επιτρέψουν την πληρέστερη γνώση σχετικά με τα δελφίνια –στοιχείο απαραίτητο για την προώθηση μέτρων προστασίας τους (β) στην ευαισθητοποίηση του κοινού σε ό,τι αφορά την οικολογική σημασία των δελφινιών και την ανάγκη προστασίας τους.



Αποψη της Πρέσπας.

Γίνε Συμμέτοχος στη Λύση

Κανένα από τα προγράμματα του WWF Ελλάς, όπως και καμιά του επιτυχία, δεν θα είχαν πραγματοποιηθεί χωρίς τη γενναιοδωρία των μελών, των εθελοντών και των υποστηρικτών του. Η δική τους υποστήριξη καθορίζει την ικανότητα της Οργάνωσης για δράση.

Το τι θα συμβεί αύριο στην Ελληνική γη –σε όλους μας– εξαρτάται από τον καθένα μας. Γίνετε λοιπόν και εσείς συμμετοχος στη λύση.

Γίνετε μέλος του WWF Ελλάς.

Ως μέλος της Οργάνωσης θα λαμβάνετε δωρεάν το τριμηνιαίο περιοδικό *Το Πάντα*, θα ενημερώνεστε για κάθε εξέλιξη των δράσεων που εσείς στηρίζετε, και θα μπορείτε να συμμετέχετε στις εθελοντικές ομάδες που προσφέρουν πολύτιμη βοήθεια στο γραφείο και το πεδίο. Θα γίνετε ενεργό μέλος στην προστασία της Ελληνικής φύσης.

Απλώς συμπληρώστε και στείλτε το έντυπο εγγραφής μέλους, που θα παραλάβετε από τα γραφεία μας, μαζί με το χρηματικό ποσό της επιλογής σας. Μικρή ή μεγάλη, κάθε δωρεά είναι πολύτιμη. Πολυτιμότερη, όμως, είναι η ίδια η συμμετοχή σας στο WWF Ελλάς. Γιατί η συμβολή στη διατήρηση της Γης, για τις επόμενες γενιές, είναι σίγουρα η μεγαλύτερη ανταμοιβή για όλους μας.

Οι κύριες δράσεις του προγράμματος είναι οι εξής:

- * Εκπαίδευση νέων ερευνητών, οι οποίοι θα αποτελέσουν τον πυρήνα για την ομάδα του προγράμματος στο πεδίο.
- * Έρευνα πεδίου σε επιλεγμένες περιοχές της Ελλάδας για τη συλλογή επαρκών στοιχείων και τη βελτίωση των γνώσεών μας σχετικά με τη βιολογία, τον πληθυσμό, τη γεωγραφική κατανομή και την ηθολογία των δελφινιών. Τα αποτελέσματα της έρευνας, καθώς και το φωτογραφικό υλικό που θα συλλεχθεί, θα παρουσιαστούν στο κοινό.
- * Δημιουργία βάσης δεδομένων με επιστημονικά στοιχεία για τα δελφίνια και τις πιο σημαντικές γι' αυτά περιοχές στην Ελλάδα.
- * Εκδοση ενημερωτικού υλικού, ώστε όλοι οι ενδιαφερόμενοι να μπορέσουν να συμμετάσχουν στην παρατήρηση δελφινιών.

Επιτεύγματα

Χελώνα καρέτα. Η πρωτοβουλία του WWF Ελλάς για την αγορά και διαχείριση της έκτασης που περιβάλλει τα Σεκάνια, στη Ζάκυνθο, εξασφάλισε την αποτελεσματική προστασία της σημαντικότερης παραλίας ωτοκίας και συνέβαλε στην ίδρυση του Εθνικού Θαλάσσιου Πάρκου Ζακύνθου (Δεκέμβριος 1999).

Υγρότοποι. Η δημιουργία του Συστήματος Ταχείας Παρέμβασης βοήθησε στην αποτροπή της υποβάθμισης σημαντικών Ελληνικών

υγρότοπων (δέλτα Αξιού, Εβρου και Λουδία, Αμβρακικός κόλπος κ.ά.).

