

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΝΕΩΤΕΡΩΝ ΕΞΕΛΙΞΕΩΝ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ

Δ.Α. Σπαντίδος^{1,2}, Μ. Χατζηπαναγιώτου^{1,2}, Β. Ζουμπουρλής^{1,2}

1. Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα.
2. Εργαστήριο Ιολογίας, Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεγάλη ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA, του γενετικού κώδικα στη συνέχεια και η διαμόρφωση του κεντρικού δόγματος στη βιολογία πυροδότησαν την ταχεία ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας τις τελευταίες δεκαετίες. Η τεχνολογία του ανασυνδισμένου DNA, η μοριακή κλωνοποίηση και οι τεχνικές υβριδισμού επέτρεψαν την μελέτη της δομής και λειτουργίας πολλών γονιδίων. Η τεχνική επέκτασης του DNA, γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR), η ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων και η εξελισσόμενη τεχνολογία της γονιδιακής θεραπείας καθώς και το μεγαλεπίβολο σχέδιο χαρτογράφησης του γονιδιώματος του ανθρώπου είναι μηνύματα αισιοδοξίας για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι μια νόσος κατά την οποία οι στοιχειώδεις κανόνες της κυτταρικής συμπεριφοράς παύουν να ισχύουν. Ενώ η αύξηση των φυσιολογικών κυττάρων ρυθμίζεται προσεκτικά, τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται αυτόνομα και συνεχώς, με άμεση συνέπεια να διηθούν τους φυσιολογικούς ιστούς και να παρεμβάλονται στη λειτουργία τους. Επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η ανάπτυξη των κακοήθων νεοπλασμάτων είναι μια σύνθετη και πολλαπλή διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα αποκτούν τον πλήρη νεοπλασματικό φαινότυπο δια μέσου μιας σειράς προοδευτικών αλλοιώσεων (1). Το κακόηθες κύτταρο είναι το αποτέλεσμα της μετατροπής του φυσιολογικού κυττάρου υπό την επίδραση γενετικών (π.χ. μεταλλάξεων) μη αντιστρεπτών και επιγενετικών (π.χ. διαφοροποίηση, υπομεθυλίωση) αντιστρεπτών γεγονότων. Η εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στη μελέτη του καρκίνου έχει επικεντρωθεί στην ταυτοποίηση των γονιδίων εκείνων που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου καθώς και στην κατανόηση των μηχανισμών της δράσης τους

στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Τα γονίδια αυτά είναι γνωστά με τους όρους ογκογονίδια και ογκο-κατασταλτικά γονίδια (1).

Η υπάρχουσα σήμερα τεχνογνωσία συμβάλλει σημαντικά στην μελέτη των γενετικών αλλαγών (ενσωματώσεις υποκινητών ή στοιχείων με δράση επαυξηνητή, μετατοπίσεις, σημειακές μεταλλάξεις, επεκτάσεις, απαλήψεις και απώλεια της ετεροζυγωτίας) που συμβάλλουν στην μετατροπή ενός φυσιολογικού πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο και στην μελέτη των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων. Εάν ο μηχανισμός ρύθμισης αυτών των γονιδίων θα μπορούσε να ανάγνωρισθεί στα ιδιαίτερα στάδια εξέλιξης ενός καρκινικού κυττάρου (έναρξης, προαγωγής, και μετεξέλιξης) θα ήταν δυνατόν να αναπτυχθούν κλινικές στρατηγικές για την πρόληψη και παρεμπόδιση της περαιτέρω εξέλιξης του όγκου (1).

Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ Η ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΟ-ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ.

Κατά την πορεία της καρκινογένεσης πολλά ογκογονίδια καθώς και ογκο-κατασταλτικά γονίδια, εμφανίζουν αλλοιώσεις στα επίπεδα της έκφρασής τους. Τα ογκογονίδια *ras* έχουν ενοχοποιηθεί στην εξέλιξη ορισμένων όγκων στον άνθρωπο είτε με δομικές αλλοιώσεις είτε με ενισχυμένη έκφρασή τους. Τα γονίδια *ras* κωδικοποιούν μια οικογένεια πρωτεϊνών που συνδέονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (πρωτεΐνες *ras p21*) οι οποίες προσδένουν και υδρολύουν GTP. Δομικές και βιοχημικές αναλύσεις προτείνουν ότι οι πρωτεΐνες *ras p21* λειτουργούν ανάλογα με τις G πρωτεΐνες και δρουν ως μεσολαβητές μεταξύ ενεργοποιημένου υποδοχέα και ενδοκυτταρικών συστημάτων μεταφοράς μηνύματος (2).

