



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Μελέτη του ρόλου του αυξητικού παράγοντα SDF-1 στην καρκινογένεση

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαρία Κυραρίνη

Επιβλέπων: Δημήτριος-Διονύσιος Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα, Μάιος 2012



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Μελέτη του ρόλου του αυξητικού παράγοντα SDF-1 στην καρκινογένεση

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαρία Κυραρίνη

Επιβλέπων: Δημήτριος-Διονύσιος Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

.....
Δ. Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Κ. Νικήτα
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

.....
Γ. Ματσόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα, Μάιος 2012

.....

Μαρία Κυραρίνη

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π

Copyright © Μαρία Κυραρίνη, Μάιος 2012

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα (maria.kyrarini@gmail.com).

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Ο καρκίνος εξακολουθεί να αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου στον κόσμο. Πρόσφατα, με την ανάπτυξη της βιοπληροφορικής, γίνεται μια προσπάθεια εύρεσης των υπεύθυνων γονιδίων και πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου. Στην παρούσα εργασία ασχολούμαστε με τον αυξητικό παράγοντα SDF-1, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη, στη ομοιόσταση και στις φλεγμονώδεις νόσους, αλλά είναι και κρίσιμος παράγοντας στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων και στη δημιουργία μεταστάσεων. Ο υποδοχέας CXCR4 του αυξητικού παράγοντα SDF-1 εκφράζεται στον καρκίνο του μαστού, του προστάτη, των πνευμόνων, των ωοθηκών, σε αιμοποιητικές κακοήθειες, σε γαστρεντερικούς όγκους και σε άλλα είδη καρκίνου. Η υπερέκφραση του υποδοχέα CXCR4 οδηγεί σε επιθετικούς καρκίνους και σε μεταστάσεις με μικρό ποσοστό επιβίωσης τις περισσότερες φορές. Τα τελευταία χρόνια έχουν περατωθεί μερικές έρευνες για τη σίγηση του υποδοχέα CXCR4, ώστε να αναστέλλεται η έκφραση του SDF-1, σε διάφορα είδη καρκίνου. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά αφού μειώθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του όγκου και, κυρίως, παρεμποδίστηκαν οι μεταστάσεις.

Λέξεις-Κλειδιά: καρκίνος, SDF-1, CXCR4, CXCL12, αυξητικός παράγοντας, χημειοκίνη, μετάσταση, θεραπεία καρκίνου.

Abstract

Cancer to this day remains a leading cause of death worldwide. Recent progress with bioinformatics field, has led to an increase in the discovery of genes and proteins associated with cancer development. This thesis deals with the growth factor SDF-1, which plays an important role in embryonic development, homeostasis and inflammatory diseases, but is also a critical factor in tumor growth and cancer cell metastases. Breast, prostate, lung and, ovarian cancer, myeloid malignancies, gastrointestinal tumors and other cancers, all express the CXCR4 receptor associated with the SDF-1 growth factor. Overexpression of this receptor, leads to aggressive tumors and metastases with a low survival rate in most cases. In recent years there have been studies, where the receptor CXCR4 was silenced in various types of cancer. The results are encouraging, having decreased the rate of tumor growth and most importantly, blocking the development of metastases.

Key-Words: cancer, SDF-1, CXCR4, CXCL12, growth factor, chemokine, metastasis, cancer treatment.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κουτσούρη που μου εμπιστεύτηκε αυτή την διπλωματική και είχε την επίβλεψη της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδασκτορικό συνεργάτη του εργαστηρίου Βιοϊατρικής Τεχνολογίας, κ. Ιωάννη Μακρή για την πολύτιμη βοήθειά του που ήταν πάντοτε διατεθειμένος να προσφέρει και για το δημιουργικό και φιλικό κλίμα το οποίο καλλιεργεί, αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους ανθρώπους που βρίσκονται κοντά μου όλα αυτά τα χρόνια για την αμέριστη στήριξη τους.

Πίνακας Περιεχομένων

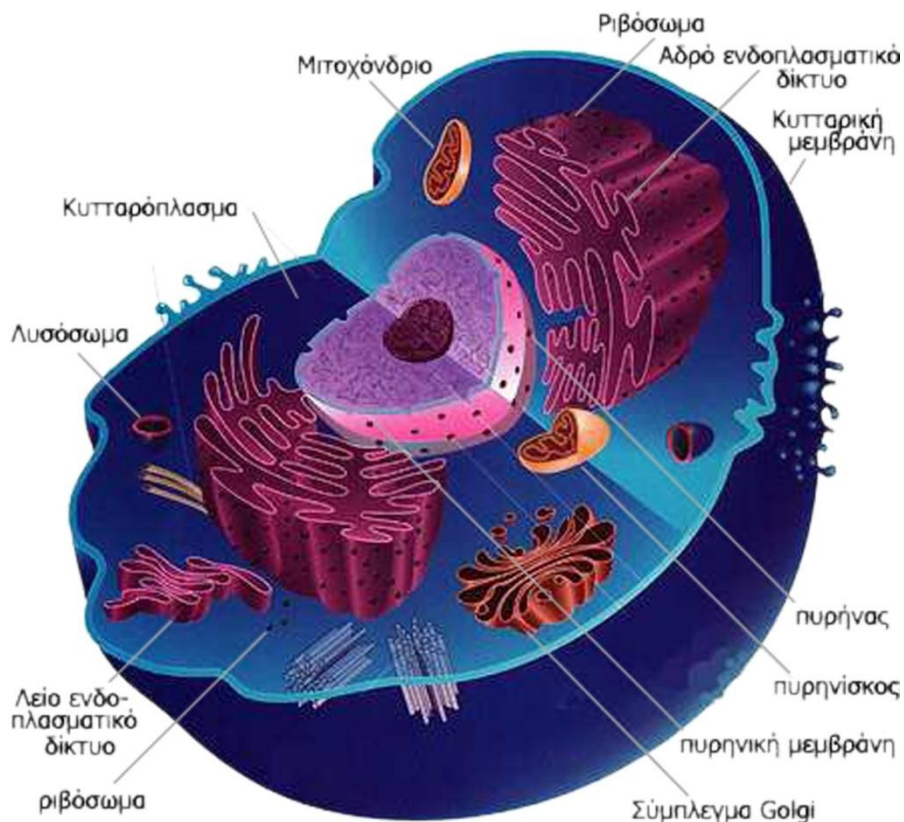
Περίληψη	5
Abstract	7
Ευχαριστίες	9
Πίνακας Περιεχομένων	11
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία.....	13
1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά Ευκαρυωτικών Κυττάρων	13
1.2 Γενετικό Υλικό	14
1.3 Δομή του DNA	14
1.4 Γενετικός κώδικας	18
1.5 Πρωτεΐνες.....	21
1.6 Χρωμοσώματα του ανθρώπου – Καρυότυπος.....	23
1.7 Καρκίνος.....	24
Βιβλιογραφία – Πηγές 1 ^{ου} Κεφαλαίου.....	27
Κεφάλαιο 2 ^ο : Βιοπληροφορική.....	29
2.1 Εισαγωγή στη Βιοπληροφορική	29
2.2 Παραγωγή Βιολογικών Δεδομένων	31
2.3 Βάσεις Βιολογικών Δεδομένων	33
2.4 Αλγόριθμοι σύγκρισης ακολουθιών	35
2.4.1 Στοίχιση ακολουθιών κατά ζεύγη.....	37
2.4.2 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών	42
2.4.3 Εξελικτική φυλογενετική ανάλυση.....	44
Βιβλιογραφία-Πηγές 2 ^{ου} Κεφαλαίου	47
Κεφάλαιο 3 ^ο : Αυξητικός Παράγοντας SDF-1	49
3.1 Εισαγωγή στους αυξητικούς παράγοντες	49
3.2 Χημειοκίνες	50
3.3 Αυξητικός παράγοντας SDF-1.....	50
3.3.1 CXCR4 και CXCL12 (SDF-1) στην εμβρυική ανάπτυξη	54
3.3.2 CXCR4 και CXCL12 (SDF-1) στην ομοιόσταση	54
3.3.3 CXCR4 και CXCL12 (SDF-1) στις φλεγμονώδεις ασθένειες.....	54

3.3.4 Μονοπάτια του CXCR4/CXCL12	55
3.4 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος	56
3.4.1 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος του μαστού	57
3.4.2 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος του προστάτη	60
3.4.3 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος των πνευμόνων	61
3.4.4 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος των ωοθηκών	63
3.4.5 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και αιμοποιητικές κακοήθειες	64
3.4.6 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και γαστρεντερικοί όγκοι	67
Βιβλιογραφία-Πηγές 3 ^ο Κεφαλαίου	68
Κεφάλαιο 4 ^ο : Θεραπεία Καρκίνου και ο Αυξητικός Παράγοντας SDF-1	75
4.1 Υπάρχουσες θεραπείες καρκίνου	75
4.2 Γονιδιακή θεραπεία	77
4.3 Ο Αυξητικός παράγοντας SDF-1 στη θεραπεία του καρκίνου	79
4.3.1 Η σίγηση του CXCR4 στη μετάσταση του καρκίνου του μαστού	79
4.3.2 Η σίγηση του CXCR4 στην οξεία μυελογενή λευχαιμία	83
4.3.3 Η σίγηση του CXCR4 στη μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου	87
4.3.4 Η σίγηση του CXCR4 στον καρκίνο των ωοθηκών	91
4.3.5 Η σίγηση του CXCR4 στον καρκίνο του προστάτη	94
Βιβλιογραφία-Πηγές 4 ^ο Κεφαλαίου	97
Κεφάλαιο 5 ^ο : Συμπεράσματα και Μελλοντικές Προοπτικές	101
5.1 Συμπεράσματα	101
5.2 Μελλοντικές προοπτικές	101

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία

1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά Ευκαρυωτικών Κυττάρων

Το κύτταρο είναι η λειτουργική βασική μονάδα της ζωής και ανακαλύφθηκε από τον Robert Hooke. Ως κύτταρο νοείται το μικρότερο δομικό συστατικό της έμβιας ύλης, που αποτελείται από μια συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων, που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Το κύτταρο διαθέτει μορφολογική, φυσική και χημική οργάνωση και την ικανότητα της αφομοίωσης, της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής. Είναι μια μονάδα της ζωής ανεξάρτητη ως προς την αυτορρύθμιση και την προσαρμοστικότητα του σε σχέση με το περιβάλλον. Όλοι οι οργανισμοί, από τους πιο απλούς έως τους πιο σύνθετους - όπως ο άνθρωπος - αποτελούνται από ένα (μονοκύτταροι οργανισμοί) ή περισσότερα κύτταρα (πολυκύτταροι οργανισμοί). Οι άνθρωποι έχουν περίπου 100 τρισεκατομμύρια ή 10^{14} κύτταρα. [8]



Σχήμα 1.1: Ευκαρυωτικό κύτταρο [13]

Τα κύτταρα διακρίνονται σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά, ανάλογα με το αν διαθέτουν σχηματισμένο πυρήνα (ευκαρυωτικά) ή όχι (προκαρυωτικά). Τα βασικά μέρη ενός ευκαρυωτικού κυττάρου είναι: ο πυρήνας, το κυτταρόπλασμα και η πλασματική μεμβράνη (Σχήμα 1.1). Στον πυρήνα βρίσκεται κλεισμένο το γενετικό υλικό, που καθορίζει τη σύνθεση των ουσιών που χρειάζεται το κύτταρο για τις διεργασίες του. Στο κυτταρόπλασμα βρίσκονται διάφορα οργανίδια τα οποία ποικίλουν από κύτταρο σε κύτταρο και επιτελούν

διάφορες λειτουργίες του κυττάρου. Παραδείγματα τέτοιων κυτταρικών οργανιδίων είναι τα ριβοσώματα, τα οποία βοηθούν το κύτταρο να συνθέσει τις πρωτεΐνες που του είναι απαραίτητες, το σύμπλεγμα golgi, όπου οι πρωτεΐνες μετά την σύνθεσή τους, τροποποιούνται και παίρνουν την τελική τους μορφή, τα μιτοχόνδρια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα και τα λυσοσώματα, που διαθέτουν πολλά ένζυμα (πρωτεΐνες που μπορούν να επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις) για τη διάσπαση διάφορων ουσιών σε μικρότερα συστατικά στα κύτταρα. Η πλασματική μεμβράνη διαχωρίζει το κύτταρο από το περιβάλλον του. [8,10]

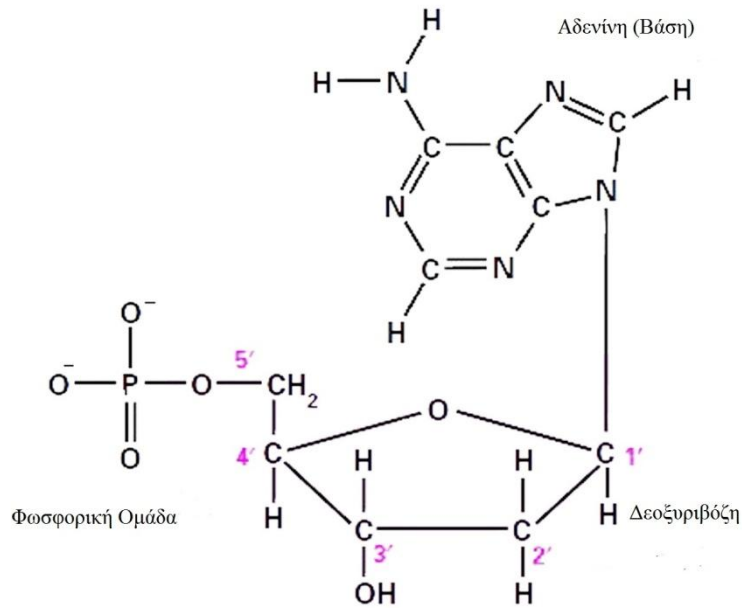
Μεγάλες ομάδες ομοειδών κυττάρων, κατά σύσταση και ορισμένη φυσιολογική λειτουργία, χαρακτηρίζονται ιστοί, (π.χ. μυϊκός ιστός), οι οποίοι και αποτελούν την μονάδα δεύτερης τάξης στον ανθρώπινο οργανισμό, μετά τα κύτταρα. [8]

1.2 Γενετικό Υλικό

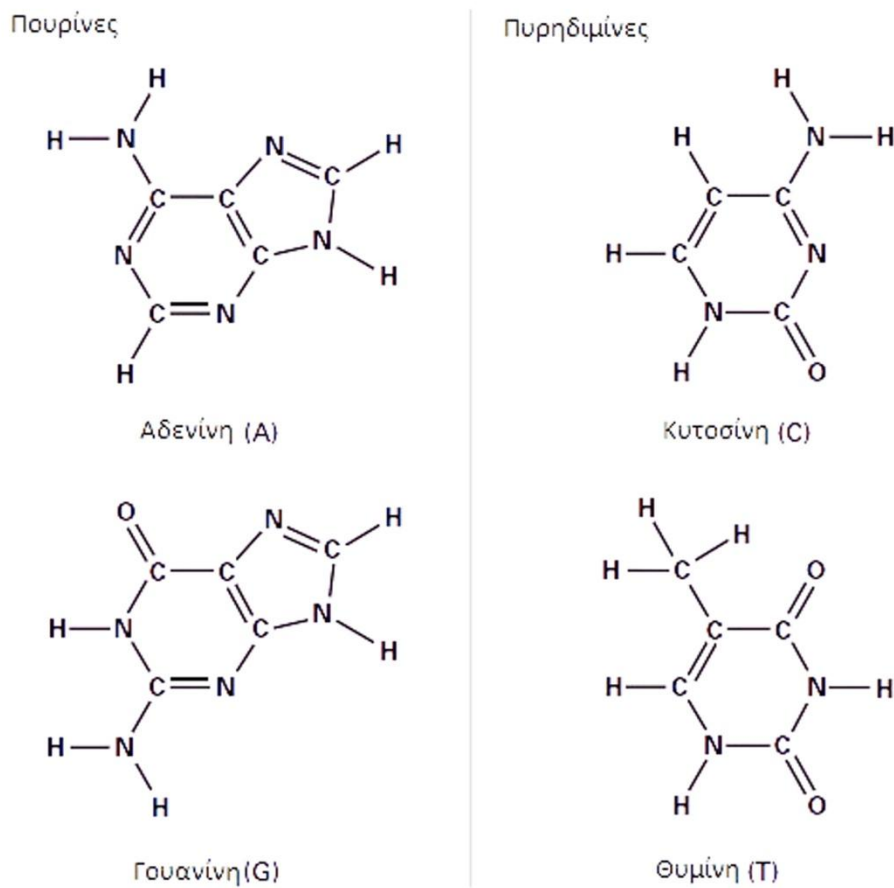
Το DNA αποτελεί το γενετικό υλικό όλων των κυττάρων και των περισσότερων ιών. Κάποιοι ιοί (πχ. ρετροϊοί) έχουν ως γενετικό υλικό RNA. Στο γενετικό υλικό αποθηκεύεται η γενετική πληροφορία, δηλαδή περιέχονται πληροφορίες που καθορίζουν όλα τα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού. Οι πληροφορίες αυτές οργανώνονται σε λειτουργικές μονάδες, τα γονίδια. Ακόμη, το γενετικό υλικό διατηρεί και μεταβιβάζει τη γενετική πληροφορία από κύτταρο σε κύτταρο και από οργανισμό σε οργανισμό και ελέγχει τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Το γενετικό υλικό ενός κυττάρου ονομάζεται το γονιδιώμα του. [1]

1.3 Δομή του DNA

Τα γονίδιά μας είναι κατασκευασμένα από δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA). Το μόριο αυτό περιέχει τις απαραίτητες πληροφορίες που καθορίζουν την βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής. Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ είναι εξαιρετικά μεγάλο πολυμερές που αποτελείται από μονάδες που ονομάζονται δεοξυριβονουκλεοτίδια, ή απλά νουκλεοτίδια. Το κάθε νουκλεοτίδιο περιέχει μία αζωτούχο βάση, ένα σάκχαρο (στην περίπτωση του DNA είναι η δεοξυριβόζη) και μία φωσφορική ομάδα (Σχήμα 1.2). Τέσσερις βάσεις έχουν βρεθεί στο DNA. Αυτές είναι δύο πουρίνες, η Αδενίνη (A) και η Γουανίνη (G) και δύο πυριμιδίνες, η Θυμίνη (T) και Κυτοσίνη (C) (Σχήμα 1.3). Σε κάθε νουκλεοτίδιο η αζωτούχος βάση συνδέεται με τον 1' άνθρακα της δεοξυριβόζης και με τον 5' άνθρακα η φωσφορική ομάδα. [1]



Σχήμα 1.2: Δομή νουκλεοτιδίου.