Εκστρατεία «Δάση για πάντα». Επειτα από αίτημα του WWF Ελλάς, το οποίο υποστηρίχτηκε με υπογραφές χιλιάδων πολιτών, το κράτος ανακοίνωσε την απόφαση να συμπεριληφθούν 15 εκατ. στρέμματα χορτολιβαδικών εκτάσεων στο Εθνικό Κτηματολόγιο (Ιούλιος 1999).

Δαδιά. Η πολύχρονη και συστηματική δράση του WWF Ελλάς στο δάσος της Δαδιάς έχει εξασφαλίσει ένα σίγουρο καταφύγιο για δεκάδες είδη αρπακτικών πουλιών, προωθώντας παράλληλα την ήπια οικοτουριστική ανάπτυξη της περιοχής.

Πρέσπα. Η δραστηριοποίηση του WWF Ελλάς, σε συνεργασία με την Εταιρία Προστασίας Πρεσπών (ΕΠΠ), οδήγησε στην ανακήρυξη του «Πάρκου Πρεσπών», της πρώτης διασυνοριακής προστατευόμενης περιοχής στα Βαλκάνια (Φεβρουάριος 2000). Η ίδρυση του Πάρκου Πρεσπών προσφέρθηκε από τις τρεις κυβερνήσεις των ομόρων χωρών, ως "Δώρο στη Γη", στο πλαίσιο της παγκόσμιας εκστρατείας του WWF "Ζωντανός Πλανήτης". Η ΕΠΠ και το WWF Ελλάς, προτείνουν τρεις βασικούς στόχους, για τους οποίους θα ασκηθεί πίεση και προσφορά βοήθειας από τους αρμόδιους φορείς των τριών χωρών:

1. Διασφάλιση της προστασίας της οικολογικής αξίας και της βιοποικιλότητας (σε επίπεδο γενετικού υλικού, ειδών, οικοτόπων και φυσικών λειτουργιών) της Πρέσπας, μέσω της συνετής διαχείρισης του ύδατος και της εφαρμογής ενός κοινού συστήματος παρακολούθησης για τη σαφή εκτίμηση της κατάστασης του περιβάλλοντος και συγκεκριμένων ανθρώπινων δραστηριοτήτων.

2. Προώθηση, αλλά και έλεγχος της συνετής χρήσης και αιφορικής ανάπτυξης των φυσικών πόρων και των ανθρώπινων δραστηριοτήτων, όπως για παράδειγμα είναι η ανάπτυξη βιώσιμης γεωργίας και κτηνοτροφίας χαμηλής έντασης, η διαχείριση των αποβλήτων, η βελτίωση των βασικών υποδομών επικοινωνιών και μεταφορών και η αναβάθμιση της προσφερόμενης ιατρικής περίθαλψης.

3. Διατήρηση και ανάδειξη της πολιτιστικής και ιστορικής σημασίας της Πρέσπας ως σημείου ανταλλαγής ιδεών και εμπειριών ανάμεσα σε τρεις πολιτισμούς και παραδόσεις,

νατο που ακολουθεί την υποξία. Πρόκειται για μία διαδικασία αυτοκαταστροφής του κυττάρου με συγκεκριμένο πρόγραμμα πρωτεόλυσης και διάσπασης των νουκλεϊνικών οξέων, που δεν χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη αντίδραση κυτταρικής φλεγμονής, όπως συμβαίνει με τον υποξικό κυτταρικό θάνατο (π.χ. στο έμφραγμα του μυοκαρδίου), γιατί το περιεχόμενο του εσωτερικού του κυττάρου δεν απελευθερώνεται ποτέ στον περιβάλλοντα ιστό.

Μία ποικιλία ερεθισμάτων, όπως είναι η ακτινοβολία, η χημειοθεραπεία, οι ιικές λοιμώξεις (π.χ. η λοίμωξη από αδενοϊό), η απομάκρυνση αυξητικών παραγόντων ή ορμονών και η ανοσολογική απάντηση των λεμφοκυττάρων, μπορούν να προκαλέσουν την έναρξη αυτού του προγράμματος κυτταρικού θανάτου.