Η ικανότητα μετασχηματισμού των κυττάρων από την οικογένεια των *ras* γονιδίων οφείλεται σε απλές σημειακές μεταλλάξεις εντός του γονιδίου οι οποίες έχουν εντοπισθεί στα κωδικόνια 12, 13 και 61. Μεταλλάξεις του γονιδίου *ras* έχουν μελετηθεί σε έναν σημαντικό αριθμό καρκινωμάτων όπως του πνεύμονα, του παγκρέατος, των νεφρών, του δέρματος, της ουροδόχου κύστεως και του θυροειδούς. Αυξημένη έκφραση του φυσιολογικού γονιδίου *ras* επάγει τον μετασχηματισμό σε κύτταρα θηλαστικών. Αυξημένα επίπεδα της έκφρασης της πρωτεΐνης *ras p21* έχουν δειχθεί σε ευρύ φάσμα νεοπλασμάτων στον άνθρωπο.

Η απορρύθμιση της μεταγραφής αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο κατά την προώθηση και εξέλιξη των τελευταίων σταδίων της ογκογένεσης. Η χρήση της ποσοτικής RT-PCR έχει αναφερθεί στην μελέτη του K-*ras* στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του πνεύμονος. Έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα μεταγραφής των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων του γονιδίου είναι αυξημένα εις βάρος των φυσιολογικών και ότι αυτό αποτελεί συχνό γνώρισμα στα στάδια της καρκινικής εξαλλαγής (2).

Το γονίδιο p53 είναι το πιο συχνά επηρεαζόμενο γονίδιο στον καρκίνο του ανθρώπου. Η μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων της φυσιολογικής και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53, αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την κατανόηση της καρκινογένεσης στον άνθρωπο. Η σχετικά νέα τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση συνδιασμένη με την ανάλυση πολυμορφισμού της διαμόρφωσης της μονόκλωνης έλικας του DNA (PCR-SSCP) επιτρέπει να μελετηθεί το ευρύ φάσμα μεταλλάξεων που απαντάται στην συντηρητική περιοχή αυτού του γονιδίου καθώς επίσης και την βιολογική σημασία αυτών των μεταλλάξεων στην συμπεριφορά της πρωτεΐνης p53. Οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) παράγουν πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν συμπλέγματα με τις ογκο-κατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και RB αντιστοίχως και αναιρούν την φυσιολογική τους λειτουργία. Τα δεδομένα που έχουν συγκεντρωθεί μέχρι τώρα δείχνουν ότι αλλοιώσεις που δημιουργούν ογκογονίδια που έχουν επικρατή χαρακτήρα και απενεργοποιημένα ογκο-κατασταλτικά γονίδια, αποτελούν αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό κατά την πολυσταδιακή καρκινογένεση (2).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΤΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΓΚΟ-ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ.

Οι εφαρμογές της μοριακής βιολογίας στην έρευνα για τον καρκίνο έχει οδηγήσει στην περαιτέρω κατανόηση του ρόλου αυτών των γονιδίων στην καρκινογένεση. Ο καθορισμός των μεταβολών που υφίστανται τα ογκογονίδια και τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια στον καρκίνο του ανθρώπου είναι πολύ χρήσιμος για την διάγνωση, την πρόγνωση, και τον καθορισμό σωστής θεραπευτικής αγωγής. Έτσι οι μοριακές τεχνικές που αφορούν τον χειρισμό του DNA ή του RNA καθώς επίσης και οι ανοσοοιστοχημικές τεχνικές δύνανται να χρησιμοποιηθούν για την επιτυχή μελέτη των ποσοτικών και ποιοτικών αλλαγών που υφίστανται τα ογκογονίδια και τα ογκο κατασταλτικά γονίδια (2,3).

Πολλές επιστημονικές εργασίες αφορούν καρκίνους του ανθρώπου και βασίζονται στην ανίχνευση των γενετικών αλλοιώσεων σε συσχέτιση με το στάδιο, τη βαθμίδα, τις μεταστατικές ιδιότητες, την θεραπεία και τον μέσο όρο επιβίωσης των ασθενών. Οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου N-ras στην οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία σε ασθενείς μικρής ηλικίας, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με πολύ κακή πρόγνωση και υψηλό κίνδυνο υποτροπής. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του H-ras σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και της ουροδόχου κύστεως σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο υποτροπής, καθώς επίσης με τις μεταστάσεις και τα ποσοστά επιβίωσης που παρατηρούνται σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου. Το ογκογονίδιο K-ras είναι χρήσιμος προγνωστικός δείκτης, καθώς η παρουσία μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 σχετίζεται με κακή

πρόγνωση σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και επιθηλιακούς καρκίνους του ενδομητρίου (2,3).