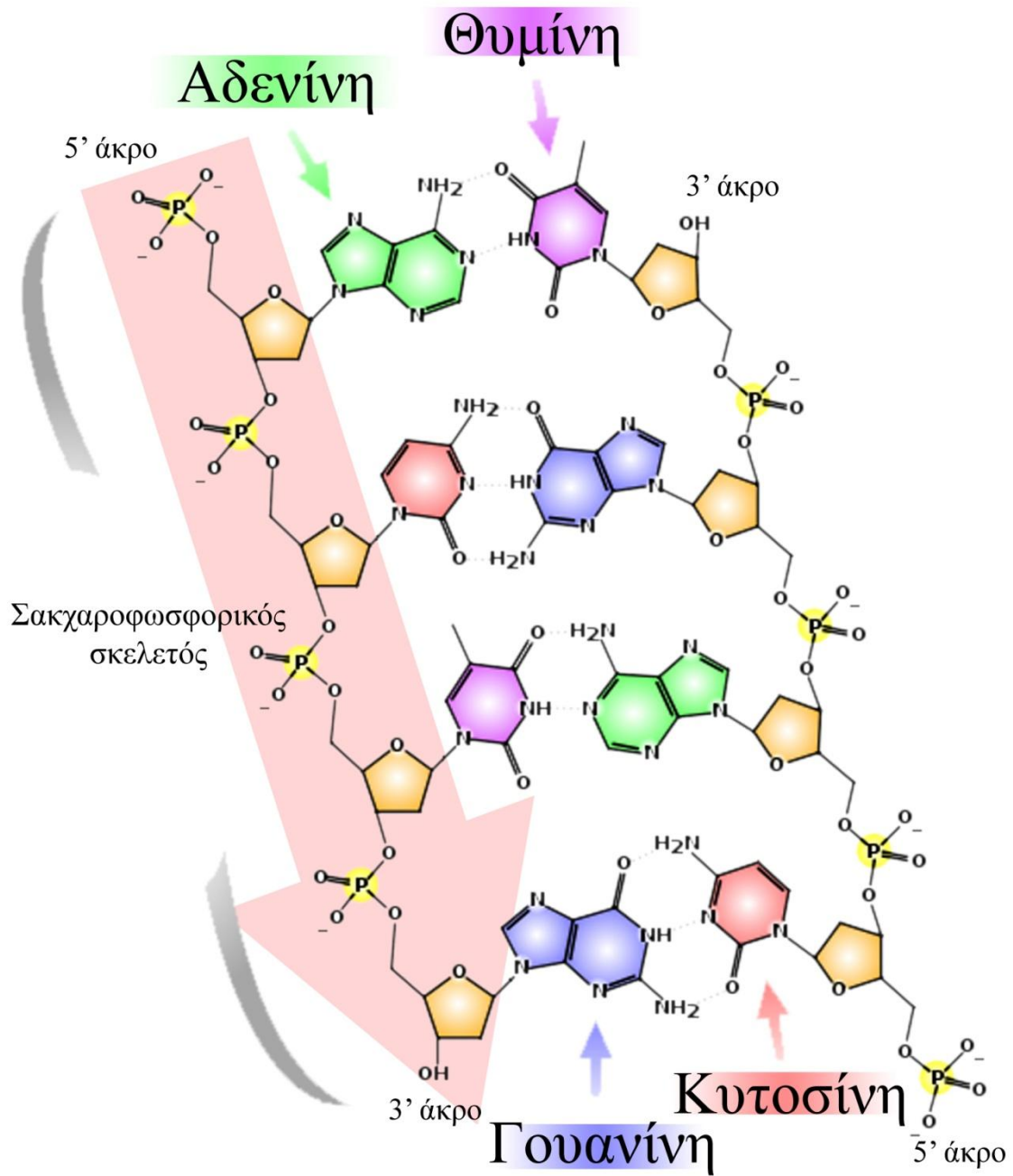
Σχήμα 1.3: Οι τέσσερις βάσεις που βρέθηκαν στο DNA.

Στο σχήμα 1.4 παρουσιάζεται η δομή μιας αλυσίδας DNA. Καθώς τα νουκλεοτίδια προστίθενται στην αλυσίδα χάνουν δύο φωσφορικές ομάδες. Ο δεσμός που δημιουργείται είναι μεταξύ του υδροξυλίου του 3' άνθρακα της δεοξυριβόζης του ενός νουκλεοτιδίου με την α-φωσφορική ομάδα του 5' άνθρακα της δεοξυριβόζης του επόμενου νουκλεοτιδίου. Ο

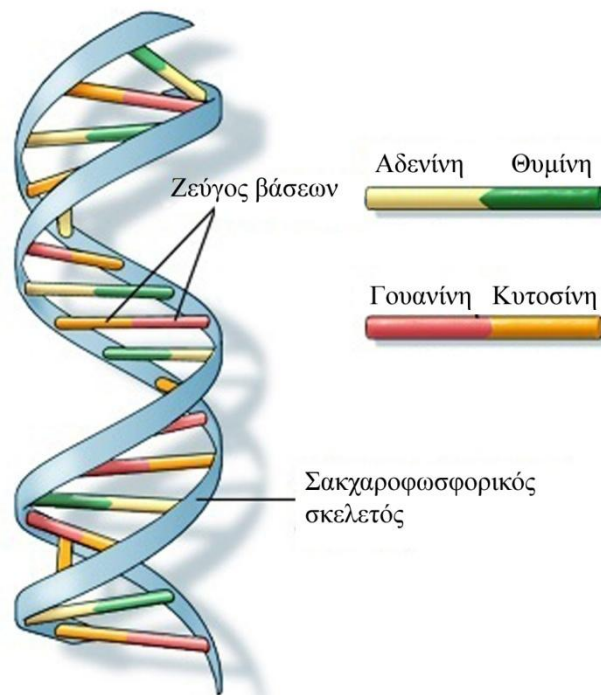
δεσμός αυτός ονομάζεται 3'-5'. Μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα έχει πόλωση επειδή τα δύο άκρα της είναι διαφορετικά. Το πρώτο νουκλεοτίδιο της αλυσίδας έχει ελεύθερη την φωσφορική ομάδα συνδεδεμένη στον 5' άνθρακα της δεοξυριβόζης και ονομάζεται 5' άκρο της αλυσίδας. Το τελευταίο νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερο το υδροξύλιο του 3' άνθρακα της δεοξυριβόζης και ονομάζεται 3' άκρο της αλυσίδας.[1]

Το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν στο χώρο μια δεξιόστροφη διπλή έλικα. (Σχήμα 1.5) Στο εξωτερικού του μορίου βρίσκονται δύο υδρόφιλοι σκελετοί που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα μόρια φωσφορικής ομάδας – δεοξυριβόζης ενωμένων με φωσφοδιεστερικό δεσμό, ενώ στο εσωτερικό του μορίου βρίσκονται οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες που είναι υδρόφοβες (Σχήμα 1.4). Κάθε κλώνος DNA περιέχει μια ακολουθία νουκλεοτιδίου που είναι ακριβώς συμπληρωματική (complementary) προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του άλλου κλώνου. Η πουρίνη γουανίνη (G) συνδέεται μόνο με την πυριμιδίνη κυτοσίνη (C) σχηματίζοντας τρεις δεσμούς υδρογόνου και η πουρίνη αδενίνη (A) συνδέεται μόνο με την πυριμιδίνη θυμίνη (T) σχηματίζοντας δύο δεσμούς υδρογόνου. Οι δύο αλυσίδες του DNA είναι αντιπαράλληλες, επειδή βρίσκονται σε αντίθετη κατεύθυνση η μία σε σχέση με την άλλη με το 3' άκρο της μίας αλυσίδας να βρίσκεται απέναντι από το 5' άκρο της άλλης αλυσίδας (Σχήμα 1.4). [1]

Οι βάσεις του DNA μεταφέρουν τη γενετική πληροφορία (γονιδίωμα). Η πληροφορία του DNA περνάει στα θυγατρικά μόρια μέσω της αναπαραγωγής (αντιγραφή του DNA) και μετέπειτα της κυτταρικής διαίρεσης. Το DNA κατευθύνει τη σύνθεση των πρωτεϊνών με τη διαμεσολάβηση του μορίου RNA. Ο κώδικας του DNA μεταφέρεται σε RNA με μια διαδικασία γνωστή ως μεταγραφή (transcription). Ο κώδικας RNA μεταφράζεται σε μια ακολουθία αμινοξέων κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Αυτό είναι το κεντρικό δόγμα της βιολογίας (Σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.4: Η χημική δομή του DNA, όπου φαίνεται το ζευγάρι των βάσεων A-T και G-C. Οι βάσεις, που ενώνονται μέσω δεσμών υδρογόνου, συνδέουν τους δυο σακχαροφωσφορικούς σκελετούς.



Σχήμα 1.5: Η δομή διπλής έλικας του DNA.

1.4 Γενετικός κώδικας

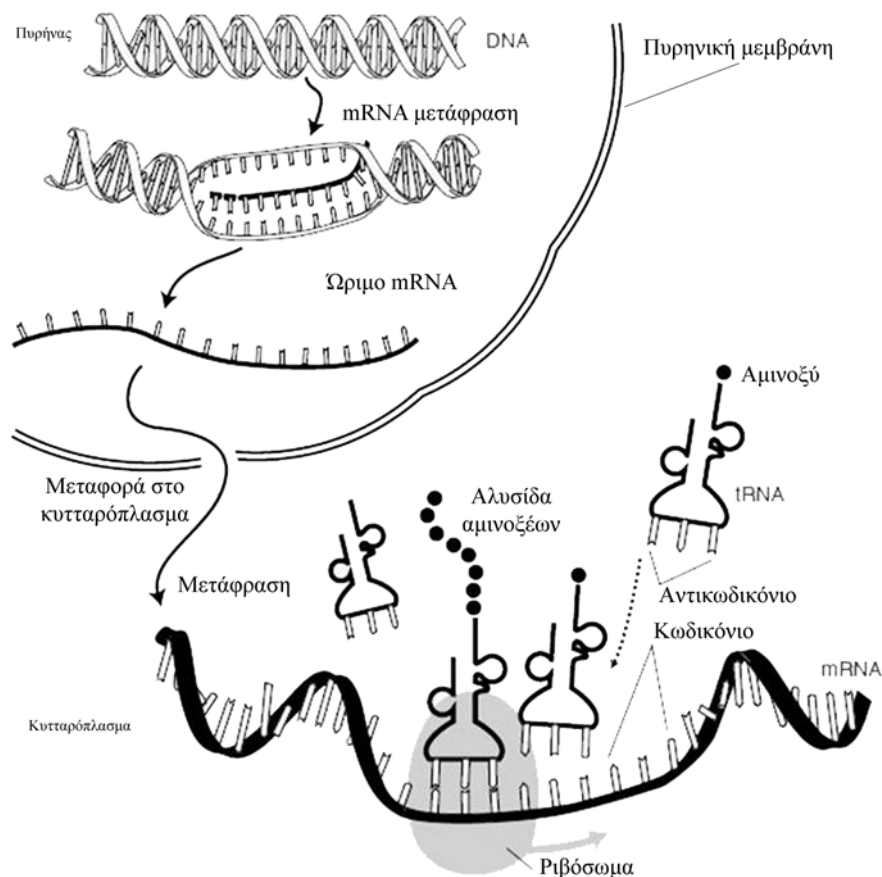
Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή με επιμέρους δομικά στοιχεία τα αμινοξέα. Η αλληλουχία των βάσεων στο DNA καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες. Υπάρχουν 20 διαφορετικά αμινοξέα στις πρωτεΐνες αλλά μόνο 4 διαφορετικές βάσεις στο DNA (A,T, G και C). Κάθε αμινοξύ καθορίζεται από ένα κωδικόνιο, μια ομάδα τριών βάσεων. Αυτά τα 64 κωδικόνια ($4^3=64$) αποτελούν τον γενετικό κώδικα, ένα σύνολο κανόνων που λένε στο κύτταρο τη σειρά με την οποία θα ενωθούν τα αμινοξέα για να δημιουργήσουν μια πρωτεΐνη. Παρ' ότι η αλληλουχία των κωδικονίων του DNA καθορίζουν την αλληλουχία των αμινοξέων, η διπλή έλικα του DNA δεν μπορεί να παίζει ρόλο η ίδια στην πρωτεϊνοσύνθεση. Η μετάφραση (translation) της ακολουθίας από κωδικόνια σε αμινοξέα συμβαίνει μέσω της παρέμβασης ενός τρίτου μορίου, του mRNA (messenger RNA ή αγγελιοφόρο RNA) (Σχήμα 1.6). Το RNA αποτελείται από ριβονουκλεοτίδια, δηλαδή περιέχουν το σάκχαρο ριβόζη και επίσης το RNA είναι μονόκλωνο.

Υπάρχουν τέσσερα είδη μορίων RNA που παράγονται κατά τη μεταγραφή: το αγγελιοφόρο RNA(mRNA), το οποίο χρησιμοποιείται ως πρότυπο, καθοδηγώντας τη συναρμολόγηση των αμινοξέων σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, το ριβοσωμικό RNA (rRNA), που συνδέεται με πρωτεΐνες και σχηματίζουν το ριβόσωμα, το μεταφορικό RNA (tRNA), όπου συνδέεται με ένα συγκεκριμένο αμινοξύ και το μεταφέρει στη θέση της πρωτεϊνοσύνθεσης και το μικρό πυρηνικό RNA (snRNA), το οποίο συνδέεται με πρωτεΐνες και σχηματίζει μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια. [12]

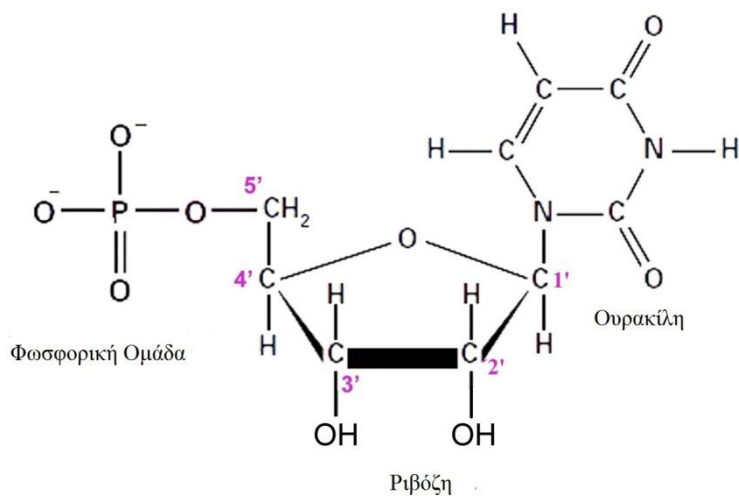
Το mRNA χρησιμοποιεί τον ίδιο κώδικα με αυτόν του DNA με μία διαφορά: αντί για τη βάση Θυμίνη (T) περιέχει τη βάση Ουρακίλη (U) (Σχήμα 1.7). Όταν γράφουμε γενετικό κώδικα, χρησιμοποιούμε συνήθως τη μορφή RNA, δηλαδή χρησιμοποιούμε U αντί για T. [1]

Το γονίδιο αποτελεί μια υποακολουθία του γονιδιώματος, του DNA, και αποτελείται από κωδικοποιούσες περιοχές (εξώνια: exons), περιοχές δηλαδή που περιλαμβάνουν τριπλέτες βάσεων που κωδικοποιούν αντίστοιχα αμινοξέα, και μη κωδικοποιούσες περιοχές (εσώνια: introns) που δεν κωδικοποιούν αμινοξέα αλλά μπορεί να περιλαμβάνονται στο γονίδιο. Μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος, εκτός από τα εσώνια, είναι και οι δια-γονιδιακές περιοχές (intergetic regions) που βρίσκονται ανάμεσα σε γονίδια και αγνοούνται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής και τα ψευδο-γονίδια (pseudogenes) που ενώ μεταγράφονται σε RNA δεν μεταφράζονται σε πρωτεϊνική ακολουθία (Σχήμα 1.8). [10]

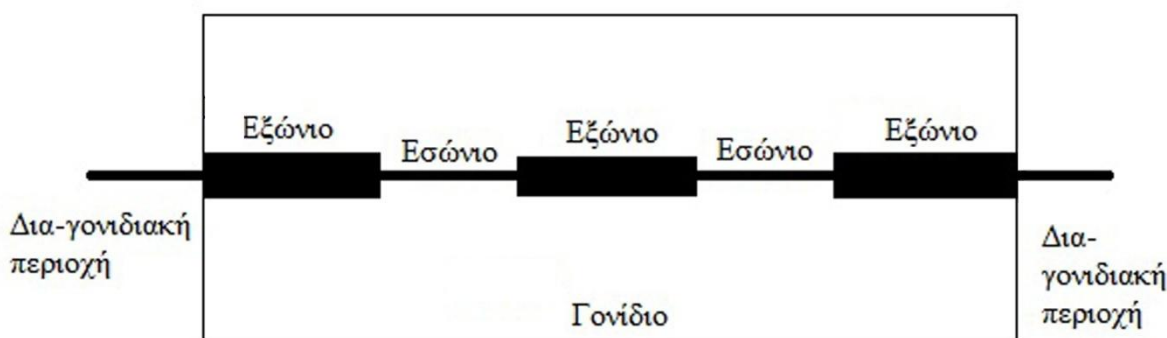
Όταν ένα γονίδιο που περιέχει εσώνια μεταγράφεται, δημιουργείται το πρόδρομο mRNA που περιέχει και εξώνια και εσώνια. Το πρόδρομο mRNA μετατρέπεται σε mRNA με τη διαδικασία της ωρίμανσης, κατά την οποία τα εσώνια κόβονται από μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια και απομακρύνονται. Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια αποτελούνται από snRNA και από πρωτεΐνες και λειτουργούν ως ένζυμα που κόβουν τα εσώνια και συρράπτουν τα εξώνια μεταξύ τους σχηματίζοντας το ώριμο mRNA. Το ώριμο mRNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και ειδικότερα στα ριβοσώματα. [8]



Σχήμα 1.6: Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας. [14]



Σχήμα 1.7: Η βάση Ουρακίλη (U)



Σχήμα 1.8: Τμήματα του DNA: Εσώνια, Εξώνια, Γονίδιο, Δια-γονιδιακή περιοχή

Ο πρότυπος γενετικός κώδικας εμφανίζεται στον πίνακα 1.1 όπου δείχνει τι αμινοξύ ορίζει το κάθε ένα από τα 64 κωδικόνια. Τα χαρακτηριστικά του γενετικού κώδικα είναι τα εξής:

- Είναι κώδικας τριπλέτας, δηλαδή κάθε κωδικόνιο κωδικοποιεί ένα αμινοξύ.
- Είναι συνεχής, δηλαδή δεν παραλείπεται κάποιο νουκλεοτίδιο.
- Είναι μη επικαλυπτόμενος, δηλαδή το κάθε νουκλεοτίδιο ανήκει σε ένα μόνο κωδικόνιο.
- Είναι σχεδόν καθολικός. Όλοι οι οργανισμοί έχουν τον ίδιο γενετικό κώδικα. Ωστόσο, αρκετά μιτοχονδριακά γονίδια μεταφράζουν το κωδικόνιο UGA σε τρυπτοφάνη αντί για λήξη. Ακόμη, στο γενετικό κώδικα του πυρήνα ορισμένων πρωτίστων (protists) μεταφράζουν τα κωδικόνια UAA και UAG σε γλουταμίνη αντί για λήξη.
- Χαρακτηρίζεται ως εκφυλισμένος. Τα 61 κωδικόνια καθορίζουν ένα αμινοξύ, ενώ τα υπόλοιπα 3 ενεργούν σήμα λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η μεθειονίνη και η τρυπτοφάνη είναι τα μόνα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από ένα κωδικόνιο. Τα άλλα 18 αμινοξέα κωδικοποιούνται από άλλα 2,3,4 ή 6 κωδικόνια και έτσι ο κώδικας

είναι εκφυλισμένος. Να σημειωθεί ότι όταν 2 ή περισσότερα κωδικόνια κωδικοποιούν ένα αμινοξύ, συνήθως διαφέρουν μόνο στη τρίτη βάση της τριπλέτας.