Η απόπτωση είναι μία απάντηση στον κυτταρικό τραυματισμό και φαίνεται ότι αποτέλεσε χαρακτηριστικό της εξέλιξης των πολυκύτταρων οργανισμών, καθώς η θυσία των κατεστραμμένων κυττάρων έχει συνέπεις περισσότερο ανεκτές από τον οργανισμό, σε σχέση με τη διατήρηση αυτών των κυττάρων.

Επιπτώσεις της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 στη λειτουργία του κυττάρου

Από τα προαναφερθέντα προκύπτει, ότι η απόλυτη λειτουργία της p53, λόγω μεταλλαγών που προκαλούν τροποποίηση ή αδρανοποίηση της πρωτεΐνης, είναι αιτία δημιουργίας νεοπλασμάτων. Στην πρωτεΐνη p53 αποδίδεται ρόλος ογκοκαταστολέα. Η απουσία δράσης της p53 οδηγεί στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₁ ή στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται κυτταρική διάτρηση (αν αυτή επαχθεί από φυσιολογικές αιτίες ή από αλλοιώσεις του DNA) παρά την παρουσία αλλοιώσεων, και να προκύψουν κυτταρικές γενεές με σημειακές ή χρομοσωμικές μεταλλαγές, που επίσης δεν είναι σε θέση να ρυθμίσουν την κυτταρική διάτρηση ή να οδηγηθούν στην απόπτωση.

Το γονίδιο p53 έχει βρεθεί μεταλλαγμένο σε μεγάλη ποικιλία νεοπλασμάτων του ανθρώπου. Υπολογίζεται ότι το 50% των γνωστών νεοπλασμάτων διαθέτει δυσλειτουργική πρωτεΐνη p53, όπως το σύνδρομο Li-Fraumeni, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, το οστεογενές σάρκωμα, το ραβδομυοσάρκωμα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του εγκεφάλου, του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστης, του πλακώδους επιθηλίου, του τραχήλου της μήτρας, του μαστού, η λευχαιμία και τα λεμφώματα.

Παράδειγμα κυττάρων που δεν παρουσιάζουν αλλοιώσεις και ρυθμίζονται από την πρωτεΐνη p53

Αν ένας κυτταρικός τύπος ενεργοποιείται από φυσιολογικά αίτια με αποτέλεσμα να διαειρείται, η ρύθμιση της κυτταρικής διάτρησης από την p53 παροδικά ελέγχεται (ελέγχεται όσον αφορά τον χρόνο) και επανεμφανίζεται μόνο μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, αφού έχει επιτραπεί ένας αριθμός κυτταρικών διατρέσεων. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα κύτταρα που παράγονται κάθε ημέρα στον μυελό

των οστών και εξελίσσονται προς κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος (ερυθροκύτταρα, λεμφοκύτταρα και άλλα είδη κυττάρων). Για παράδειγμα, παράγονται περίπου 2 δισεκατομμύρια ουδετερόφιλα την ημέρα, που προκύπτουν από τις οδούς ωρίμανσης και κυτταρικής διάτρησης λόγω κάποιων επαγωγικών σημάτων που μοιάζουν προς αντίστοιχα ορμονικά. Όταν ένα ώριμο κύτταρο (π.χ. ένα λεμφοκύτταρο) ενεργοποιείται προς διάτρηση από φυσιολογικές αιτίες (όπως σε απάντηση σε ένα μολυσματικό παράγοντα), εφαρμόζονται αυτοί οι ίδιοι χρονικοί περιορισμοί.

Αν ένα κύτταρο υποβάλλεται στον κατάλληλο αριθμό διατρέσεων και φτάνει σε ένα ορισμένο στάδιο, η p53 συσσωρεύεται και η διάτρηση σταματά. Μερικές φορές, ανάλογα με το είδος του κυττάρου, με τη δράση της p53 και άλλων κυτταρικών συστατικών, το κύτταρο εισάγεται σε μία διαφορετική κατάσταση και οδηγείται σε απόπτωση.

Σύστημα γονιδιακής θεραπείας με βάση τον αδενοϊό

Προσπάθειες θεραπευτικού χειρισμού του συστήματος της πρωτεΐνης p53

Λόγω του κεντρικού ρόλου της πρωτεΐνης p53 στις νεοπλασματικές διεργασίες, έχουν γίνει προσπάθειες ρύθμισης της ενεργότητάς της, μέσω παραγόντων ή φαρμάκων, που μπορούν *in vivo* να αντικαθιστούν ή να τροποποιούν τη δομή και τη λειτουργία της μεταλλαγμένης p53.