Η υπερέκφραση του γονιδίου *c-myc* έχει δείχθει ότι είναι ένας σημαντικός μοριακός δείκτης για την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού, της κεφαλής και του τραχήλου. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *c-myc* σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο μετάστασης στα πρώιμα στάδια του διηθητικού καρκινώματος της κεφαλής και του τραχήλου.

Ο υποδοχέας του γονιδίου του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (*erbB-2*) έχει δείχθει ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μετεξέλιξη του αδενοκαρκινώματος του μαστού, του καρκίνου του στομάχου, του νεφρικού ιστού και του καρκίνου των ωοθηκών. Η υπερέκφραση αυτού του γονιδίου στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού σχετίζεται συνήθως με πολύ κακή πρόγνωση (2,3).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της έκφρασης ενός ογκογονιδίου και ενός ογκο-κατασταλτικού γονιδίου έχει αναφερθεί σε μία σειρά από μελέτες. Η υπερέκφραση των γονιδίων *ras* και *p53* σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με πολύ κακή πρόγνωση. Η υπερέκφραση του γονιδίου *p53* και μια σειρά μεταλλάξεις του σχετίζονται με κακή πρόγνωση στο βρογχικό καρκίνωμα (2,3).

Ειδικές νουκλεοτιδικές μεταστροφές στο γονίδιο *p53* που έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα σχετίζονται με ειδικά μεταλλαξιγόνα που ενέχονται στην έναρξη της νόσου. Αρκετές μελέτες αναφέρονται στην συσχέτιση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης *p53* και του καπνίσματος στον καρκίνο του πνεύμονος, του λάρυγγος της κεφαλής και του τραχήλου. Το ευρύ φάσμα μεταλλάξεων του ογκο-κατασταλτικού γονιδίου *p53*, η ενοχή του στα πρώιμα και στα όψιμα στάδια διαφορετικών τύπων καρκίνων το καθιστούν πρότυπο γονίδιο για την μελέτη της σχέσης των ειδικών μεταλλαξιγόνων με τους ειδικούς τύπους μεταλλάξεων, καθώς επίσης, και της σχέσης των διαφορετικών τύπων καρκίνων με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (2,3).

Η εύρεση της λεπτομερούς δομής των προϊόντων των ογκογονιδίων μπορεί να μας επιτρέψει τον σχεδιασμό κατάλληλων ουσιών (πεπτίδια ή μονοκλωνικά αντισώματα) που να δρουν ως παρεμποδιστές ώστε να αναστέλλουν την δράση τους ή να τους προσδένουν κάποια ειδική τοξίνη ή ραδιονουκλεοτίδιο ώστε να θανατώνουν το καρκινικό κύτταρο. Αυτή η προοπτική βασίζεται στο ότι οι διάφοροι τύποι όγκων στον άνθρωπο εκφράζουν συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης αντιγόνων, οι οποίες μπορούν να χρησιμεύσουν σαν *in vivo* στόχοι για ραδιοσημασμένα αντισώματα με σκοπούς διαγνωστικούς, θεραπευτικούς ή για τον βιολογικό χαρακτηρισμό των όγκων του ανθρώπου. Αυτοί οι αντιγονικοί στόχοι περιλαμβάνουν εμβρυικά αντιγόνα, όπως το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA), αντιγόνα διαφοροποίησης όπως το CD-33 αντιγόνο που εντοπίζεται στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, ιστο-ειδικά αντιγόνα όπως το CD₂ αντιγόνο του

νευροεξωδέρματος, αντιγόνα τα οποία μπορεί να είναι προϊόντα ογκογονιδίων ή πρωτο-ογκογονιδίων, όπως η πρωτεΐνη του γονιδίου c-erbB2, ή άλλοι αυξητικοί παράγοντες, όπως π.χ. ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, πρωτεΐνες μεταφοράς όπως η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, που ευθύνεται για την αντίσταση των όγκων του ανθρώπου στα διάφορα φάρμακα. Η ανάπτυξη της μεθόδου των μονοκλωνικών αντισωμάτων από τους Kohler και Milstein αποτέλεσε σημαντικό επίτευγμα σε αυτό τον τομέα κι έχουν αναπτυχθεί μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν τους περισσότερους από τους όγκους του ανθρώπου (4).