- Ο γενετικός κώδικας έχει κωδικόνιο έναρξης (AUG και κωδικοποιεί το αμινοξύ μεθειονίνη) και κωδικόνια λήξης (UAG, UAA και UGA). [1]

		Δεύτερο γράμμα								
		U	C	A	G					
Πρώτο γράμμα	U	UUU	φαινυλαλανίνη (phe/f)	UCU	σερίνη (ser/s)	UAU	τυροσίνη(tyr/y)	UGU	κυστεΐνη (cys)	U
		UUC	φαινυλαλανίνη (phe/f)	UCC	σερίνη (ser/s)	UAC	τυροσίνη(tyr/y)	UGC	κυστεΐνη(cys/c)	C
		UUA	λευκίνη (leu/l)	UCA	σερίνη (ser/s)	UAA	λήξη	UGA	λήξη	A
		UUG	λευκίνη (leu/l)	UCG	σερίνη (ser/s)	UAG	λήξη	UGG	τρυπτοφάνη (trp/w)	G
	C	CUU	λευκίνη (leu/l)	CCU	προλίνη (pro/p)	CAU	ιστιδίνη (his/h)	CGU	αργινίνη (arg/r)	U
		CUC	λευκίνη (leu/l)	CCC	προλίνη (pro/p)	CAC	ιστιδίνη (his/h)	CGC	αργινίνη (arg/r)	C
		CUA	λευκίνη (leu/l)	CCA	προλίνη (pro/p)	CAA	γλουταμίνη (gln/q)	CGA	αργινίνη (arg/r)	A
		CUG	λευκίνη (leu/l)	CCG	προλίνη (pro/p)	CAG	γλουταμίνη (gln/q)	CGG	αργινίνη (arg/r)	G
	A	AUU	ισολευκίνη(ile/i)	ACU	θρεονίνη (thr/t)	AAU	ασπαραγγίνη (asn/n)	AGU	σερίνη (ser/s)	U
		AUC	ισολευκίνη(ile/i)	ACC	θρεονίνη (thr/t)	AAC	ασπαραγγίνη (asn/n)	AGC	σερίνη (ser/s)	C
		AUA	ισολευκίνη(ile/i)	ACA	θρεονίνη (thr/t)	AAA	λυσίνη (lys/k)	AGA	σερίνη (ser/s)	A
		AUG	μεθειονίνη(met/m) - έναρξη	ACG	θρεονίνη (thr/t)	AAG	λυσίνη (lys/k)	AGG	σερίνη (ser/s)	G
	G	GUU	βαλίνη (val/v)	GCU	αλανίνη (ala/a)	GAU	ασπαρτικό οξύ (asp/d)	GGU	γλυκίνη (gly/g)	U
		GUC	βαλίνη (val/v)	GCC	αλανίνη (ala/a)	GAC	ασπαρτικό οξύ (asp/d)	GGC	γλυκίνη (gly/g)	C
		GUA	βαλίνη (val/v)	GCA	αλανίνη (ala/a)	GAA	γλουταμινικό οξύ (glu/e)	GGA	γλυκίνη (gly/g)	A
		GUG	βαλίνη (val/v)	GCG	αλανίνη (ala/a)	GAG	γλουταμινικό οξύ (glu/e)	GGG	γλυκίνη (gly/g)	G

Πίνακας 1.1: Γενετικός κώδικας και αντιστοίχιση κωδικονίων με αμινοξέα [2]

1.5 Πρωτεΐνες

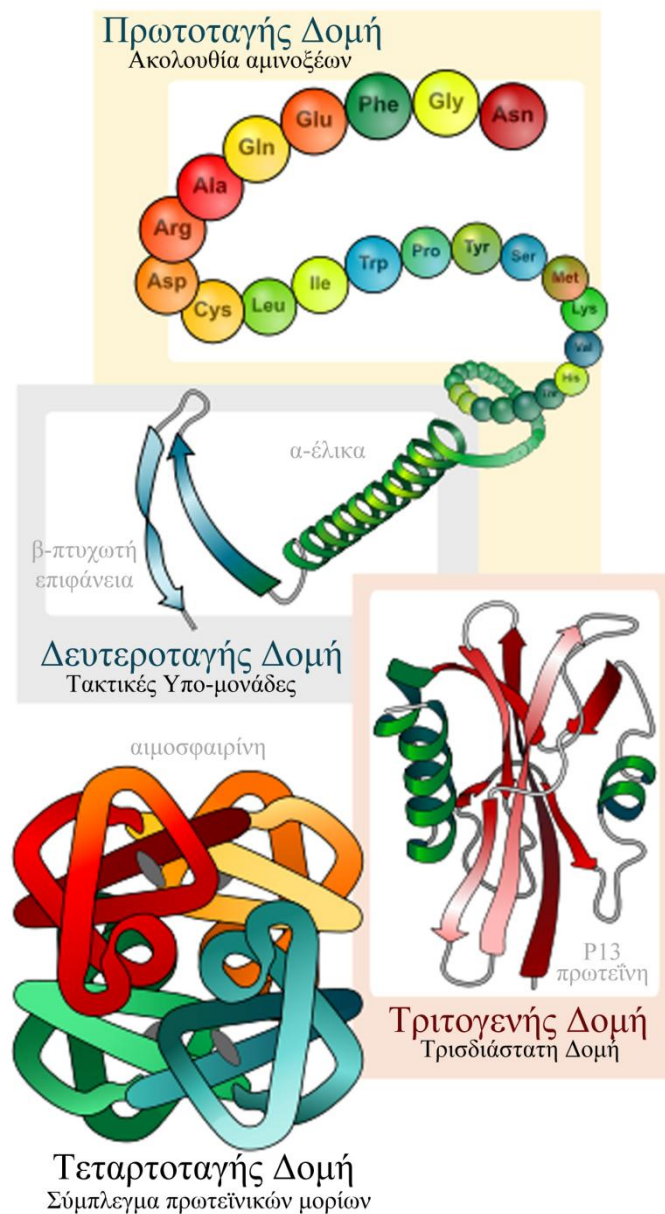
Οι πρωτεΐνες ευθύνονται για τις λειτουργίες που επιτελούνται μέσα σε ένα οργανισμό (π.χ. έκκριση ουσιών), ενώ μπορεί να έχουν και δομικό ρόλο (π.χ. κερατίνη). Οι πρωτεΐνες είναι αυτές που τελικά προσδιορίζουν το φαινότυπο του οργανισμού με βάση το γονότυπο που περιέχεται στο DNA των οργανισμών. Είναι πολυπεπτίδια, δηλαδή γραμμικές αλυσίδες αμινοξέων, που δημιουργούνται μέσα στο κύτταρο.

Η μονοδιάστατη αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης ονομάζεται πρωτοταγής δομή και ο τρόπος οργάνωσης της πρωτεΐνης στο χώρο κρύβεται στη πρωτοταγή δομή της. Η δευτεροταγής δομή αναφέρεται στην αναδίπλωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων σε κανονικές επαναλαμβανόμενες δομές λόγω των δεσμών υδρογόνου, δηλαδή στη δημιουργία υπομονάδων χωρικής οργάνωσης, όπως α-έλικα (alpha helix), β-πτυχωτή επιφάνεια (β-pleated sheet), στροφή (turn).

Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών αναφέρεται στην πλήρη στερεοδιάταξη όλων των δομικών μονάδων και είναι αυτή που τελικά καθορίζει τη βιολογική λειτουργία τους. Η

πρωτεΐνη υπό την επίδραση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων (ηλεκτροστατικές δυνάμεις, δυνάμεις Van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, υδρογονικοί δεσμοί) έχει τη τάση να αναδιπλώνεται στο χώρο και να αποκτά μια τρισδιάστατη μορφή. Επιπλέον είναι γνωστή η άμεση σχέση της τριτοταγούς δομής με τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Για παράδειγμα, μια κοιλότητα στη δομή της πρωτεΐνης μπορεί να αποτελέσει περιοχή πρόσδεσης ενός άλλου μορίου, όπως DNA, άλλης πρωτεΐνης ή ενός φαρμάκου.

Η τεταρτοταγής δομή αναφέρεται στην οργάνωση στο χώρο δύο ή και περισσότερων όμοιων ή διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων, που ονομάζονται πρωτομερή. Τα πρωτομερή συνδέονται μεταξύ τους όχι με χημικούς δεσμούς, αλλά με δευτερεύοντες ηλεκτροστατικούς δεσμούς (όπως ιονικούς, δεσμούς υδρογόνου, δυνάμεις Van der Waals). Τα διάφορα επίπεδα οργάνωσης της πρωτεΐνης παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.9.



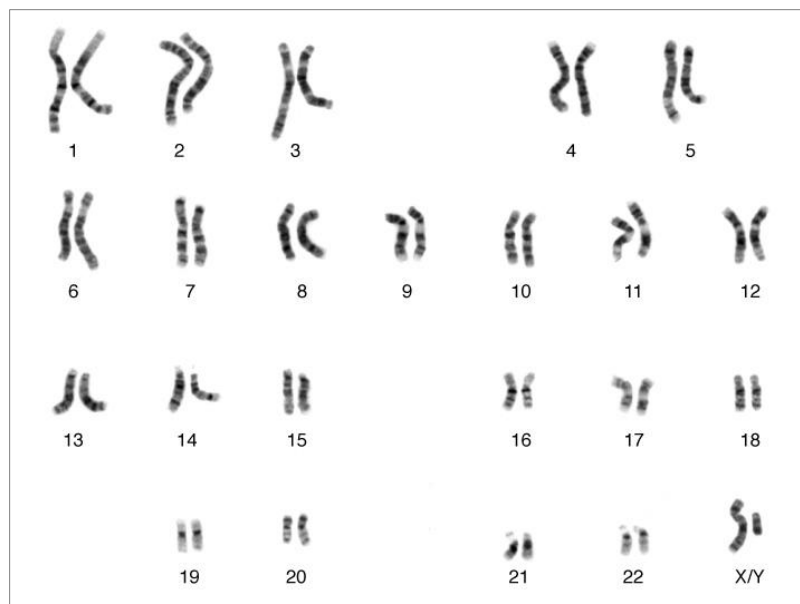
Σχήμα 1.9: Επίπεδα οργάνωσης της δομής μιας πρωτεΐνης

1.6 Χρωμοσώματα του ανθρώπου – Καρυότυπος

Μέσα στο κύτταρο, το DNA συνδέεται με πρωτεΐνες και το κάθε DNA με τις συνδεδεμένες πρωτεΐνες ονομάζεται χρωμόσωμα. Αυτή η οργάνωση ισχύει για προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα, ακόμα και για ιούς. Το πακετάρισμα του DNA σε χρωμοσώματα εξυπηρετεί διάφορες σημαντικές λειτουργίες. Αρχικά, το χρωμόσωμα είναι μια συμπαγής μορφή του DNA που χωράει εύκολα μέσα στο κύτταρο. Δεύτερον, το πακετάρισμα του DNA σε χρωμοσώματα εξυπηρετεί στη προστασία του DNA από βλάβες. Επιπρόσθετα, μόνο το πακεταρισμένο DNA σε χρωμοσώματα μπορεί να διαβιβάζεται αποτελεσματικά στα θυγατρικά κύτταρα κάθε φορά που το κύτταρο διαιρείται. Τέλος, το χρωμόσωμα προσφέρει μια συνολική οργάνωση σε κάθε μόριο του DNA. [3]

Το μισό μοριακό βάρος του χρωμοσώματος είναι πρωτεΐνη. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα κομμάτια του DNA που πακετάρονται με πρωτεΐνες και σχηματίζουν τα ινίδια χρωματίνης και η πλειοψηφία των συνδεδεμένων πρωτεϊνών είναι μικρές βασικές πρωτεΐνες που ονομάζονται ιστόνες. Ακόμη, αν και δεν είναι τόσο άφθονες, άλλες πρωτεΐνες, που συχνά αναφέρονται ως μη-ιστόνες, συνδέονται με τα χρωμοσώματα. [3]

Ένα ανθρώπινο κύτταρο περιέχει 46 χρωμοσώματα (23 ζεύγη). Κάθε ανθρώπινο χρωμόσωμα περιέχει περίπου, κατά μέσο όρο, $1,3 \times 10^8$ ζεύγη βάσεων (bp) του DNA. Η απεικόνιση των χρωμοσωμάτων ενός ατόμου σε ζεύγη και κατά ελαττωμένο μέγεθος ονομάζεται Καρυότυπος (Εικόνα 1.1) Από τα 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων, τα 22 ζεύγη ονομάζονται αυτοσωμικά και είναι ίδια μορφολογικά στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα. Το 23^ο ζεύγος στα θηλυκά άτομα αποτελείται από δύο X χρωμοσώματα, ενώ στα αρσενικά αποτελείται από ένα X και ένα Y χρωμόσωμα. Τα χρωμοσώματα αυτά ονομάζονται φυλετικά και καθορίζουν το φύλο. Τα απλοειδή κύτταρα του ανθρώπου έχουν 23 χρωμοσώματα. [3]



Εικόνα 1.1: Καρυότυπος φυσιολογικού άρρενος (χρώση G). [4]

1.7 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια διαταραχή των κυττάρων και, παρά το γεγονός ότι συνήθως εμφανίζεται ως όγκος που αποτελείται από μια μάζα κυττάρων, ο ορατός όγκος είναι το τελευταίο αποτέλεσμα μιας ολόκληρης σειράς αλλαγών, οι οποίες ενδέχεται να χρειαστούν χρόνια για να αναπτυχθούν. [7] Ο καρκίνος οφείλεται σε αποτυχίες των μηχανισμών που συνήθως ελέγχουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι απώλειες της κυτταρικής ρύθμισης, που οδηγούν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις σε καρκίνο, οφείλονται σε μεταλλάξεις γονιδίων σωματικών κυττάρων. [8]

Πριν προχωρήσουμε, θα πρέπει να αναφέρουμε τι είναι μετάλλαξη. Μετάλλαξη είναι η διαδικασία με την οποία το γενετικό υλικό υποβάλλεται σε ανιχνεύσιμες και κληρονομήσιμες δομικές αλλαγές ή το αποτέλεσμα της αλλαγής αυτής. Τρεις κατηγορίες μεταλλάξεων αναγνωρίζονται: οι γενοτυπικές μεταλλάξεις (genome mutations), στις οποίες συμβαίνει προσθήκη ή αφαίρεση ενός ή περισσότερων ολόκληρων χρωμοσωμάτων, οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις (chromosome mutations), όπου επηρεάζεται η δομή ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων και οι γονιδιακές μεταλλάξεις (gene mutations), όπου η δομή ενός γονιδίου μεταβάλλεται σε μοριακό επίπεδο. [5] Μεταλλάξεις μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε σωματικό ή γεννητικό κύτταρο. Μόνο οι μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων μπορεί να μεταβιβαστούν από τη μία γενιά στην επόμενη και είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία κληρονομικών ασθενειών. [6]

Υπάρχουν δύο είδη γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση: Τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Ο καρκίνος σε γενετικό επίπεδο είναι το αποτέλεσμα της μετατροπής πρωτο-ογκονιδίων σε ογκογονίδια, της απουσίας λειτουργικότητας ογκοκατασταλτικών γονιδίων και της αδρανοποίησης των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA.