Πρόσφατα, οι προσπάθειες αυτές άρχισαν να έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Εδώ ανήκουν και οι προσπάθειες στόχευσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53, σε δοκιμασίες, που οδηγούν στην εκλεκτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Μία τέτοια προσέγγιση είναι και η στόχευση καρκινικών κυττάρων, που περιέχουν υψηλά επίπεδα μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 ή στερούνται αυτής της πρωτεΐνης, με έναν υβριδικό αδενοϊό τύπου 5, που ονομάζεται ONYX-015 (CI-1042).

Πλεονεκτήματα της χρήσης του αδενοϊού σε συστήματα γονιδιακής θεραπείας

Ο αδενοϊός φυσικού τύπου, συνήθως, προκαλεί ήπιες ασθένειες, όπως το κοινό κρυολόγημα. Επιπλέον, οι ερευνητές μπορούν να προβλέψουν τη συμπεριφορά του ιού στον ανθρώπινο οργανισμό, γιατί έχει χαρακτηριστεί πλήρως η μοριακή του δομή. Περιέχει γονιδίωμα που αποτελείται από μόρια DNA, που περιβάλλονται από πρωτεϊνικό καψίδιο, και στα οποία είναι δυνατή η εισαγωγή γονιδίων που προσδίδουν επιθυμητές ιδιότητες. Τέλος, ο ιός δεν παρουσιάζει υψηλή μεταλλαξιμότητα, όπως συμβαίνει με τους ρετροϊούς.

Κύκλος ζωής του αδενοϊού φυσικού τύπου

Ο ανθρώπινος αδενοϊός μολύνει, φυσιολογικά, τα κύτταρα που δεν βρίσκονται σε κατάσταση διαίρεσης. Αλλά ο τύπος του ιού που φυσιολογικά απαντάται στο περιβάλλον, μπορεί επίσης να μολύνει τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση διαίρεσης (φυσιολογικά ή καρκινικά κύτταρα).

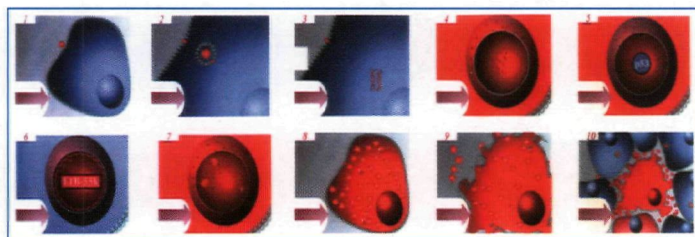
ταρα που βρίσκονται σε κατάσταση διαίρεσης (φυσιολογικά ή καρκινικά κύτταρα).

Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται, σχηματικά, ο τρόπος με τον οποίο ο αδενοϊός φυσικού τύπου μολύνει ένα φυσιολογικό κύτταρο του ανθρώπου: Ο ιός προσεγγίζει το κύτταρο και προσδένεται στους πρωτεϊνικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης (1). Οι υποδοχείς αυτοί εντοπίζονται σε μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών κυττάρων (π.χ. στα κύτταρα που επενδύουν την αναπνευστική οδό), αλλά και καρκινικών (π.χ. στα κύτταρα νεοπλασμάτων της κεφαλής και του τραχήλου, των νεφρών, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών και των πνευμόνων). Στη συνέχεια, το κύτταρο περιβάλλει τον ιό με τη μεμβράνη του (2), ο ιός αποβάλλει το πρωτεϊνικό του καψίδιο, διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, που τον περιβάλλει, και απελευθερώνει το ικό DNA (3), που οδηγείται στον πυρήνα του κυττάρου (4).