Μια άλλη προοπτική που έχει εμφανισθεί τις τελευταίες δεκαετίες όσον αφορά την θεραπεία των όγκων του ανθρώπου είναι αυτή της γονιδιακής θεραπείας. Αυτή βασίζεται στο ότι οριστική αντιμετώπιση γενετικών ασθενειών θα ήταν δυνατή κατευθύνοντας την θεραπευτική αγωγή στο ίδιο το μεταλλαγμένο γονίδιο παρά σε δευτεροταγείς ή πλειοτροπικές επιδράσεις των προϊόντων των μεταλλαγμένων γονιδίων. Η γονιδιακή θεραπεία απέκτησε θεωρητική υποστήριξη από το 1970 και μετά με την γνώση των μηχανισμών του κυτταρικού μετασχηματισμού από ογκογόνους ιούς. Έτσι προτάθηκε ότι αυτοί οι ιοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως οχήματα μεταφοράς φυσιολογικών λειτουργικών γονιδίων μέσα στα κύτταρα του ανθρώπου προκειμένου να διορθώσουν κυτταρικές ανωμαλίες και να θεραπεύσουν γενετικές νόσους. Λόγω του ότι είναι πολύ πιθανό η πλειοψηφία των καρκινωμάτων του ανθρώπου να οφείλεται ή να σχετίζεται με ανώμαλη έκφραση γονιδίων, ο καρκίνος θα έπρεπε να θεωρείται γενετική νόσος. Προς το παρόν τα πιο απλά γενετικά μοντέλα περιλαμβάνουν νεοπλασίες που είναι αποτέλεσμα ανωμαλιών των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων όπως αυτά που προφανώς σχετίζονται με την ανάπτυξη του ρετινοβλαστώματος και του όγκου του Wilm. Αυτοί οι τύποι καρκίνου πιθανότατα προέρχονται από την απενεργοποίηση και των δύο αλληλομόρφων του φυσιολογικού γονιδίου. Ο καρκινικός φαινότυπος σε αυτήν την περίπτωση θα μπορούσε να κατασταλεί και ίσως να αντιστραφεί αντικαθιστώντας την λειτουργική έκφραση από ένα φυσιολογικό γονίδιο. Η απενεργοποίηση των επικρατών ογκογονιδίων είναι ένα πιο δύσκολο έργο αλλά προτείνεται με νέες προσεγγίσεις κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης. Τελευταία επίσης προτείνονται διάφορες μέθοδοι για την έκφραση γονιδίων τοξινών στα κύτταρα. Θεωρητικά κάτι τέτοιο θα επέτρεπε την κατευθυνόμενη καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Με μια άλλη προσέγγιση του θέματος κατευθυνόμενη εισαγωγή ενός γονιδίου αντοχής σε κάποιο φάρμακο ειδικά μέσα στα καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε να τα καταστήσει ανταποκρινόμενα σε ειδική φαρμακευτική αγωγή, όπως π.χ. η εισαγωγή του γονιδίου HPRT σε λευχαιμικά κύτταρα ανθρώπου με αντίσταση στην θειογουανίνη ώστε να τα κάνει ευαίσθητα σε αντιμεταβολίτες που είναι ανάλογα πουρινών (5).

Μελέτες γονιδιακής θεραπείας σε ανθρώπους εμπεριέχουν κάποιους ηθικούς προβληματισμούς που έχουν απασχολήσει ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα και είναι απαραίτητη ιδιαίτερη προσοχή στην προσέγγιση αυτού του θέματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σπαντίδος ΔΑ. Μοριακή και κυτταρική ογκολογία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 1992.
2. Anderson MLM and Spandidos DA. Oncogenes and onco-suppressor genes in lung cancer. *Respiratory Medicine* 87, 413-420, 1993.
3. Spandidos DA., Liloglou T., Field JK. Prognostic significance of oncogenes and tumor suppressor genes in human malignancy. *Stem cells* 11, 194-198, 1993.
4. Larson SM., Macapinlac HA., Scott AM. and Divji CR. Recent achievements in the development of radiolabeled monoclonal antibodies for diagnosis, therapy and biologic characterization of human tumors. *Acta oncologica* 32, 709-715, 1993.
5. Friedmann T. Progress toward human gene therapy. *Science* 44, 1275-1281, 1989.