Από τα ογκογονίδια, σχεδόν όλα προέρχονται από φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια (δηλαδή πρωτο-ογκογονίδια) και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προωθούν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Για παράδειγμα, ορισμένες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πρωτο-ογκογονίδια αποτελούν μέρος της κυτταρικής επικοινωνίας και ενεργούν ως αυξητικοί παράγοντες (growth factors). Άλλες πρωτεΐνες είναι υποδοχείς στη κυτταρική μεμβράνη και λαμβάνουν αυτά τα αυξητικά σήματα (growth signals). Μερικές είναι σηματοδοτικά μόρια (signal molecules) μέσα στο κύτταρο που διαβιβάζουν τις πληροφορίες που συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Άλλες συνδέονται ακόμα και απευθείας στο DNA, για να ενεργοποιήσουν και να απενεργοποιήσουν τη γονιδιακή έκφραση, που σημαίνει ότι ρυθμίζουν την παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών από συγκεκριμένα γονίδια. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες λειτουργούν από κοινού για να πραγματοποιηθεί η κυτταρική διαίρεση. [9]

Η μετατροπή ή η ενεργοποίηση ενός πρωτο-ογκονιδίου σε ογκογονίδιο περιλαμβάνει μια gain-of-function μετάλλαξη, δηλαδή μια μετάλλαξη που έχει ως αποτέλεσμα μία πρωτεΐνη να αποκτά μια νέα λειτουργία. Τουλάχιστον τέσσερις μηχανισμοί μπορούν να παράγουν ογκογονίδια από τα αντίστοιχα πρωτο-ογκογονίδια:

- Σημειακή μετάλλαξη (δηλαδή την αλλαγή σε ένα ζεύγος βάσεων) σε ένα πρωτο-ογκογονίδιο που έχει ως αποτέλεσμα την σύσταση ενός ενεργού πρωτεϊνικού προϊόντος

- Χρωμοσωμική μετατόπιση που συγχωνεύει δύο γονίδια μαζί και παράγεται ένα υβριδικό γονίδιο που κωδικοποιεί μια νέα πρωτεΐνη
- Χρωμοσωμική μετατόπιση που φέρνει ένα ρυθμιστικό γονίδιο υπό τον έλεγχο ενός διαφορετικού υποκινητή και προκαλεί ακατάλληλη έκφραση του γονιδίου. Υποκινητές είναι ειδικές περιοχές που προσδέεται ένα ένζυμο, η RNA πολυμεράση και καταλύει τη μετεγγραφή
- Ενίσχυση (Amplification) ενός DNA τμήματος συμπεριλαμβανομένου ενός πρωτο-ογκογονιδίου, έτσι ώστε να υπάρχουν πολυάριθμα αντίγραφα, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται.

Το ογκογονίδιο που σχηματίζεται με έναν από τους δύο πρώτους μηχανισμούς, κωδικοποιεί μια “ογκοπρωτεΐνη” (oncogene) που διαφέρει από τη φυσιολογική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο πρωτο-ογκογονίδιο. Αντιθέτως, οι άλλοι δύο μηχανισμοί δημιουργούν ογκογονίδια όπου τα πρωτεϊνικά προϊόντα τους είναι πανομοιότυπα με τις φυσιολογικές πρωτεΐνες. Η επίδρασή τους οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών από τα φυσιολογικά επίπεδα ή παραγωγή πρωτεϊνών σε κύτταρα όπου φυσιολογικά δεν παράγονται. [8]

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που γενικά αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η Low-of-function μεταλλάξεις, δηλαδή μια μετάλλαξη που εμποδίζει τη λειτουργία του γονιδίου (χωρίς απαραίτητα να το εξαφανίζει), σε ένα ή περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια συνεισφέρουν στη ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνων. Πέντε γενικές κατηγορίες πρωτεϊνών έχουν αναγνωριστεί ότι κωδικοποιούνται από ογκοκατασταλτικά γονίδια:

- Ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν ή αναστέλλουν την εξέλιξη μέσα σε ένα συγκεκριμένο στάδιο του κυτταρικού κύκλου
- Υποδοχείς ή μορφοτροπείς σήματος για εκκρινόμενες ορμόνες ή αναπτυξιακά σήματα που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων
- Checkpoint-control πρωτεΐνες που σταματούν τον κυτταρικό κύκλο αν το DNA έχει υποστεί ζημιά ή αν τα χρωμοσώματα είναι μη-φυσιολογικά
- Πρωτεΐνες που προάγουν την απόπτωση. Υπενθυμίζουμε ότι ο όρος απόπτωση αναφέρεται σε έναν γενετικά προκαθορισμένο εσωτερικό αυτοκαταστροφικό μηχανισμό, ο οποίος ενεργοποιείται κάτω από διάφορες καταστάσεις όπως η μορφογένεση, η φυσιολογική ανανέωση κυττάρων σε ιστούς που ανανεώνονται, η ανοσολογική ρύθμιση, η αποστέρηση ορμονών και άλλων τροφικών παραγόντων, οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι και τα κακοήθη νεοπλασμάτα.
- Ένζυμα που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA.

Αν και τα ένζυμα που επιδιορθώνουν το DNA δεν εμποδίζουν άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στα κύτταρα που έχουν χάσει την ικανότητα να επιδιορθώνουν τα σφάλματα, κενά ή σπασμένα άκρα του DNA, συσσωρεύονται μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. [8]

Δεδομένου ότι κατά κανόνα ένα αντίγραφο ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου αρκεί για να ελέγξει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, πρέπει να χαθούν ή να αδρανοποιηθούν και τα δύο αλληλόμορφα του ογκοκατασταλτικού γονιδίου έτσι ώστε να προωθηθεί η ανάπτυξη

όγκου. Σε πολλές μορφές καρκίνου, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια παρουσιάζουν σημειακές μεταλλάξεις ή ελλείψεις βάσεων που εμποδίζουν την παραγωγή των πρωτεϊνών ή οδηγούν σε κωδικοποίηση μη-λειτουργικής πρωτεΐνης. Ένας άλλος μηχανισμός για την αδρανοποίηση του ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι μεθυλίωση των καταλοίπων της κυτοσίνης (C) στον υποκινητή ή σε άλλα στοιχεία ελέγχου. Ως μεθυλίωση θεωρείται η διεργασία με την οποία προστίθενται μεθυλομάδες (CH₃) σε ορισμένα νουκλεοτίδια του γονιδιακού DNA. Αυτό επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων, επειδή το μεθυλιωμένο DNA δεν μεταγράφεται εύκολα.[8]

Οι επιστήμονες και οι ιατροί, αναλύοντας τον καρκίνο στον άνθρωπο, αναγνωρίζουν τρεις κατηγορίες καρκίνων: σποραδικός (sporadic), οικογενής (familial) και κληρονομικός (inherited). Σποραδικοί χαρακτηρίζονται οι καρκίνοι που οι κληρονομικοί παράγοντες δε φαίνεται να συμβάλλουν στον κίνδυνο καρκίνου, δηλαδή δεν υπάρχει καμιά οικογενειακή ιστορία για το συγκεκριμένο καρκίνο. Σποραδικοί καρκίνοι είναι μακράν από τους πιο κοινούς καρκίνους. Οικογενείς καρκίνοι είναι αυτοί που έχουν μερικές περιπτώσεις καρκίνου στην οικογένεια αλλά δεν υπάρχει σαφές μοτίβο. Ο κληρονομικός καρκίνος είναι σπάνιος (5-10% όλων των καρκίνων) και η καρκινική ευαισθησία κληρονομείται από το γονέα στο παιδί. [9]

Όπως είναι φανερό ο καρκίνος δεν προκαλείται από μία μετάλλαξη αλλά από τη συσσώρευση αρκετών γενετικών αλλαγών στα κύτταρα. Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η ακτινοβολία ή χημικές ουσίες. [8]

Ακόμη, ο καρκίνος μπορεί να μεταναστεύει σε άλλους ιστούς του οργανισμού. Μετάσταση ονομάζεται η μετακίνηση καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο σε άλλα σημεία του οργανισμού, μέσω των αιμοφόρων ή των λεμφοφόρων αγγείων, με επακόλουθο το σχηματισμό νέου κακοήθους όγκου.

Βιβλιογραφία – Πηγές 1^{ου} Κεφαλαίου

- [1] Stephen R. Bolsover, Jeremy S. Hyams, Elizabeth A. Shephard, Hugh A. White, Claudia G. Wiedemann (2004), *Cell Biology: A Short Course*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- [2] Nakamoto T (March 2009), Evolution and the universality of the mechanism of initiation of protein synthesis.
- [3] James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P. Bell and Alexander Gann (2003), *Molecular Biology of the Gene*, Fifth Edition
- [4] National Human Genome Research Institute:
<http://www.genome.gov/glossary/index.cfm?p=viewimage&id=114>
- [5] Teresa Atwood, Peter Campbell, Howard Parish, Tony Smith (2006), *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*
- [6] Richard M. Twyman (1998), *Advanced Molecular Biology A Concise Reference*
- [7] Margaret A. Knowles and Peter J. Selby (2005), *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*
- [8] Berk, Matsudaira Lodish (2004), *Molecular Cell Biology* Fifth Edition
- [9] Donna M. Bozzone (2007), *Cancer Genetics (The Biology of Cancer)*
- [10] Κ. Σπ. Νικήτα (2011), Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων
- [11] Chiang YS, Gelfand TI, Kister AE, Gelfand IM (2007), New classification of supersecondary structures of sandwich-like proteins uncovers strict patterns of strand assemblage, *Proteins*. 68(4): 915–921
- [12] D. S. Eggleston, Catherine D. Prescott and Neil D. Pearson (1998), The many faces of RNA.
- [13] Gerald Audesirk, Teresa Audesirk (1999), *Biology: Life on Earth*.
- [14] Nancy W. Vensko, JD and Steven M. Ferguson, *Research Discoveries After Kubin, Tomorrows Technol Transf*. 2010 ; 2(1): 46–58.

Κεφάλαιο 2^ο: Βιοπληροφορική

2.1 Εισαγωγή στη Βιοπληροφορική

Η Βιοπληροφορική αποτελεί ένα νέο διεπιστημονικό πεδίο που συνεργάζεται η μοριακή βιολογία με την επιστήμη των υπολογιστών. Η Βιοπληροφορική περιλαμβάνει τη χρήση ηλεκτρονικών βάσεων δεδομένων και αλγορίθμων για την ανάλυση πρωτεϊνών, γονιδίων και πλήρων γονιδιωμάτων οργανισμών. [1,2]

Μια σημαντική πρόκληση στον τομέα της βιολογίας, είναι να διαχειριστεί τις τεράστιες ποσότητες δεδομένων που δημιουργούνται από γονιδιωματική, την πρωτεϊνωμική (proteomics), στη δομική και συστημική βιολογία, στην πληθυσμιακή και περιβαλλοντική βιολογία αλλά και στην ιατρική. Τα εργαλεία της Βιοπληροφορικής περιλαμβάνουν προγράμματα ηλεκτρονικών υπολογιστών που βοηθούν για να αποκαλυφθούν οι θεμελιώδεις μηχανισμοί των βασικών βιολογικών προβλημάτων που σχετίζονται με τη δομή και τη λειτουργία των μακρομορίων, βιοχημικά μονοπάτια, διαδικασίες ασθενειών και την εξέλιξη. [1,2]

Σύμφωνα με τον ορισμό των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας (National Institutes of Health – NIH), η Βιοπληροφορική είναι “η έρευνα, η ανάπτυξη, ή η εφαρμογή των υπολογιστικών εργαλείων και προσεγγίσεων για επέκταση της χρήσης των βιολογικών ή ιατρικών δεδομένων ή δεδομένων συμπεριφοράς ή υγείας, συμπεριλαμβανομένων εκείνων για την απόκτηση, αποθήκευση, οργάνωση, ανάλυση, ή απεικόνιση αυτών των δεδομένων”. Η Υπολογιστική Βιολογία (computational biology) είναι “η ανάπτυξη και εφαρμογή της ανάλυσης δεδομένων και θεωρητικών μεθόδων, μαθηματικών μοντέλων και τεχνικές υπολογιστικής προσομοίωσης για τη μελέτη των βιολογικών και κοινωνικών συστημάτων και συστημάτων συμπεριφοράς”. [3]

Σημαντικοί επιμέρους κλάδοι της Βιοπληροφορικής και της Υπολογιστικής Βιολογίας περιλαμβάνουν:

- Την ανάπτυξη και την εφαρμογή των εργαλείων που επιτρέπουν την αποτελεσματική πρόσβαση στη χρήση και διαχείριση των διαφόρων τύπων πληροφοριών
- Ανάπτυξη νέων αλγορίθμων και στατιστικών στοιχείων για την ανάλυση και την ερμηνεία των δεδομένων. [1,4]

Η Βιοπληροφορική ασχολείται, πιο συγκεκριμένα, με την στοίχιση και σύγκριση ακολουθιών DNA, RNA και πρωτεϊνών, την εύρεση γονιδίων σε ακολουθίες DNA και χαρτογράφηση τους στα χρωμοσώματα, την πρόβλεψη της δομής του DNA και του RNA, την κατηγοριοποίηση και πρόβλεψη της δομής των πρωτεϊνών, την πρόβλεψη της λειτουργίας των πρωτεϊνών και τον σχεδιασμό μορίων και πρόσδεση (docking).

Ακόμη η Βιοπληροφορική ασχολείται τελευταία και νέες περιοχές που αφορούν υψηλότερα επίπεδα οργάνωσης της βιολογικής πληροφορίας και περιλαμβάνουν τη πρωτεϊνωμική (proteomics), τη μεταβολομική (metabolomics) και τη μεταγραφομική (transcriptomics). Η πρωτεϊνωμική ασχολείται με τη κατηγοριοποίηση και τη πρόβλεψη της δομής των πρωτεϊνών, μελετώντας το σύνολο των πρωτεϊνών που προκύπτουν από τη μετάφραση του RNA, τις πρωτεϊνικές ισόμορφες που προέρχονται από δομικές και βιοχημικές μεταβολές των πρωτεϊνών, τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα που σχηματίζονται κατά

τη σύνδεση πολλών πρωτεϊνών, και παράλληλα προχωρά σε έρευνες σχετικές με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ όλων αυτών των βιομορίων. [2] Η μεταβολομική είναι η συστηματική μελέτη και ανάλυση των μεταβολικών αποτυπωμάτων που αφήνουν πίσω συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες. Η μεταβολομική αντιπροσωπεύει τη συλλογή όλων των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό κύτταρο, ιστό, όργανο ή οργανισμό, που είναι τα τελικά προϊόντα των κυτταρικών διαδικασιών. Έτσι, ενώ τα δεδομένα για την έκφραση των γονιδίων και για την πρωτεομική ανάλυση δεν εξηγούν ακριβώς τι μπορεί να συμβαίνει σε ένα κύτταρο, το μεταβολικό προφίλ μπορεί να δώσει μια στιγμιαία εικόνα της φυσιολογίας του κυττάρου. [5] Η μεταγραφομική στοχεύει στη διεξοδική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, ερευνώντας το μεταγράφομα του γονιδιώματος. [2]

Οι προσδοκίες της ιατρικής από αυτούς τους κλάδους, που επεξεργάζονται τη βιολογική πληροφορία στα ανώτερα επίπεδα οργάνωσης του κυττάρου, είναι τεράστιες. Η πρωτεϊνωμική έχει ιδιαίτερα σημαντική κλινική λειτουργία: πρωτεΐνες που διενεργούν κυτταρικές λειτουργίες, που περιλαμβάνονται σε φαρμακευτικούς στόχους και συχνά συμμετέχουν ή και υποδεικνύουν παθολόγους νόσους. Για παράδειγμα, ένας ιατρός μπορεί να λάβει δείγμα αίματος και να προβεί στην εξέταση για τη λειτουργία του συκωτιού (liver function test²), στην οποία συγκεκριμένα ένζυμα (π.χ. η τρανσαμινάση της αλανίνης - ALT, SGPT) είναι αυξημένα στην περίπτωση της ηπατικής δυσλειτουργίας. [6] Ακόμη, στους λεγόμενους «σιωπηλούς όγκους», η πρωτεϊνωμική επιτρέπει τον προσδιορισμό βιολογικών δεικτών (biomarkers), για τους οποίους ούτε το πλήθος ούτε η συγκέντρωση ήταν γνωστά μέχρι σήμερα, καθιστώντας με αυτό τον τρόπο εφικτή τη πρόμη διάγνωση (π.χ. καρκίνος ωοθηκών). [2] Ως εκ τούτου, ο εντοπισμός των κλινικά σημαντικών πρωτεϊνικών βιοδεικτών του φαινοτύπου και της βιολογικής λειτουργίας είναι μια συναρπαστική και αναπτυσσόμενη περιοχή έρευνας, που υπόσχεται να επεκτείνει τις διαγνωστικές δυνατότητες και το επόμενο βήμα θα είναι ο σχεδιασμός κατάλληλων φαρμάκων.