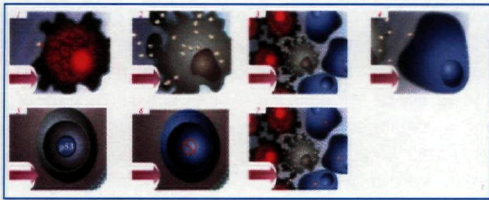
Το γενετικό υλικό του ιού ενεργοποιείται. Δύο συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές του DNA ενεργοποιούνται αμέσως: πρόκειται για τις *elA* και *elB*. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί στη σύνθεση δύο διαφορετικών ομάδων ικών πρωτεϊνών, τις E1A και E1B. Τα δύο κυριότερα προϊόντα της γονιδιακής περιοχής *elA*, που είναι τα πρώτα ικά προϊόντα που συντίθενται κατά τον λυτικό κύκλο, είναι οι πρωτεΐνες με 289 και 243 αμινοξικά κατάλοιπα αντίστοιχα. Τα προϊόντα της γονιδιακής περιοχής *elB* είναι δύο πρωτεΐνες μοριακού βάρους 55kDa και 19kDa, που ονομάζονται E1B-55K και E1B-19K, αντίστοιχα.

Κατά τη διάρκεια του λυτικού κύκλου, μία από τις πρωτεΐνες E1A ενεργοποιεί τη μεταγραφή άλλων πρώιμων γονιδίων. Η ική πρωτεΐνη E1A αλληλεπιδρά με ειδικό τρόπο με ορισμένες πρωτεΐνες μέσα στο κύτταρο, πράγμα που οδηγεί το κύτταρο (εξανασκοσμένη είσοδος) στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αν ένα κύτταρο είναι ήδη στη φάση S, οι ικές ουσίες θα διατηρήσουν το κύτταρο σε αυτή τη φάση. Προκειμένου ο αδενοϊός να αντιγράψει το γενετικό υλικό του, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η διαθεσιμότητα και ενεργοποίηση των συστημάτων αντιγραφής του DNA του κυττάρου μέσα στον πυρήνα. Η ενεργοποίηση των κυτταρικών διαδικασιών λόγω του ιού, του επιτρέπει να αντιγράψει το γενετικό του υλικό και να συνθέσει όλες τις πρωτεΐνες που χρειάζεται. Έτσι συγκροτούνται νέα ικά σωματίδια και παράγονται πολλοί απόγονοι-ιοί.

Με τη σειρά του το κύτταρο αντιδρά στην επίθεση αυτή με τις πρωτεΐνες p53 και pRB. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος είναι ογκοκατασταλτική και παίζει σημαντικό ρόλο μαζί με την p53 στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (5). Συγκεκριμένα, η δράση της E1A υποκινεί το σύστημα της p53, που δρα σε απάντηση σε αυτή την ενεργοποίηση της κυτταρικής διάτρησης. Θεωρητικά, επομένως, το κύτταρο θα αρχίσει τη δραστηριότητα που θα οδηγούσε κανονικά στη φάση G₁, στην άρση της φάσης G₁ ή στην κυτταρική αυτοκτονία. Εντούτοις, ο αδενοϊός φυσικού τύπου απενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53 με την πρω-



Εικόνα 1. Κύκλος ζωής του αδενοϊού φυσικού τύπου. Ο ιός προσεγγίζει το φυσιολογικό κύτταρο και προσδένεται στους πρωτεϊνικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης (1). Στη συνέχεια, το κύτταρο περιβάλλει τον ιό με τη μεμβράνη του (2), ο ιός αποβάλλει το πρωτεϊνικό του καψίδιο, διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, που τον περιβάλλει, και απελευθερώνει το ικό DNA (3), που οδηγείται στον πυρήνα του κυττάρου (4). Το κύτταρο αντιδρά στην επίθεση που δέχεται από τον ιό, με την πρωτεΐνη p53 (5). Εντούτοις, ο αδενοϊός φυσικού τύπου απενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53 με την πρωτεΐνη του E1B-55K (6). Με αυτό τον τρόπο, γίνεται δυνατός ο πολλαπλασιασμός του ιού μέσα στο κύτταρο (7), (8), με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου-ξενιστή (9), ενώ οι ιοί-απόγονοι εξαπλώνονται στα γειτονικά κύτταρα (10).