Η χρήση των βιοδεικτών από εύκολα προσβάσιμα βιολογικά υγρά (π.χ. αίμα, ούρα) έχει πολλά πλεονεκτήματα για την αξιολόγηση της κατάστασης των ιστών και των οργάνων που είναι δύσκολα προσβάσιμα. Τα βιολογικά υγρά (biofluids) περιέχουν πρωτεΐνες και θραύσματα πρωτεϊνών, που απελευθερώνονται από τα κύτταρα του σώματος, είτε ως απόβλητα, είτε για να επικοινωνήσουν με άλλα κύτταρα ή ιστούς. [6]

Η πρωτεϊνωμική, η μεταβολομική και η μεταγραφομική βρίσκονται σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης, καθώς η αναλογία μικρού μεγέθους βιολογικού δείγματος και τεράστιου αριθμού παραμέτρων, επιβάλλει περισσότερες παρατηρητικές μελέτες. Οι βιολογικοί οργανισμοί, όμως, δεν είναι απλές συλλογές συστατικών ή επιμέρους συστημάτων, αλλά η σύνθεσή τους. Έτσι, μια νέα συστηματική προσέγγιση είναι απαραίτητη και ξεκίνησε με την Βιολογία των Συστημάτων (Systems Biology). Το βιολογικό σύστημα χαρακτηρίζεται από τη περιγραφή των στοιχείων του και στις αντιδράσεις του στη παρουσία ή μη εξωτερικών ερεθισμάτων.[2]

Συγκεκριμένα, η Βιολογία των Συστημάτων στοχεύει στη πληρέστερη κατανόηση ενός βιολογικού συστήματος και υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές φάσεις που μας βοηθούν σε αυτή τη κατανόηση σε διάφορα επίπεδα. Η πρώτη φάση είναι το σύστημα αναγνώρισης της δομής που μας βοηθάει να κατανοήσουμε τη δομή του συστήματος. Η Δομή προσδιορίζεται τόσο σε υλικό όσο και την αλληλεπίδραση των δομών. Δομές αλληλεπίδρασης παρουσιάζονται ως τα γονιδιακά ρυθμιστικά δίκτυα και βιοχημικά δίκτυα

που προσδιορίζουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης των στοιχείων εντός και μεταξύ των κυττάρων. Ακόμη, η φυσική κατασκευή μιας συγκεκριμένης περιοχής του κυττάρου, η συνολική δομή των κυττάρων και των οργανισμών είναι επίσης σημαντικά, διότι τέτοιες φυσικές δομές επιβάλλουν περιορισμούς στις πιθανές αλληλεπιδράσεις, και το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων έχει επιπτώσεις στο σχηματισμό των φυσικών δομών. Στη δεύτερη φάση, πρέπει να γίνει κατανοητή η δυναμική του συστήματος, δηλαδή η απόκριση του συστήματος σε διάφορα ερεθίσματα. Αυτό απαιτεί ολοκληρωμένες πειραματικές προσπάθειες, μετρήσεις της τεχνολογικής ανάπτυξης, υπολογιστικό μοντέλο ανάπτυξης και θεωρητική ανάλυση. Αρκετές μέθοδοι, όπως η ανάλυση διακλάδωσης, έχουν χρησιμοποιηθεί, αλλά απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να χειριστεί τη δυναμική των συστημάτων σε τρισδιάστατο χώρο. Η τρίτη φάση αποτελεί τις μεθόδους ελέγχου του συστήματος, δηλαδή τον τρόπο που το βιολογικό σύστημα αντιδρά στις διαταραχές και εν συνεχεία επανέρχεται στη φυσιολογική κατάσταση. Μια από τις προσπάθειες είναι να βρεθεί μια θεραπευτική προσέγγιση που βασίζεται σε αυτό το επίπεδο συστήματος. Η επιτυχία στις μεθόδους ελέγχου της κυτταρικής δυναμικής μπορεί να μας δώσει τη δυνατότητα να εκμεταλλεύονται την εγγενή δυναμική του κυττάρου, έτσι ώστε τα αποτελέσματά της μπορούν να έχουν ακριβώς προβλεφθεί και ελεγχθεί. Τέλος, στη τελευταία φάση, έχουμε το σχεδιασμό του συστήματος, δηλαδή τη τροποποίηση και κατασκευή βιολογικών συστημάτων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Βακτήρια και μύκητες μπορούν να επανασχεδιαστούν ώστε να έχει τις επιθυμητές ιδιότητες για την παραγωγή συγκεκριμένων φαρμάκων. [7]

Η μελέτη των βιολογικών συστημάτων σε επίπεδο συστήματος κατέστη δυνατή από την πρόοδο στον τομέα της μοριακής βιολογίας, της γονιδιωματικής, της επιστήμης των υπολογιστών, τις εξελίξεις της τεχνολογίας παραγωγής βιομοριακών δεδομένων, σε επίπεδο γονιδίων και πρωτεϊνών, και άλλων τομέων που ασχολούνται με την πολυπλοκότητα των συστημάτων. Έτσι παρέχονται νέες δυνατότητες για την προσομοίωση, τη μοντελοποίηση και τη ταυτοποίηση του βιολογικού συστήματος. [7]

2.2 Παραγωγή Βιολογικών Δεδομένων

Τα τελευταία χρόνια, το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης έχει γίνει ιδιαίτερα σημαντικό για την κατανόηση των γονιδιωματικών ακολουθιών του DNA. Στην αλληλουχία του γονιδιώματος ενός οργανισμού, ένα από τα σημαντικά ζητήματα είναι ο καθορισμός των γονιδίων που κωδικοποιούνται. Μεγάλης κλίμακας ακολουθίες γονιδίων που εκφράζονται, όπως αυτά που απομονώνονται από τις cDNA βιβλιοθήκες, είναι ανεκτίμητες στην προσπάθεια να εντοπιστούν αλληλουχίες γονιδίων στο γονιδίωμα. [1]

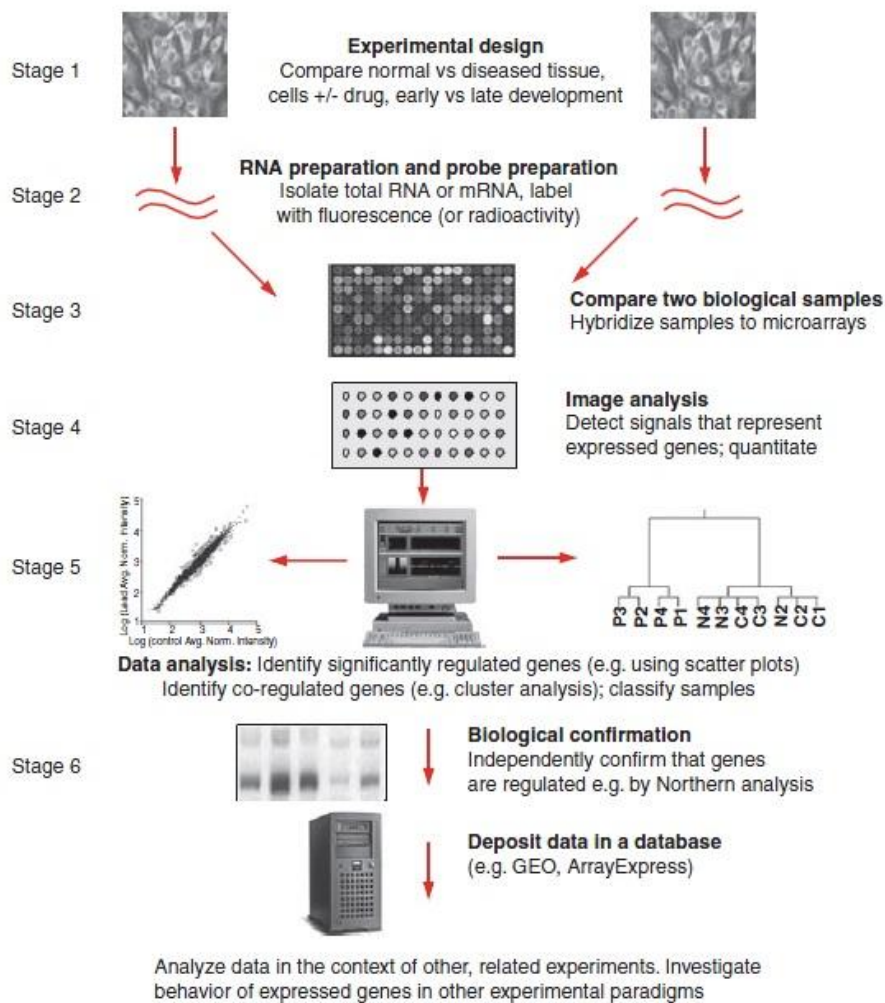
Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (Polymerase Chain Reaction-PCR) του DNA σε συνάρτηση με τις αυτοματοποιημένες μεθόδους αλληλούχισης του DNA οδήγησαν στη πλήρη χαρτογράφηση των γονιδιωμάτων περισσότερων από 100 αρχαίων, προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών και την ολοκλήρωση του Human Genome Project. [2]

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων δίκλωνου DNA μέσα σε λίγες ώρες. Είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την

πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων. Μικροποσότητες RNA μπορούν επίσης να αναλυθούν με τον ίδιο τρόπο, μετά τη μεταγραφή τους σε DNA από την αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR- reverse transcription PCR). [1]

Το συνολικό RNA ή mRNA απομονώνεται από δύο (ή περισσότερα) βιολογικά δείγματα τα οποία είναι συγκρίσιμα. Για την κατασκευή των cDNA βιβλιοθηκών, το RNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA). Το cDNA είναι εγγενώς λιγότερο ευαίσθητο σε πρωτεολυτική ή χημική υποβάθμιση από το RNA και το cDNA μπορεί εύκολα να κλωνοποιηθεί. Η σύνθεση του DNA γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και έτσι παράγονται υβριδικά μόρια cDNA-RNA. Το RNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ενώσεις ή αποσυντίθεται με θέρμανση και τα cDNA χρησιμεύουν σαν καλούπι για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA και έτσι δημιουργούνται δίκλινα μόρια DNA. Τα δίκλινα μόρια εισάγονται σε κατάλληλους φορείς όπως πλασμίδια και κλωνοποιούνται. [1]

Για την παραγωγή βιολογικών δεδομένων υπάρχει η μέθοδος των μικροσυστοιχιών (microarrays). Η μικροσυστοιχία DNA είναι ένα σταθερό προϊόν, όπως μια γυάλινη διαφάνεια μικροσκοπίου ή μία νάιλον μεμβράνη, όπου μια γνωστή αλληλουχία DNA κατατίθεται σε μία συστοιχία πλέγματος. Χιλιάδες γονίδια τοποθετούνται πάνω σε κατάλληλες στερεές επιφάνειες-φορείς. Εν συνεχεία, εξάγονται κατάλληλα μόρια RNA από συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, που για τη σήμανσή τους προστίθεται φθορίζουσα ουσία και τοποθετούνται στις κηλίδες DNA. Το μόριο του RNA θα συνδεθεί με το αντίστοιχο γονίδιο από το οποίο προήρθε. Μετά την απομάκρυνση των ελευθέρων μορίων RNA, η μικροσυστοιχία παρατηρείται από το μικροσκόπιο και αποτυπώνονται τα μόρια του RNA που έχουν δεσμευτεί από τα γονίδια, προσδιορίζοντας με αυτό τον τρόπο τα ενεργά γονίδια των κυττάρων. Πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν αυτή τη τεχνολογία για να αναγνωρίσουν τα υπεύθυνα ενεργά ή ανενεργά γονίδια για μια ασθένεια, από τη σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών κυττάρων.[1,2]



Σχήμα 2.1: Επισκόπηση της διεργασίας υψηλής απόδοσης παραγωγής δεδομένων γονιδιακής έκφρασης με χρήση μικροσυστοιχιών. Στο στάδιο 1 (stage 1), βιολογικά δείγματα επιλέγονται για σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης. Στο στάδιο 2 (stage 2), το RNA απομονώνεται και επισημαίνεται, συχνά με φθορίζουσες χρωστικές. Στο στάδιο 3 (stage 3), αυτά τα δύο δείγματα υβριδοποιούνται σε μικροσυστοιχίες (στέρεα υποστηρίγματα) και συγκρίνονται. Στο στάδιο 4 (stage 4), ανάλυση εικόνας πραγματοποιείται για να αξιολογηθούν οι εντάσεις των σημάτων. Στο στάδιο 5 (stage 5), τα δεδομένα έκφρασης αναλύονται για την αναγνώριση διαφορετικών ρυθμιστικών γονιδίων (π.χ. με scatter sample στα αριστερά του σταδίου 5) ή για την ομαδοποίηση των γονιδίων ή/και των δειγμάτων (cluster analysis στα δεξιά). Με βάση αυτά τα ευρήματα, εκτελείται ανεξάρτητη επιβεβαίωση ότι τα γονίδια είναι ρυθμιστικά (stage 6). Τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών καταχωρίζονται σε μια βάση δεδομένων, έτσι ώστε να μπορούν να πραγματοποιηθούν πάμπολλες αναλύσεις.[1]

Υπάρχουν τρεις προσεγγίσεις για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης: η σύγκριση των cDNA βιβλιοθηκών, η σύγκριση της σειριακής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης (serial analysis of gene expression, SEGA) και η πιο δημοφιλής προσέγγιση για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, οι μικροσυστοιχίες DNA. Μια άλλη πολύ πρόσφατη προσέγγιση είναι η αλληλουχία υψηλής απόδοσης (high throughput) του cDNA. [2]

2.3 Βάσεις Βιολογικών Δεδομένων

Ιδιαίτερα σημαντικός στην εξέλιξη της Βιοπληροφορικής είναι ο ρόλος των βάσεων δεδομένων στις οποίες αποθηκεύονται τα παραγόμενα πειραματικά δεδομένα. Το 1995, η

αλληλουχία του πλήρους γονιδιώματος ενός ελεύθερου ζωντανού οργανισμού, του βακτηρίου *Haemophilus influenzae*, χαρτογραφήθηκε για πρώτη φορά (Fleischmann et al., 1995). Μερικά χρόνια αργότερα από τότε, τα γονιδιώματα χιλιάδων οργανισμών έχουν εντελώς χαρτογραφηθεί, εγκαινιάζοντας μια νέα εποχή για την συλλογή βιολογικών δεδομένων και της προσβασιμότητας των πληροφοριών. Δημόσιες διαθέσιμες βάσεις δεδομένων περιέχουν τώρα δισεκατομμύρια νουκλεοτίδια από ακολουθιακά δεδομένα του DNA που συλλέγονται από πάνω από 260.000 διαφορετικούς οργανισμούς (Kulikova et al., 2007). [1]

Οι τρεις μεγαλύτερες δημόσια προσβάσιμες βάσεις δεδομένων που αποθηκεύουν νουκλεοτιδικές ακολουθίες είναι οι:

- Genbank – National Center for Biotechnology Information (NCBI) του U.S. National Institutes of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>),
- DDBJ – DNA Databank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)
- EMBL – European Molecular Biology Laboratory, UK (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)

Μεταξύ αυτών των τριών βάσεων υπάρχει συνεργασία και έχουν καταφέρει να ανταλλάσουν καθημερινά δεδομένα ώστε να έχουν το ίδιο περιεχόμενο αλλά σε διαφορετικό format. Από αυτές τις τρεις δημόσιες βάσεις αντλούν το περιεχόμενό τους οι περισσότερες υπόλοιπες βάσεις που έχουν ανάλογο είδος δεδομένων. [9-11]

Υπάρχουν επίσης βάσεις δεδομένων που αποθηκεύονται ακολουθίες πρωτεϊνών. Η βάση δεδομένων πρωτεϊνών του National Center for Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) αποτελείται από μεταφρασμένες κωδικοποιημένες περιοχές από την Genbank, καθώς επίσης και από εξωτερικές βάσεις δεδομένων (Protein Information Resource [PIR], SWISS-PROT, Protein Research Foundation [PRF] και Protein Data Bank [PDB]). Το European Bioinformatics Institute (EBI) επίσης προσφέρει πληροφορίες για τις πρωτεΐνες μέσω αυτών των μεγάλων βάσεων δεδομένων [8]. Η UniProt (<http://www.uniprot.org/>, Universal Protein Recourse) ενοποιεί τα δεδομένα που περιέχονται στις τρεις πιο σημαντικές βάσεις δεδομένων: (1) η Swiss-Prot, η οποία θεωρείται η καλύτερα σχολιασμένη βάση με περιγραφές για τη δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών από ειδικούς εμπειρογνώμονες, (2) η μεταφρασμένη EMBL (TrEMBL) βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών η οποία προσφέρει αυτοματοποιημένο σχολιασμό των πρωτεϊνών και (3) η RIP που διατηρεί βάση δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών επιμελημένη από ειδικούς. [12]

Ακόμη, υπάρχουν βάσεις και πλήρων γονιδιωματικών οργανισμών, όπως η GOLD – Genome On Line Database (<http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/bin/gold.cgi>) και η βάση γονιδιωμάτων του NCBI – National Center for Biotechnology Informatics των Η.Π.Α (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome>). [13, 14]

Επιπρόσθετα έχει δημιουργηθεί η βάση δεδομένων OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>) όπου αποτελεί μια βασική πηγή πληροφορίας για γονίδια και σχετιζόμενες γενετικές ασθένειες στον άνθρωπο. Περιλαμβάνει διασυνδέσεις με τη MEDLINE και άλλες βάσεις δεδομένων μέσω του συστήματος Entrez του NCBI. [15]

Τέλος, υπάρχουν αρκετές βάσεις δεδομένων για βιολογικά δεδομένα όπως βάσεις τρισδιάστατων δομών μακρομορίων με πιο σημαντική την PDB – Protein Data Bank, βάσεις δεδομένων σχετικών με την γενετική έκφραση (gene expression data) με πιο οργανωμένη

είναι η συλλογή dbEST του NCBI, βάσεις βιομονοπατιών (biological pathways) όπως η KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) που έχει δεσπόζουσα θέση και η WIT (What Is There?) που αναπτύχθηκε από τα Argonne National Labs, και τέλος βάσεις δημοσιευμάτων, άρθρων και βιογραφικού υλικού με πιο διαδεδομένη τη PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

2.4 Αλγόριθμοι σύγκρισης ακολουθιών

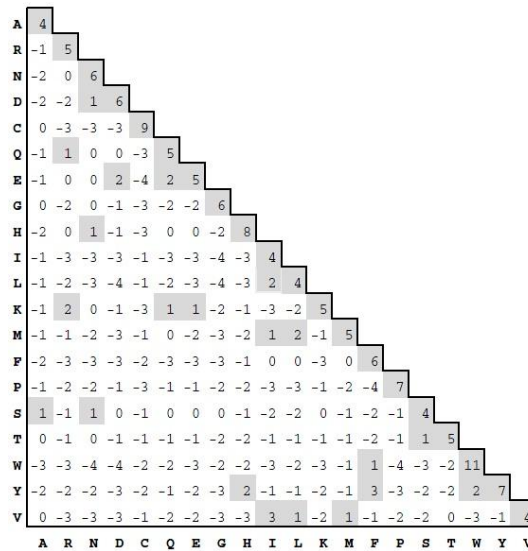
Ένα από τα βασικά ερωτήματα σχετικά με ένα γονίδιο ή μια πρωτεΐνη είναι κατά πόσο συνδέεται με κάποιο άλλο γονίδιο ή πρωτεΐνη. Συγγένεια σε δύο πρωτεΐνες σε επίπεδο ακολουθιών των αμινοξέων δείχνει ότι είναι ομόλογες (homologous). Συγγένεια επίσης δείχνει ότι ίσως έχουν κοινές λειτουργίες. Δύο γονίδια ή πρωτεΐνες είναι ομόλογα (homologous) αν έχουν εξελιχθεί από ένα κοινό πρόγονο. Με την ανάλυση μεγάλων ποσοτήτων DNA και αλληλουχιών πρωτεϊνών, είναι δυνατό να προσδιοριστούν μοτίβα που μοιράζεται από κοινού σε μια ομάδα μορίων. Αυτές οι αναλύσεις της συγγένειας των πρωτεϊνών και γονιδίων επιτυγχάνεται με την στοίχιση (alignment) των ακολουθιών. [1, 16]

Ο όρος στοίχιση ή ευθυγράμμιση (alignment) αναφέρεται στη διαδικασία στοίχισης δύο ακολουθιών με το ένα στοιχείο της μίας κάτω από το αντίστοιχο της άλλης, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή ταυτοποίηση. Με άλλα λόγια, επιθυμητό είναι να βρίσκονται τελικά όσο το δυνατόν περισσότερο κατακόρυφα ζευγάρια ίδιων στοιχείων. [1, 16]

Υπάρχουν δύο τύποι στοίχισης ακολουθιών, η ολική (global) και η τοπική (local). Στη ολική στοίχιση, γίνεται προσπάθεια για την ευθυγράμμιση του συνόλου της ακολουθίας της κάθε πρωτεΐνης ή του DNA, χρησιμοποιώντας όσο το δυνατόν περισσότερους χαρακτήρες, από το ένα άκρο της ακολουθίας ως το άλλο. Ακολουθίες που είναι αρκετά παρόμοιες και περίπου ίδιου μήκους είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για καθολική ευθυγράμμιση. Στην τοπική στοίχιση, το "τέντωμα" της ακολουθίας με την υψηλότερη πυκνότητα των βάσεων ή καταλοίπων ευθυγραμμίζεται, δημιουργώντας έτσι ένα ή περισσότερα αντιστοιχίσαις στις ευθυγραμμιζόμενες ακολουθίες. Οι τοπικές στοίχισεις είναι πιο κατάλληλες για την ευθυγράμμιση ακολουθιών που διαφέρουν σε μήκος ή ακολουθιών που περιέχουν μια διατηρημένη περιοχή ή τομέα. [16]

Η σύγκριση ακολουθιών στοχεύει στην εύρεση των αλλαγών που έχουν συμβεί σε μια ακολουθία κατά τη διάρκεια της εξελικτικής απόκλισης από τον πρόγονό της. Οι αλλαγές μπορεί να είναι αντικαταστάσεις (substitutions), ενθέσεις (insertions) και διαγραφές (deletions). Στις ακολουθίες πρωτεϊνών, οι αντικαταστάσεις συμβαίνουν όταν μια μετάλλαξη σε ένα κωδικόνιο έχει ως αποτέλεσμα το ένα αμινοξύ να αλλάξει σε κάποιο άλλο. Αυτό έχει αποτέλεσμα την στοίχιση δύο μη ταυτόσημων αμινοξέων. Σε μια ακολουθία, περιοχές που αντιστοιχίζονται σε κενά (gaps) στη στοίχιση οφείλονται σε ενθέσεις και διαγραφές. [1]

Οι μέθοδοι στοίχισης διαχωρίζονται σε μεθόδους στοίχισης κατά ζεύγη ή πολλαπλής στοίχισης. Η στοίχιση κατά ζεύγη βρίσκει εφαρμογή και κατά την αναζήτηση ομοιότητας (similarity) μιας ακολουθίας έναντι μιας βάσης δεδομένων, οπότε και στοιχίζεται με κάθε ακολουθία που ανήκει στο σύνολο των ακολουθιών της βάσης. Η μέθοδος πολλαπλής στοίχισης στοιχίζει ταυτόχρονα πολλές ακολουθίες. [1]



Σχήμα 2.3: Ο πίνακας αντικατάστασης BLOSUM62 [18]

2.4.1 Στοιχίση ακολουθιών κατά ζεύγη

Η στοιχίση ανά ζεύγη (pairwise alignment), δηλαδή η στοιχίση μιας ακολουθίας έναντι μιας άλλης με σκοπό την εύρεση ομοιοτήτων μεταξύ τους, βρίσκει εφαρμογή και κατά την αναζήτηση ομοιότητας έναντι μιας βάσης δεδομένων, οπότε και η ακολουθία στοιχίζεται κατά ζεύγη με καθεμία από τις ακολουθίες της βάσης. Για τη στοιχίση κατά ζεύγη μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι dot-plot, αλγόριθμοι δυναμικού προγραμματισμού και ευρετικές μέθοδοι που κάνουν χρήση ευρετηρίου λέξεων. [1]

2.4.1.1 Στοιχίση ακολουθιών με τον αλγόριθμο Needleman-Wunsch

Ένας από τους πιο σημαντικούς αλγορίθμους για τη στοιχίση δύο ακολουθιών πρωτεϊνών περιγράφηκε από τους Saul Needleman και Christian Wunsch (1970), με επακόλουθες τροποποιήσεις από τους Sellers (1974), Gotoh (1982) και άλλους. Ο αλγόριθμος αυτός είναι σημαντικός επειδή παράγει μια βέλτιστη στοιχίση των δύο ακολουθιών πρωτεϊνών ή DNA, ακόμη και επιτρέποντας την εισαγωγή των κενών (gaps). Ο Needleman-Wunsch αλγόριθμος είναι ένα παράδειγμα δυναμικού προγραμματισμού για την εύρεση της βέλτιστης λύσης στοιχίσης ακολουθιών, στον οποίο η βέλτιστη στοιχίση ταυτίζεται με τη μείωση του προβλήματος σε μια σειρά μικρότερες στοιχίσης (υποπροβλήματα) με βάση κατάλοιπο με κατάλοιπο. Μια εξαντλητική σύγκριση κατά ζεύγη θα ήταν πολύ ακριβό υπολογιστικά να εκτελεστεί. [1,16]

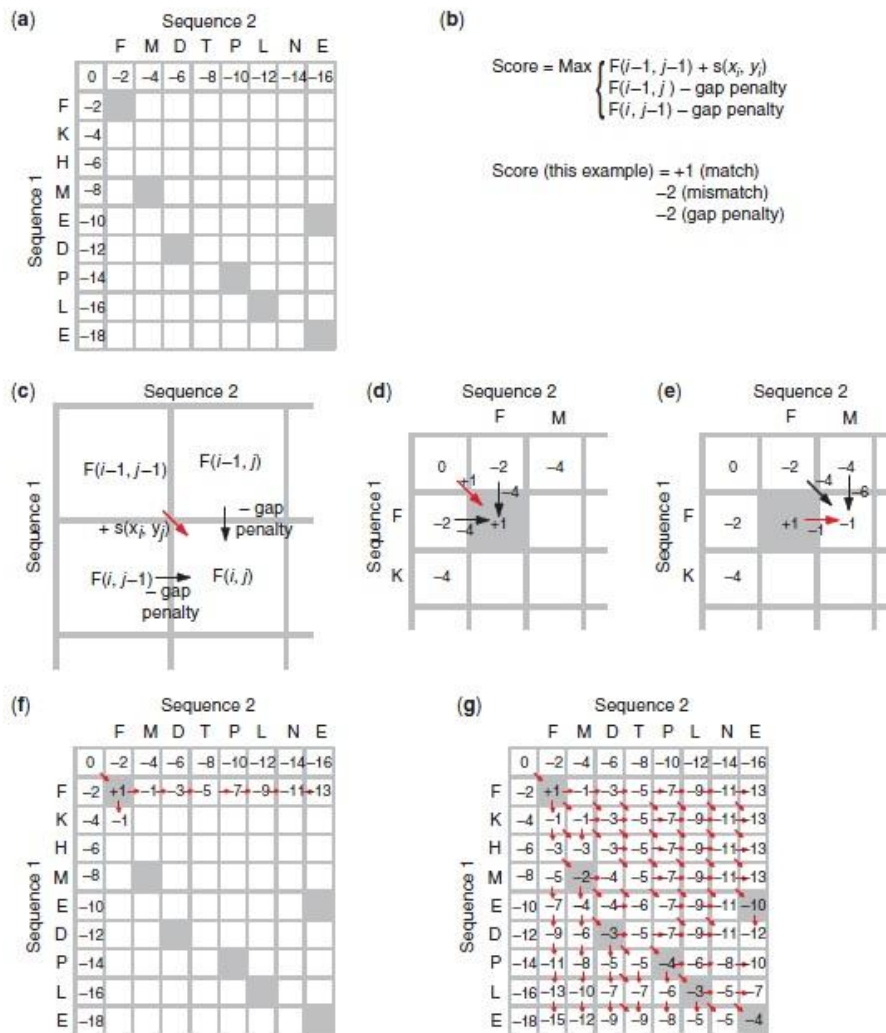
Στον πυρήνα του αλγορίθμου Needleman-Wunsch υπάρχει ένας πίνακας του οποίου οι γραμμές αντιστοιχούν στα σύμβολα της μίας ακολουθίας και οι στήλες στα σύμβολα της άλλης. Κάθε κελί αυτού του πίνακα αντιστοιχεί σε ένα ταίριασμα γραμμάτων των δύο ακολουθιών, και περιέχει δύο τιμές: μια βαθμολογία (που υπολογίζεται με βάση ένα συγκεκριμένο σχήμα) και έναν δείκτη. Μπορούμε να περιγράψουμε την προσέγγιση Needleman-Wunsch για ολική στοιχίση ακολουθιών σε τρία στάδια:

- αρχικοποίηση πίνακα, όπου προσδίδονται τιμές στην πρώτη γραμμή και στην πρώτη στήλη του πίνακα. Αυτό υπονοεί ότι για κάθε κελί της πρώτης γραμμής και της

πρώτης στήλης του πίνακα γίνονται δύο αναθέσεις: ανατίθεται μια βαθμολογία και ένας δείκτης

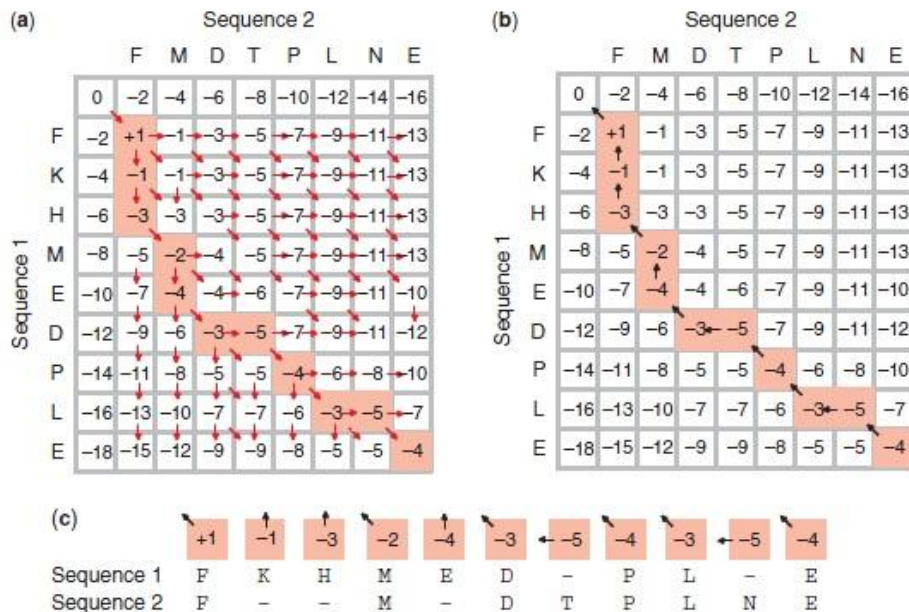
- γέμισμα πίνακα, όπου γεμίζονται τα κελιά του πίνακα με τιμές. Σε αυτήν την φάση σε κάθε κελί του πίνακα ανατίθεται μία βαθμολογία και ένας δείκτης. Αυτή η ανάθεση γίνεται με βάση τις τιμές των γειτόνων του κελιού του πίνακα
- προσδιορισμό της βέλτιστης στοίχισης, όπου ανατρέχουμε τον πίνακα προς τα πίσω για να βρούμε την επιθυμητή στοίχιση. [1,16]

Στο σχήμα 2.4 και σχήμα 2.5 παρουσιάζονται τα στάδια του αλγόριθμου Needleman-Wunsch.



Σχήμα 2.4: Στοίχιση κατά ζεύγη δύο ακολουθιών αμινοξέων χρησιμοποιώντας δυναμικό προγραμματισμό Needleman-Wunsch για ολική στοίχιση. (a) Για ακολουθίες μήκους m και n, σχηματίζουμε έναν πίνακα με διαστάσεις m+1 και n+1 και προσθήκη κενών στη πρώτη γραμμή και στήλη. Κάθε θέση κενού λαμβάνει βαθμολογία -2. Τα κελιά που έχουν ταυτότητα είναι σκιασμένα γκρι. (b) Το σύστημα βαθμολογίας για αυτό το παράδειγμα είναι +1 για αντιστοιχία, -2 για αναντιστοιχία και -2 για ποινή κενού. Σε κάθε κελί, η βαθμολογία εκχωρείται χρησιμοποιώντας τον αναδρομικό αλγόριθμο που προσδιορίζει την υψηλότερη βαθμολογία από τους τρεις υπολογισμούς. (c) Σε κάθε κελί F(i,j) υπολογίζεται η βαθμολογία όπου προέρχονται ακολουθώντας ένα μονοπάτι από το πάνω αριστερό κελί (προσθέτουμε τη βαθμολογία αυτού του κελιού + F(i,j), η βαθμολογία του κελιού προς τα αριστερά (συμπεριλαμβανομένου της ποινής για το κενό) και του κελιού ακριβώς από πάνω (και πάλι συμπεριλαμβανομένου της ποινής για το κενό)). (d) Για να υπολογιστεί η βαθμολογία στο κελί της δεύτερης γραμμής και στήλης, παίρνουμε το μέγιστο από τις τρεις βαθμολογίες +1, -4, -4.

Η καλύτερη βαθμολογία (+1) ακολουθεί τη διαδρομή του κόκκινου βέλους διατηρούμε την πληροφορία της καλύτερης διαδρομής με το αποτέλεσμα της βαθμολογίας κάθε κελιού προκειμένου να ανακατασκευάσουμε αργότερα τη συνετή στοίχιση κατά ζεύγος. (e) Για τον υπολογισμό της βαθμολογίας στο κελί της δεύτερης σειράς και τρίτης στήλης, παίρνουμε και πάλι το μέγιστο των -1, -4, -6. Η καλύτερη βαθμολογία ακολουθεί από το αριστερό κελί (κόκκινο βέλος). (f) Συμπλήρωση όλης της πρώτης γραμμής του πίνακα. (g) Η συμπλήρωση του πίνακα περιλαμβάνει τη συνολική βαθμολογία της βέλτιστης στοίχισης (-4, το κελί κάτω δεξιά, που αντιστοιχεί στο καρβοξύ-άκρο της κάθε πρωτεΐνης). Τα κόκκινα βέλη δείχνουν το μονοπάτι από όπου η μέγιστη βαθμολογία κάθε κελιού προέρχεται. [1]



Σχήμα 2.5: Στοίχιση κατά ζεύγη δύο ακολουθιών αμινοξέων χρησιμοποιώντας αλγόριθμο δυναμικού προγραμματισμού: βαθμολόγηση του πίνακα και διαδικασία ιχνηλάτησης (traceback) για την απόκτηση της στοίχισης. (a) Η στοίχιση του σχήματος 2.2g εμφανίζεται. Τα κελιά που έχουν επισημανθεί αποτελούν τη πηγή του βέλτιστου αποτελέσματος. (b) Σε αντίστοιχη παρουσίαση, τα βέλη δείχνουν πίσω στη πηγή του βέλτιστου αποτελέσματος του κάθε κελιού. (c) Αυτή η ιχνηλάτηση (traceback) μας επιτρέπει να ορίσουμε τη σειρά της βέλτιστης στοίχισης. Κάθετα ή οριζόντια βέλη αντιστοιχούν σε θέσεις προσθήκης κενού, ενώ τα διαγώνια βέλη αντιστοιχούν σε ακριβείς αντιστοιχίσεις (ή αναντιστοιχίες). Να σημειωθεί ότι η τελική βαθμολογία (-4) ισούται με το άθροισμα των αντιστοιχίσεων ($1 \times 6 = 6$), των αναντιστοιχιών (καμία σε αυτό το παράδειγμα) και των κενών ($-2 \times 5 = -10$). [1]

2.4.1.2 Ο αλγόριθμος FASTA

Ο αλγόριθμος FASTA δημιουργήθηκε από τους Lipman και Pearson το 1988 [21] και βασίζεται στην κεντρική ιδέα της αναζήτησης μικρών λέξεων (words ή k-tuples) που εμφανίζονται και στις δύο ακολουθίες. Στην περίπτωση πρωτεϊνικών ακολουθιών το μήκος των λέξεων είναι 1-2 κατάλοιπα (residues) ενώ για ακολουθίες DNA το μήκος μιας λέξης μπορεί να φθάνει τις 6 βάσεις. Ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί ευρεστικές μεθόδους για να δημιουργήσει περιοχές που περιέχουν κοινές λέξεις. Η στοίχιση που προκύπτει περιλαμβάνει διαφορές ανάμεσα σε κοινές λέξεις. Ο αλγόριθμος ολοκληρώνεται σε 4 βήματα:

1. ο αλγόριθμος αναζητά λέξεις μήκους k-_{tip} στον πίνακα δυναμικού προγραμματισμού, που δημιουργείται για τη δοσμένη ακολουθία μικρού μήκους (input query sequence) και μια βιολογική ακολουθία με βάση έναν

πίνακα αντικατάστασης χαρακτήρων. Το μήκος των λέξεων k_{cutp}, αποτελεί βασική παράμετρο του αλγορίθμου και καθορίζεται από το χρήστη. Το πρόγραμμα FASTA προσδιορίζει τα 10 υψηλότερα τμήματα βαθμολόγησης που συντάσσονται για ένα δεδομένο k_{cutp}.

2. Οι εν λόγω 10 περιοχές στοίχισης αναβαθμολογούνται, επιτρέποντας συντηρητικές αντικαταστάσεις, χρησιμοποιώντας έναν πίνακα βαθμολόγησης όπως τον PAM250.
3. Οι περιοχές με υψηλή βαθμολογία ενώνονται αν είναι μέρος των ίδιων πρωτεϊνών.
4. Ο αλγόριθμος FASTA, στη συνέχεια, πραγματοποιεί μία ολική ή τοπική στοίχιση με τις ακολουθίες με την υψηλότερη βαθμολογία, βελτιώνοντας έτσι την στοίχιση της δοσμένης ακολουθίας (query sequence) με την καλύτερη αντιστοίχιση με τη βάση δεδομένων. Έτσι, ο δυναμικός προγραμματισμός εφαρμόζεται στην αναζήτηση της βάσης δεδομένων σε ένα περιορισμένο τρόπο διαμόρφωσης, επιτρέποντας στον αλγόριθμο FASTA να επιστρέψει τα αποτελέσματα του πολύ γρήγορα, επειδή αξιολογεί μόνο ένα μέρος των δυναμικών στοίχισεων.