Εικόνα 2. Κύκλος ζωής του μεταλλαγμένου αδενοϊού [ONYX-015 (CI-1042)]. Ο μεταλλαγμένος αδενοϊός προσεγγίζει ένα καρκινικό κύτταρο, αλλά επειδή το καρκινικό κύτταρο δεν φέρει λειτουργική πρωτεΐνη p53, ο ιός είναι ικανός να πολλαπλασιάζεται στο κύτταρο-ξενιστή, παρ' ότι φέρει δυσλειτουργική πρωτεΐνη E1B-55K (1), με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου (2), ενώ οι ιοί-απόγονοι εξαπλώνονται στα γειτονικά κύτταρα (3). Ο μεταλλαγμένος αδενοϊός, όμως, δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να προκαλέσει λύση ενός φυσιολογικού κυττάρου (4), γιατί αυτό αμύνεται με το σύστημα της πρωτεΐνης p53, που δεν απενεργοποιείται λόγω έλλειψης λειτουργικής ικής πρωτεΐνης E1B-55K (5), (6). Επομένως, ο μεταλλαγμένος ιός προκαλεί λύση μόνο των καρκινικών κυττάρων, αφήνοντας τα φυσιολογικά κύτταρα ανέπαφα (7).

τεΐνη του E1B-55K (6), ενώ οι πρωτεΐνες E1A απενεργοποιούν την pRB, την p300 και άλλες συναφείς πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο γίνεται δυνατός ο πολλαπλασιασμός του ιού στο κύτταρο (7), (8), με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου-ξενιστή (9), ενώ οι ιοί-απόγονοι εξαπλώνονται στα γειτονικά κύτταρα (10).

Σχεδιασμός του συστήματος γονιδιακής θεραπείας

Τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του Bischoff στην ONYX Pharmaceuticals έκαναν τις εξής σκέψεις:

Ενας αδενοϊός φυσιολογικού τύπου, που παράγει φυσιολογικές ικές πρωτεΐνες E1A και E1B, μπορεί να αντιγραφεί επιτυχώς και τελικά να προκαλέσει λύση σε όλα τα κύτταρα του ανθρώπου που έχουν είτε φυσιολογική είτε αλλοιωμένη πρωτεΐνη p53. Επομένως, ο ιός φυσιολογικού τύπου αντιγράφεται επιτυχώς τόσο μέσα στα φυσιολογικά, όσο και στα καρκινικά κύτταρα, και μπορεί τελικά να θανατώσει και τα δύο είδη κυττάρων. Όμως, ο στόχος που επιδιώκεται από τους ερευνητές, δεν είναι η θανάτωση των φυσιολογικών κυττάρων, αλλά μόνο των καρκινικών.

Ενας μεταλλαγμένος αδενοϊός με μία συγκεκριμένη, σχεδιασμένη με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής μεταλλαγή, που οδηγεί σε δυσλειτουργική πρωτεΐνη E1B-55K, δεν πρέπει να είναι σε θέση να αντιγραφεί σε ένα φυσιολογικό κύτταρο με φυσιολογική p53, αλλά ίσως να είναι σε θέση να αντιγραφεί σε ένα μη φυσιολογικό κύτταρο με μη φυσιολογική ή απύουσα p53.

Επομένως, ο απώτερος στόχος ήταν ο σχεδιασμός, με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής, ενός μεταλλαγμένου αδενοϊού που θα μπορούσε επιτυχώς να αντιγραφεί ενδοκυτταρικά και να προκαλέσει λύση σε καρκινικά κύτταρα ή σε οποιοδήποτε κύτταρο που δεν είναι ακόμη καρκινικό, αλλά έχει δυσλειτουργική p53. Ενας γενετικά τροποποιημένος αδενοϊός θα λειτουργούσε θεωρητικά με αυτό τον τρόπο. Σχεδιάστηκε, λοιπόν, ο αδενοϊός ONYX-015 (CI-1042), που φέρει μεταλλαγμένη πρωτεΐνη E1B-55K.