Το πρόγραμμα FASTA βρίσκεται στο site του EBI (European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastaf/>). [1, 21]

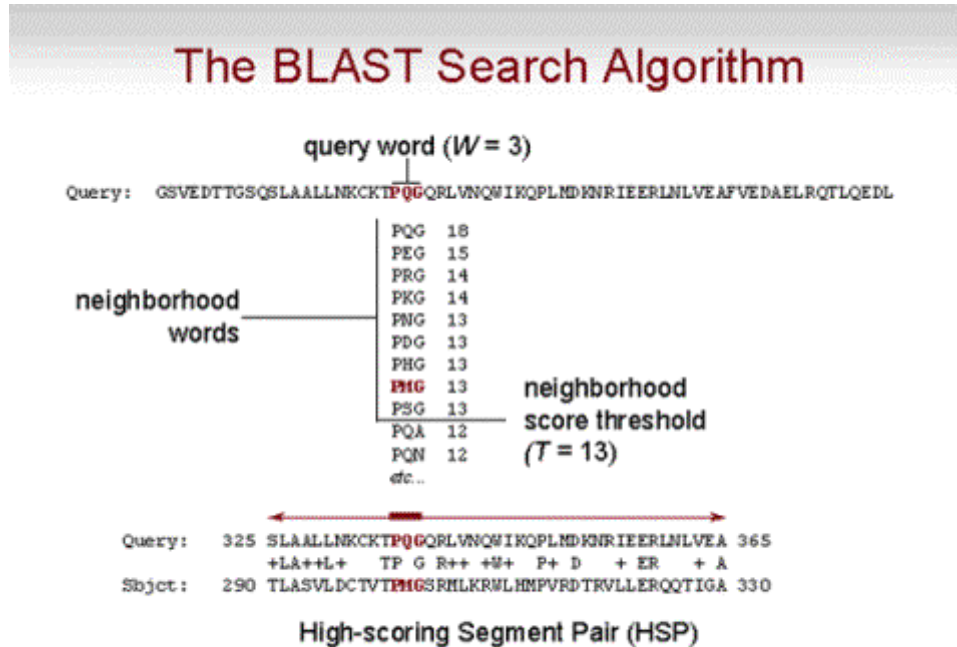
2.4.1.3 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Το BLAST είναι το κύριο εργαλείο του National Center for Bioinformatics Information (NCBI) για τη σύγκριση μιας ακολουθίας πρωτεΐνης ή DNA με άλλες ακολουθίες σε διάφορες βάσεις δεδομένων. Η πρώτη δημοσίευση έγινε το 1990. [19] Από τότε, όμως, έγιναν βελτιώσεις ή επεκτάσεις λόγω της ευρείας αποδοχής και χρήσης του. Η αναζήτηση στο BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) είναι ένας από τους θεμελιώδεις τρόπους εκμάθησης για ένα γονίδιο ή για μία πρωτεΐνη: η αναζήτηση αποκαλύπτει τις συγγενικές αλληλουχίες που βρίσκονται σε ένα οργανισμό ή σε διαφορετικούς οργανισμούς. [1]

Ο αλγόριθμος αναζήτησης BLAST βρίσκει μια αντιστοιχία ανάμεσα σε μία δοσμένη ακολουθία (query) και μια βάση δεδομένων ακολουθιών και στη συνέχεια να επεκτείνει την αντιστοίχιση σε οποιαδήποτε κατεύθυνση. [19, 20] Τα αποτελέσματα της αναζήτησης αποτελείται από δύο υψηλά συγγενικές ακολουθίες από τη βάση δεδομένων καθώς και οριακά συγγενικές ακολουθίες, μαζί με ένα σύστημα βαθμολόγησης για να περιγράψει τον βαθμός συγγένειας μεταξύ της δοσμένης ακολουθίας (query) και κάθε επιτυχημένης απάντησης από τη βάση δεδομένων (database hit). Ο αλγόριθμος blastp (σύγκριση πρωτεΐνης με πρωτεΐνες) μπορεί να περιγραφεί με τρεις φάσεις:

1. Ο αλγόριθμος BLAST μεταγλωττίζει έναν προκαταρκτικό κατάλογο στοιχίσεων κατά ζεύγη, που ονομάζονται ζεύγη λέξεων. Η δοσμένη ακολουθία – query sequence, χωρίζεται σε λέξεις μεγέθους w.
2. Ο αλγόριθμος σαρώνει μια βάση δεδομένων για τα ζεύγη λέξεων που πληρούν κάποιο βαθμολογικό όριο T (threshold).

3. Ο BLAST επεκτείνει τα ζεύγη λέξεων για να βρει αυτά που ξεπερνούν ένα ορισμένο όριο αποκοπής S , όπου σε αυτό το σημείο οι επιτυχημένες απαντήσεις θα παρουσιαστούν στον χρήστη. Τα όρια υπολογίζονται από πίνακες βαθμολόγησης (όπως BLOSUM62) μαζί με τις ποινές των κενών (gap penalties). [1, 16]



Σχήμα 2.6: Ο αλγόριθμος BLAST. Αναζητάει λέξεις μήκους W (προκαθορισμένο = 3 στο blastp) που σημειώνουν βαθμολογία μεγαλύτερη από ένα προκαθορισμένο όριο (Threshold- T) όταν στοιχίζονται με την δοθείσα ακολουθία (query) και με ένα δεδομένο πίνακα υποκατάστασης. Οι λέξεις-γείτονες αναζητούνται στη συνέχεια στις ακολουθίες της βάσης και όταν βρεθούν επεκτείνονται με τη χρήση τοπικής στοίχισης χωρίς κενά, ώστε οι τοπικές στοίχισεις που προκύπτουν να χαρακτηρίζονται από βαθμολογία τουλάχιστον ίση με ένα κατώφλι S . Προκύπτει, έτσι, για κάθε ακολουθία ένα σύνολο από ζεύγη τμημάτων ακολουθιών υψηλής βαθμολογίας (High-scoring Segments Pairs – HSPs) που αποτελεί την έξοδο του BLAST. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η τριπλέτα PQG έχει βρεθεί να στοιχίζεται στην PMG, και καθώς χρησιμοποιείται ο πίνακας BLOSUM62, η βαθμολογία της στοίχισης είναι $13 > T$ ($P-P = 7, G-G = 6, Q-M = 0$). Κατόπιν αυτή η τριπλέτα θα επεκταθεί και προς τις δυο κατευθύνσεις για να δώσει τη μέγιστη τοπική στοίχιση. Τα HSPs που πληρούν αυτά τα κριτήρια θα αναφερθούν από το BLAST, υπό τον όρο ότι δεν υπερβαίνουν τον αριθμό των επιτρεπτόν προς εμφάνιση ακολουθιών.

Μια πλήρης λίστα των παραλλαγών του αλγορίθμου φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Αλγόριθμος	Είδος query	Είδος sequence
BLASTP	Πρωτεΐνη	Πρωτεΐνη
BLASTN	Νουκλεοτίδιο	Νουκλεοτίδιο
BLASTX	Νουκλεοτίδιο	Πρωτεΐνη
TBLASTN	Πρωτεΐνη	Νουκλεοτίδιο
TBLASTX	Νουκλεοτίδιο	Νουκλεοτίδιο

Πίνακας 2.1: Παραλλαγές αλγορίθμου BLAST[22]

2.4.2 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών

Η πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών (Multiple Sequence Alignment – MSA) αναφέρεται στην ταυτόχρονη στοίχιση τριών τουλάχιστον ακολουθιών (πρωτεϊνών, DNA ή και RNA). Η πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών χρησιμοποιείται στην αναγνώριση και αναπαράσταση πρωτεϊνικών οικογενειών και υπερ-οικογενειών, στην αναπαράσταση των χαρακτηριστικών που μεταφέρονται στις ακολουθίες DNA ή στις πρωτεϊνικές ακολουθίες και στην αναπαράσταση της εξελικτικής ιστορίας (φυλογενετικά δέντρα) από ακολουθίες DNA ή πρωτεϊνών. [1, 18]

Η πολλαπλή στοίχιση μεταξύ ακολουθιών βιολογικών δεδομένων αποτελεί συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη σύγκριση και εξερεύνηση βιολογικών ακολουθιών. Για ένα σύνολο ομόλογων ακολουθιών η πολλαπλή στοίχιση χρησιμοποιείται στην πρόβλεψη της δευτερεύουσας δομής νέων ακολουθιών και στην ανακάλυψη διαγνωστικών μοτίβων (diagnostic patterns) οικογενειών. [1, 18]

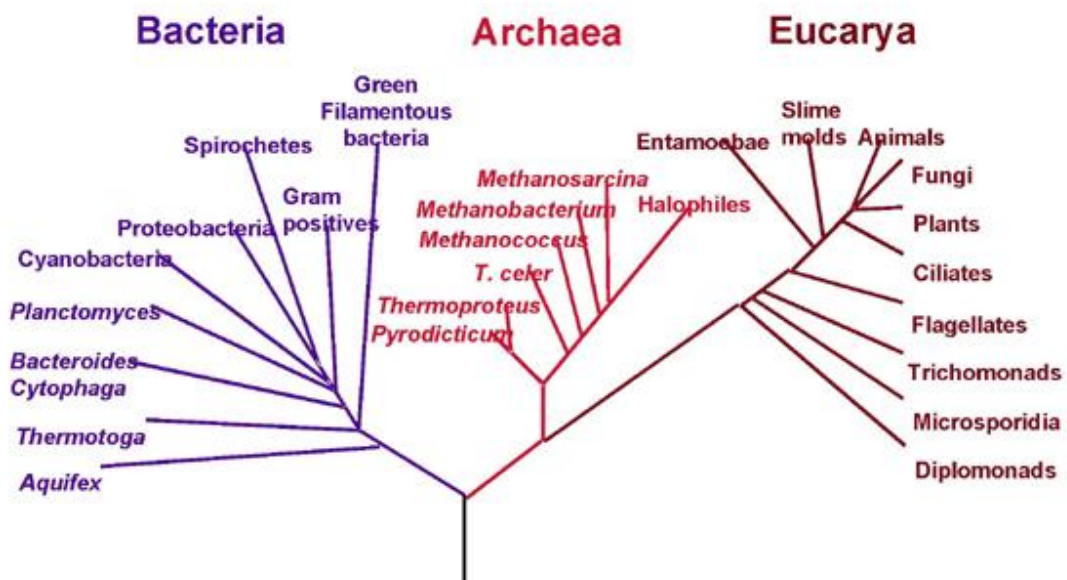
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών περιλαμβάνουν τη χρήση δυναμικού προγραμματισμού, την προοδευτική στοίχιση ακολουθιών, επαναληπτικές μεθόδους, μεθόδους εύρεσης συντηρημένων μοτίβων ακολουθιών (κοινών προτύπων που εμφανίζονται σε ακολουθίες) αλλά και πιθανοτικές ή στοχαστικές μεθόδους (Hidden Markov Models, Simulated Annealing και Γενετικοί αλγόριθμοι). [2]

Το ClustalW είναι το πιο διαδεδομένο πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης βιολογικών ακολουθιών. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί έναν ιδιαίτερα πολύπλοκο αλγόριθμο προοδευτικής στοίχισης (progressive alignment) για να κάνει σταδιακή στοίχιση πολλαπλών πρωτεϊνικών ή νουκλεοτιδικών ακολουθιών. Το πρόγραμμα ClustalW βρίσκεται στο European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). [1]

Ο ευρετικός αλγόριθμος ClustalW εκτελεί όλες τις τοπικές στοιχίσεις ανάμεσα σε όλα τα δυνατά ζεύγη ακολουθιών του συνόλου και υπολογίζει όλες τις βαθμολογίες ομοιότητας. Με βάση αυτές και κάνοντας χρήση του αλγορίθμου neighbor-joining (δημοφιλής αλγόριθμος κατασκευής φυλογενετικών δένδρων) κατασκευάζεται το δέντρο-οδηγό για τις ακολουθίες. Τελικά, η πολλαπλή στοίχιση προκύπτει στοιχίζοντας τις ακολουθίες ανά ζεύγη με δυναμικό προγραμματισμό με τη σειρά που υποδεικνύει το δέντρο-οδηγός. [1,2]

Στα δενδρογράμματα φυλογενετικής ανάλυσης περιλαμβάνονται και τα κλαδογράμματα. Στα κλαδογράμματα νόημα έχουν μόνο οι διασταυρώσεις στο δένδρο, δηλαδή η τοπολογία, και όχι τα μήκη των βραχιόνων. Αντίθετα τα φυλογράμματα, που είναι το κύριο είδος των φυλογενετικών δένδρων, τα μήκη των βραχιόνων αντικατοπτρίζουν την εξελικτική διαφοροποίηση. [23]

Phylogenetic Tree of Life



Σχήμα 2.9: Φυλογενετικό δένδρο, βασισμένο σε δεδομένα tRNA, που δείχνει τον διαχωρισμό των τριών επικρατειών: των βακτηρίων, των αρχαίων και των ευκαρυωτικών.[24]

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων ανήκουν σε μία από τις τρεις κατηγορίες:

- Απόσταση: Υπολογίζονται οι εξελικτικές αποστάσεις μεταξύ των ακολουθιών και το δένδρο κατασκευάζεται από τα κλαδιά προς τη ρίζα με βάση αυτές τις αποστάσεις. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος βασισμένη στην απόσταση είναι ο αλγόριθμος neighbor-joining. Συγκεκριμένα, η δόμηση του εξελικτικού δένδρου ξεκινάει με ένα «δένδρο-αστέρι», όπου όλες οι ταξινομικές μονάδες συνδέονται σε ένα εσωτερικό κόμβο. Στη συνέχεια, το κοντινότερο ζεύγος ταξινομικών μονάδων («γείτονες») συνδέεται με ένα διαφορετικό κόμβο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου το «δένδρο-αστέρι» αποσυντεθεί σε ένα πλήρων δομημένο δένδρο. [25]
- Μέγιστης οικονομίας (Maximum parsimony): Αποσκοπεί στην εύρεση ενός φυλογενετικού δένδρου που απαιτεί τον ελάχιστο αριθμό αντικαταστάσεων

χαρακτήρων για την ερμηνεία των διαφορών των εξεταζόμενων ακολουθιών. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η απλούστερη εξήγηση των δεδομένων είναι πιθανότερα η πλέον ορθή. [26, 27]

- Μέγιστης πιθανοφάνειας (Maximum likelihood): είναι μια πιθανοθεωρητική μέθοδος που αναζητά το εξελικτικό μονοπάτι με τη μέγιστη πιθανότητα για τη παραγωγή των δοθέντων δεδομένων. Για το λόγο αυτό υπολογίζονται οι πιθανότητες που αντιστοιχούν σε κάθε εξελικτική μεταβολή που εκφράζουν τα δυνατά φυλογενετικά δένδρα. [28, 29]

Η φυλογενετική ανάλυση, πέρα από τη θεωρητική μελέτη της εξέλιξης, βρίσκει εφαρμογή σε επιδημιολογικές και φαρμακολογικές μελέτες, αλλά και στη μελέτη μεταλλάσσόμενων παθογόνων συστημάτων. [2]

Βιβλιογραφία-Πηγές 2^ο Κεφαλαίου

- [1] Jonathan Pevsner, Bioinformatics and Functional Genomics, 2009
- [2] Κ. Σπ. Νικήτα, Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων, 2011
- [3] <http://www.bisti.nih.gov/docs/CompuBioDef.pdf>
- [4] Hogeweg, P., Searls, David B. ed., The Roots of Bioinformatics in Theoretical Biology, 2011
- [5] Daviss, Bennett, "Growing pains for metabolomics". The Scientist 19: p. 25–28, April 2005
- [6] G. Alterovitz, M. Xiang, J. Liu, A. Chang, M.F. Ramoni. "System-Wide Peripheral Biomarker Discovery Using Information Theory", Pacific Symposium on Biocomputing, 2008; 231–242
- [7] Sangdun Choi, Introduction to Systems Biology, 2007
- [8] <http://www.ebi.ac.uk/Databases/protein.html>
- [9] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- [10] <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>
- [11] <http://www.ebi.ac.uk/embl/>
- [12] <http://www.uniprot.org/>
- [13] <http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/bin/gold.cgi>
- [14] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome>
- [15] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>
- [16] David W. Mount, Bioinformatics Sequence and Genome Analysis, 2001
- [17] Arthur M. Lesk. Introduction to Bioinformatics. Oxford University Press, 2002
- [18] Andreas D. Baxeavanis and B. F. Francis Ouellette. Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins. John Wiley and Sons, Inc., 2001.
- [19] Stephen F. Altschul, Warren Gish, Webb Miller add Eugene W. Myers, and David J. Lipman. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215, 1990.
- [20] Altschul, S. F., et al. Gapped Blast and PSI-Blast: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25, 3389–3402, 1997
- [21] Pearson, W.R., Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison, Proc Natl Acad Sci., 85(8), 2444-8
- [22] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [23] Roderick D.M. Page, Edward C. Holmes, Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach, 1998
- [24] http://nai.arc.nasa.gov/library/images/news_articles/big_274_3.jpg
- [25] Mailund T, Brodal GS, Fagerberg R, Pedersen CN, Phillips D. (2006) Recrafting the neighbor-joining method. BMC Bioinformatics 7: 29.
- [26] Huelsenbeck JP. (1995) Performance of phylogenetic methods in simulation. Syst Biol 44: 17-48.

[27] Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM. (1996) Phylogenetic inference. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

[28] Felsenstein J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368-376.

[29] Huelsenbeck JP, Crandall KA. (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu Rev Ecol Syst* 28: 437-466

Κεφάλαιο 3^ο: Αυξητικός Παράγοντας SDF-1

3.1 Εισαγωγή στους αυξητικούς παράγοντες

Οι αυξητικοί παράγοντες (growth factors) ορίζονται ως εξωκυτταρικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες (signaling proteins) οι οποίες εμπλέκονται στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων. Οι περισσότεροι αυξητικοί παράγοντες δρουν σε γειτονικά κύτταρα-στόχους, συνδεδεμένοι σε ειδικούς υποδοχείς στη κυτταρική μεμβράνη. Μετά από πρόσδεση στο συγκεκριμένους υποδοχείς, οι αυξητικοί παράγοντες προκαλούν μονοπάτια μεταγωγής σήματος που οδηγούν στην ενεργοποίηση των μηχανισμών επίδρασης στην ανταπόκριση των κυττάρων. [1]

Ένα από τα ζητήματα, που προκαλούν σύγχυση, αφορά την ονοματολογία του αυξητικού παράγοντα και συγκεκριμένα την χρήση των όρων “αυξητικός παράγοντας” και “κυτταροκίνη” (cytokine). Σε πολλές περιπτώσεις οι όροι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά και αυτό οδήγησε σε περαιτέρω σύγχυση. Από ιστορικής άποψης κυτταροκίνες ορίζονται εξωκυτταρικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες που συναλλάσσονται με κύτταρα του αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ οι αυξητικοί παράγοντες ενεργούν για τα υπόλοιπα κύτταρα.