Κύκλος ζωής του μεταλλαγμένου αδενοϊού ONYX-015 (CI-1042)

Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται σχηματικά ο τρόπος με τον οποίο ο μεταλλαγμένος αδενοϊός μολύνει ένα καρκινικό κύτταρο. Επειδή το καρκινικό κύτταρο στερείται λειτουργικής πρωτεΐνης p53, ο ιός είναι ικανός να πολλαπλασιάζεται στο κύτταρο-ξενιστή, παρ' ότι φέρει δυσλειτουργική πρωτεΐνη E1B-55K (1), με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου (2), ενώ οι ιοί-απόγονοι εξαπλώνονται στα γειτονικά κύτταρα (3). Ο μεταλλαγμένος αδενοϊός, όμως, δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να προκαλέσει λύση ενός φυσιολογικού κυττάρου (4), γιατί αυτό αμύνεται με το σύστημα της πρωτεΐνης p53, που δεν απενεργοποιείται λόγω έλλειψης λειτουργικής ικής πρωτεΐνης E1B-55K (5), (6). Το σύστημα της p53, λοιπόν, αποκρίνεται ανεμπόδιστα, πράγμα που επιτρέπει την επιδιόρθωση, την αναστολή της ικής αντιγραφής, και/ή μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο

στην αυτοκτονία. Επομένως, ο μεταλλαγμένος ιός προκαλεί λύση μόνο των καρκινικών κυττάρων, αφήνοντας τα φυσιολογικά κύτταρα ανέπαφα (7).

Δεδομένα που υποστηρίζουν τη λειτουργικότητα της προσέγγισης που περιγράφηκε

Πειράματα από τους προαναφερθέντες ερευνητές, σε κυτταρικές σειρές και ποντίκια που φέρουν νεοπλασμάτα, έδειξαν ότι ο μεταλλαγμένος ιός αντιγράφεται 100 φορές λιγότερο αποτελεσματικά στα φυσιολογικά κύτταρα. Εντούτοις, ο μεταλλαγμένος ιός θανάτωσε όλα τα καρκινικά κύτταρα, στα οποία πειραματίστηκαν οι ερευνητές (καρκινικά κύτταρα με δυσλειτουργική ή απύουσα p53). Αντίθετα, όταν πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση (εισαγωγή ενός λειτουργικού γονιδίου p53 σε ζωικά κύτταρα) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές με δυσλειτουργική p53, αυτά τα κύτταρα δεν ήταν πλέον ευαίσθητα στη λύση από τον μεταλλαγμένο ιό. Κατά συνέπεια, η έλλειψη δυνατότητας αντιγραφής, είναι σαφές ότι εξαρτάται από την παρουσία λειτουργικής πρωτεΐνης p53 και της ικής μεταλλαγής, μαζί στο ίδιο κύτταρο.

Μεταγενέστερες μελέτες αμφισβήτησαν κατά πόσο η αντιγραφή του μεταλλαγμένου αδενοϊού εξαρτάται ή όχι από την p53. Κρίνοντας, ωστόσο, αυτές τις μελέτες πιο προσεκτικά, μπορούμε να συμπεράνουμε, ότι στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο in vitro, όσο και in vivo, παρατηρείται κάποια εκλεκτικότητα στη λύση κυττάρων, που φέρουν δυσλειτουργική πρωτεΐνη p53.

Κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με καρκίνο

Κλινικές δοκιμές είναι ήδη σε εξέλιξη, προκειμένου να διαλευκανθούν η αποτελεσματικότητα του μεταλλαγμένου ιού σε επιλεγμένους ασθενείς με νεοπλασματικές νόσους, καθώς και το επίπεδο τοξικότητάς του κατά τη θεραπευτική χορήγηση.

Επειδή ο μηχανισμός δράσης του μεταλλαγμένου αδενοϊού διαφέρει από τους μηχανισμούς δράσης των καθυρωμένων αντινεοπλασματικών θεραπειών (χειρουργική αφαίρεση του όγκου, χημειοθεραπευτική αγωγή, ακτινοβολήση των νεοπλασμάτων), η χρήση του σε θεραπευτικά σχήματα προσφέρει συγκριτικά πλεονεκτήματα. Οι κλινικοί ιατροί δεν έχουν παρατηρήσει (όταν ο μεταλλαγμένος ιός χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία) παρενέργειες, που θα τους υποχρέωναν να μειώσουν τη δόση του θεραπευτικού παράγοντα. Αντίθετα, ο μεταλλαγμένος αδενοϊός έχει την ικανότητα να αυξάνει ο ίδιος την αρχική δόση (αφού πολλαπλασιάζεται μέσα στα καρκινικά κύτταρα), ενώ τα καθυρωμένα αντινεοπλασματικά φάρμακα μεταβολίζονται από τον οργανισμό του ασθενούς.

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές δοκιμές με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του μεταλλαγμένου ιού σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου (μονοθεραπεία - Φάση I), με ενδοφλέβια έγχυση σε καρκινοπαθείς που δεν ανταποκρίνονται στις κλασικές θεραπείες (μονοθεραπεία - Φάση I) και με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο

των ωοθηκών (μονοθεραπεία - Φάση I). Επίσης, έχουν γίνει κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με ανεγχείρητο παγκρεατικό καρκίνωμα (Φάση I/II) με τη βοήθεια ενδοσκοπικών υπερήχων και ενδοεπεπλησματικής ένεσης του αδενοϊού με ταυτόχρονη ενδοφλέβια έγχυση Γεμισταμπίνης (Gemcitabine). Σε ασθενείς με γαστρεντερικό καρκίνο που μεθίσταται στο ήπαρ (Φάση I/II), πραγματοποιήθηκαν κλινικές δοκιμές με έγχυση του αδενοϊού μέσω της ηπατικής αρτηρίας, σε συνδυασμό με 5-Φθοροουρακίλη και Λευκοβορίνη (5-Fluorouracil/Leucovorin).

Η ικανότητα του μεταλλαγμένου αδενοϊού να θανατώνει τα καρκινικά κύτταρα σε συνδυασμό με τις καθυρωμένες αντινεοπλασματικές θεραπείες, όπως προκύπτει από τα πρώτα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών, αναπτερώνει τις ελπίδες των ερευνητών για μελλοντικούς χειρισμούς του συστήματος της πρωτεΐνης p53, με στόχο τη θεραπεία των νεοπλασματικών νόσων.

Προβληματισμοί σχετικά με παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του συστήματος του μεταλλαγμένου αδενοϊού

Στο άρθρο του περιοδικού "Science", οι ερευνητές που σχεδίασαν το σύστημα του μεταλλαγμένου αδενοϊού, κατέθεσαν τον προβληματισμό τους για τον βαθμό στον οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς μπορεί να επηρεάσει την εξάπλωση και κατ' επέκταση, την αντινεοπλασματική ικανότητα του ιού. Υποθέτουμε λοιπόν, ότι ο μεταλλαγμένος ιός συνεχίζει τη δράση του μέχρι να εξαιρεθεί από το ανοσοποιητικό σύστημα. Εντούτοις, ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος θα μπορούσε να αποδειχτεί ευεργετικός, όσον αφορά τον αντικειμενικό σκοπό της θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων, αφενός με τον εντοπισμό ικών αντιγόνων που εκφράζονται στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων και αφετέρου με την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων εξαιτίας των αντιγόνων που ελευθερώνονται μετά τη λύση των καρκινικών κυττάρων. Αυτό θεωρητικά, θα μπορούσε να οδηγήσει σε συστηματική αντινεοπλασματική ανοσοαπάντηση.

Επιπλέον, θα πρέπει να εξεταστούν η δυνατότητα εξάπλωσης του ιού σε απομακρυσμένες θέσεις και η ικανότητά του να μολύνει μεταστατικά κύτταρα, αφού η ενδοεπεπλησματική έγχυση περιορίζει τοπικά τη δράση του μεταλλαγμένου αδενοϊού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bischoff J.R., Kirn D.H., Williams A., Heise C., Horn S., Muna M., Ng L., Nye J.A., Sampson-Johannes A., Fattaey A. and McCormick F.: An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274: 373-376, 1996.
- Lowy S.W.: Cancer therapy and p53. *Curr Opin Oncol* 7: 547-553, 1995.
- Hubb R.T.R., Lane D.P. and Ball K.L.: Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochemical J* 352: 1-17, 2000.
- Bayley S.T. and Mymryk J.S.: Adenovirus E1A proteins and transformation. *International J of Oncology* 5: 425-444, 1994.
- Flint J. and Shenk T.: Viral transactivating proteins. *Annu Rev Genet* 31: 177-212, 1997.