Είναι πλέον σαφές ότι πολλοί τύποι κυττάρων μπορούν να συνθέσουν, να εκκρίνουν και να ανταποκρίνονται σε ποικιλία αυξητικών παραγόντων/κυτταροκινών. Έτσι το δοθέν όνομα αυξητικός παράγοντας/κυτταροκίνη δεν πρέπει να περιορίζεται σε μια συγκεκριμένη λειτουργία ή σε ένα συγκεκριμένο είδος κυττάρων. Ωστόσο, είναι επίσης σαφές ότι τώρα οι λειτουργίες των αυξητικών παραγόντων/κυτταροκινών είναι τόσο ποικίλες που δεν είναι δυνατή μια σαφής διάκριση. Για παράδειγμα κύτταρα που δεν ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα εκκρίνουν παραδοσιακές κυτταροκίνες (πχ. IL-1 και IL-6) και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες (πχ. FGF-2 και TGFβ-2). [1]

Οι κυτταροκίνες, αν και παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλία, μοιράζονται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά:

- Συμμετέχουν στην εκτελεστική φάση της ανοσίας (ειδικής και μη-ειδικής).
- Κάθε κυτταροκίνη παράγεται από πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους. Η έκκριση της κυτταροκίνης αποτελεί σύντομο, αυτοπεριοριζόμενο φαινόμενο. Οι κυτταροκίνες δεν υπάρχουν προσχηματισμένες μέσα στα κύτταρα, αλλά παράγονται σύμφωνα με τη ζήτηση.
- Κάθε κυτταροκίνη έχει την ικανότητα να δρα σε ποικίλους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους προκαλώντας διαφορετικές βιολογικές δράσεις. Κάποιες κυτταροκίνες όμως έχουν παρόμοια δράση σε κάποιο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο.
- Το φαινόμενο των «καταρρακτών» κυτταροκινών, όπου ένα κύτταρο εκκρίνει κάποια κυτταροκίνη, η οποία προκαλεί έκκριση άλλης κυτταροκίνης, δρώντας σε άλλο κυτταρικό τύπο, και αυτή με την σειρά της δρα σε άλλο είδος κυττάρου κ.ο.κ.
- Οι κυτταροκίνες δρουν ανταγωνιστικά, προσθετικά ή συνεργικά. Τα δίκτυα και οι καταρράκτες των κυτταροκινών προκύπτουν από συνεργιστική, ανταγωνιστική και προσθετική δράση των κυτταροκινών, που παράγονται ταυτόχρονα σε κάποιο μικροπεριβάλλον.

- Η δράση των κυτταροκινών μπορεί να είναι αυτοκρινής, ενδοκρινής ή παρακρινής. Κατά την αυτοκρινή δράση, η παραγόμενη κυτταροκίνη δρα στο ίδιο το κύτταρο από το οποίο παράγεται. Στη ενδοκρινή δράση, η κάθε κυτταροκίνη δρα στα γειτονικά κύτταρα αυτού που τη παράγει, ενώ στη παρακρινή δράση, η κυτταροκίνη εκκρίνεται στη κυκλοφορία και επιδρά σε απομακρυσμένες θέσεις του οργανισμού. [2]

3.2 Χημειοκίνες

Οι χημειοκίνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια κυτταροκινών με χαρακτηριστική κοινή ιδιότητα την ικανότητα να προκαλούν χημειοταξία των κυττάρων που φέρουν τους υποδοχείς τους. Ανάλογα με τη δομή του μορίου τους (αριθμός καταλοίπων κυστεΐνης) κατατάσσονται σε 4 οικογένειες:

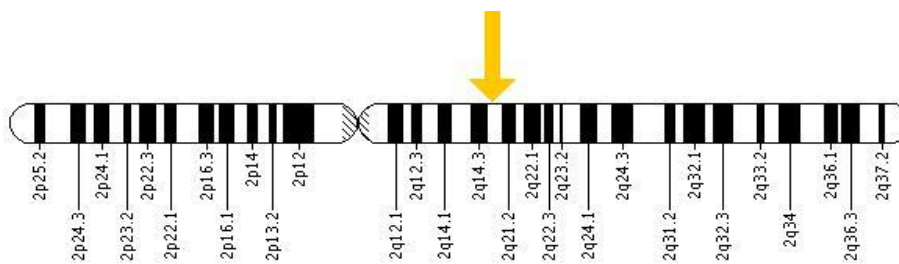
- C χημειοκίνες (ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ κυστεϊνών)
- CC χημειοκίνες (δύο δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ κυστεϊνών)
- CXC χημειοκίνες (δύο δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ κυστεϊνών, μεταξύ των γειτονικών καταλοίπων παρεμβάλλεται κατάλοιπο διαφορετικού αμινοξέος)
- CX3C χημειοκίνες (δύο δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ κυστεϊνών, μεταξύ των γειτονικών καταλοίπων παρεμβάλλεται 3 κατάλοιπα διαφορετικού αμινοξέος). [3]

Οι κλίσεις των χημειοκινών είναι στο επίκεντρο της κατευθυνόμενης κίνησης των κυττάρων σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες. Οι καρκίνοι έχουν ένα πολύπλοκο δίκτυο χημειοκινών που μπορούν να επηρεάσουν την διείσδυση των λευκοκυττάρων και την αγγειογένεση. [13] Τα κακοήθη κύτταρα μπορούν επίσης να εκφράζουν υποδοχείς χημειοκινών και να ανταποκριθούν στις κλίσεις των χημειοκινών και αυτό μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη και εξάπλωση του καρκίνου. Διαφορετικές μορφές καρκίνου εκφράζουν διαφορετικούς υποδοχείς CC και CXC χημειοκινών και οι αντίστοιχοι συνδέτες (ligands) εκφράζονται μερικές φορές σε σημεία εξάπλωσης του όγκου. [7, 13, 14] Ωστόσο, υπάρχει ένας υποδοχέας χημειοκίνης, ο οποίος εμφανίζεται να εκφράζεται από την πλειοψηφία των τύπων καρκίνων, και είναι ο CXCR4. [15]

3.3 Αυξητικός παράγοντας SDF-1

Η χημειοκίνη stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 ή γνωστή ως CXCL12) αποτελεί βασικό ρυθμιστή της φυσιολογικής κινητικότητας των κυττάρων κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης και μετά τη γέννηση, αλλά έχει εμπλακεί και με την παθολογική κινητικότητα των κυττάρων σε συνδυασμό με την καρκινογένεση και τη μετάσταση των όγκων. Ο υποδοχέας για αυτή τη χημειοκίνη είναι ο CXCR4 και αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ CXCL12-CXCR4 θεωρείται αποκλειστική αντίθετα με άλλες χημειοκίνες και τους υποδοχείς τους. [4]

Το γονίδιο CXCR4 βρίσκεται στο μακρύ (q) βραχίονα του χρωμοσώματος 2 στη θέση 21. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο CXCR4 βρίσκεται από το ζεύγος βάσεων 136871919 μέχρι το ζεύγος 136875725 του χρωμοσώματος 2. [16]



Σχήμα 3.1: Η τοποθεσία του γονιδίου CXCR4 στο χρωμόσωμα 2. [17]

Ο αυξητικός παράγοντας SDF-1 εκφράζεται συστηματικά σε στρωματικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, δενδρικά κύτταρα και άλλα. Από την ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων, ο SDF-1 είναι εξαιρετικά συντηρημένος μεταξύ των διαφόρων ειδών. Ο SDF-1 που παράγεται από τον άνθρωπο και ο SDF-1 που παράγεται από ποντίκι διακρίνεται από μόνο μία συντηρητική υποκατάσταση στη θέση 18. [4,5]

Δύο μορφές SDF-1 έχουν εντοπιστεί, SDF-1α και SDF-1β, οι οποίες έχουν ταυτόσημες ακολουθίες αμινοξέων εκτός από την παρουσία τεσσάρων πρόσθετων αμινοξέων στο καρβοξυλικό άκρο της SDF-1β (εικόνες 3.1, 3.2). Η σημασία της ύπαρξης αυτών των δύο μορφών του SDF-1 παραμένει ασαφής. [4,5]

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας CXCR4 και ο συνδέτης (ligand) του CXCL12 (SDF-1) παίζουν σημαντικό ρόλο σε νεοπλασματικές διεργασίες. Ο CXCR4 εκφράζεται σε πολλά κακοήγη γλοιώματα (gliomas), σε όγκους του μαστού, σε ορισμένα κύτταρα λευχαιμίας, σε καρκίνους της μήτρας, στο λέμφωμα του Burkitt, σε νευροβλάστωμα, στο πολλαπλό μυέλωμα, καθώς επίσης και σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα [6-12]. Ακόμη, ο υποδοχέας CXCR4 και ο συνδέτης του CXCL12 εμπλέκονται στη μετάσταση του καρκίνου του μαστού. Ειδικότερα, υψηλή έκφραση του SDF-1 βρέθηκε σε ιστούς με υψηλή επικινδυνότητα για μετάσταση του καρκίνου του μαστού [7]. Όλες αυτές οι περιπτώσεις θα αναλυθούν παρακάτω. Ωστόσο ο υποδοχέας CXCR4 παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη, στη ομοιόσταση (homeostasis - η ικανότητα των οργανισμών να διατηρούν το εσωτερικό τους περιβάλλον σχετικά σταθερό, ανεξάρτητα από τις συνθήκες του εξωτερικού περιβάλλοντος στο οποία ζουν) και στις φλεγμονώδεις νόσους. Ακόμη, σημαντικό ρόλο παίζουν τα ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από τον SDF-1.

Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001008540.1

ORIGIN

```
1 ttttttttct tccctctagt gggcggggca gaggagttag ccaagatgtg actttgaaac
61 cctcagcgtc tcagtgccct tttgttctaa acaaagaatt ttgtaattgg ttctaccaa
121 gaaggatata atgaagtcac tatgggaaaa gatggggagg agagtgttag gattctacat
181 taattctctt gtgcccttag cccactactt cagaatttcc tgaagaaagc aagcctgaat
241 tggtttttta aattgcttta aaaatTTTTT ttaactgggt taatgcttgc tgaattggaa
301 gtgaatgtcc attcctttgc ctcttttgca gatatacact tcagataact acaccgagga
361 aatgggctca ggggactatg actccatgaa ggaaccctgt ttccgtgaag aaaatgctaa
421 tttcaataaa atcttctctg ccaccatcta ctccatcatc ttcttaactg gcattgtggg
481 caatggattg gtcacctctg tcatgggtta ccagaagaaa ctgagaagca tgacggacaa
541 gtacaggctg cacctgtcag tggccgacct cctctttgtc atcacgcttc ccttctgggc
601 agttgatgcc gtggcaaacct ggtactttgg gaacttctta tgcaaggcag tccatgtcat
661 ctacacagtc aacctctaca gcagtgtcct catcctggcc ttcacagtc tggaccgcta
721 cctggccatc gtccacgcca ccaacagtca gaggccaagg aagctgttgg ctgaaaaggt
781 ggtctatggt ggctctgga tccctgccct cctgctgact attcccgact tcatctttgc
841 caacgtcagt gaggcagatg acagatatat ctgtgaccgc ttctacccca atgacttgtg
901 ggtgggtgtg ttccagtttc agcacatcat ggttggcctt atcctgcctg gtattgtcat
961 cctgtcctgc tattgcatta tcatctccaa gctgtcacac tccaagggcc accagaagcg
1021 caaggccctc aagaccacag tcatcctcat cctggctttc ttgcctgtt ggctgcctta
1081 ctacattggg atcagcatcg actccttcat cctcctggaa atcatcaagc aagggtgtga
1141 gtttgagaac actgtgcaca agtggatttc catcacggag gccctagctt tcttccactg
1201 ttgtctgaac cccatcctct atgctttctt tggagccaaa tttaaaacct ctgccagca
1261 cgcactcacc tctgtgagca gagggtccag cctcaagatc ctctccaaag gaaagcgagg
1321 tggacattca tctgtttcca ctgagtctga gtcttcaagt ttctactcca gctaacacag
1381 atgtaaaaga ctttttttta tacgataaat aacttttttt taagttacac atttttcaga
1441 tataaaagac tgaccaatat tgtacagttt ttattgcttg ttggattttt gtcttgtgtt
1501 tctttagttt ttgtgaagtt taattgactt atttatataa attttttttg tttcatattg
1561 atgtgtgtct aggcaggacc tgtggccaag ttcttagttg ctgtatgtct cgtggtagga
1621 ctgtagaaaa gggaaactgaa cattccagag cgtgtagtga atcacgtaaa gctagaaatg
1681 atccccagct gtttatgcat agataatctc tccattcccg tggaaactgt ttcctgttct
1741 taagacgtga ttttgctgta gaagatggca cttataacca aagcccaaaag tggatatagaa
1801 atgctgggtt ttcagttttc aggagtgggt tgatttcagc acctacagtg tacagtcttg
1861 tattaagttg ttaataaaaag tacatgttaa acttaaaaaa aaaaaaaaaa aa
```

//

C-X-C chemokine receptor type 4 isoform a [Homo sapiens]

NCBI Reference Sequence: NP_001008540.1

ORIGIN

```
1 msiplplliqi ytsdnyteem gsgdydsmke pcfreenanf nkiflptiys iifltgivgn
61 glvilvmgyq kklrsmtdky rhlhsvadll fvitlpfwav davanwyfng flckavhviy
121 tvnlyssvli lafisldryl aivhatnsqr prkllaekvv yvgvwipall ltipdfifan
181 vseaddryic drfypndlww vvfqfghimv glilpgivil scyciiskl shskghqkrk
241 alkttvilil affacwlpvy igisidsfil leiikqgcef entvhkwisi tealaffhcc
301 lnpilyaflg akfktsaqha ltsvsrgssl kilskgkrvg hssvsteses ssfhss
```

//

Εικόνα 3.1: Η ακολουθία των νουκλεοτιδίων mRNA της χημειοκίνης CXCR4-1 για τον homo sapiens από τη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (στο πάνω μέρος) – Η ακολουθία των αμινοξέων του SDF-1a για τον homo sapiens από τη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (στο κάτω μέρος) [18, 19]

Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transcript variant 2, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_003467.2

ORIGIN

```
1 aacttcagtt tgttggctgc ggcagcaggt agcaaagtga cgccgagggc ctgagtgtct
61 cagtagccac cgcattctgga gaaccagcgg ttaccatgga ggggatcagt atatacactt
121 cagataacta caccgaggaa atgggctcag gggactatga ctccatgaag gaaccctggt
181 tccgtgaaga aaatgctaata ttcaataaaa tcttctctgcc caccatctac tccatcatct
241 tcttaactgg cattgtgggc aatggattgg tcatcctggg catgggttac cagaagaaac
301 tgagaagcat gacggacaag tacaggctgc acctgtcagt ggccgacctc ctctttgtca
361 tcacgcttcc cttctgggca gttgatgccc tggcaaactg gtactttggg aacttccat
421 gcaaggcagt ccatgtcatc tacacagtca acctctacag cagtgtcctc atcctggcct
481 tcatcagtct ggaccgctac ctggccatcg tccacgccac caacagtcag aggccaaagga
541 agctgttggc tgaaaagggt gtctatgttg gcgtctggat ccctgccctc ctgctgacta
601 ttcccgactt catctttgcc aacgtcagtg aggcagatga cagatatatc tgtgaccgct
661 tctaccccaa tgacttgtgg gtggttgtgt tccagtttca gcacatcatg gttggcctta
721 tctgcctggg tattgtcatc ctgtcctgct attgcattat catctccaag ctgtcacact
781 ccaagggcca ccagaagcgc aaggccctca agaccacagt catcctcatc ctggctttct
841 tcgcctgttg gctgccttac tacattggga tcagcatcga ctccctcatc ctccctggaaa
901 tcatcaagca aggggtgtgag tttgagaaca ctgtgcacaa gtggatttcc atcaccgagg
961 ccctagcttt cttccactgt tgtctgaacc ccatacctta tgctttcctt ggagccaaat
1021 ttaaaacctc tgcccagcac gcactcacct ctgtgagcag aggggtccagc ctcaagatcc
1081 tctccaaagg aaagcgaggt ggacattcat ctgtttccac tgagtctgag tcttcaagtt
1141 ttcactccag ctaacacaga tgtaaaagac ttttttttat acgataaata actttttttt
1201 aagttacaca tttttcagat ataaaagact gaccaatatt gtacagtttt tattgcttgt
1261 tggatttttg tcttgtgttt ctttagtttt tgtgaagttt aattgactta tttatataaa
1321 ttttttttgt ttcattattga tgtgtgtcta ggcaggacct gtggccaagt tcttagttgc
1381 tgtatgtctc gtggtaggac tgtagaaaag ggaactgaac attccagagc gtgtagttaa
1441 tcacgtaaag ctagaaatga tcccagctg tttatgcata gataatctct ccattcccgt
1501 ggaacgtttt tctgttctt aagacgtgat tttgctgtag aagatggcct ttataacca
1561 agcccaaagt ggtatagaaa tgctggtttt tcagttttca ggagtgggtt gatttcagca
1621 cctacagtgt acagtcttgt attaagttgt taataaaaagt acatgttaaa cttaaaaaaa
1681 aaaaaaaaaa a
```

//

C-X-C chemokine receptor type 4 isoform b [Homo sapiens]

NCBI Reference Sequence: NP_003458.1

ORIGIN

```
1 megisiytsd nyteemsgd ydsmkepcfr eenanfknif lptiysiifl tgivngnlvi
61 lvmgyqkklr smtdkyrlhl svadllfvit lpfwavdava nwyfgnflck avhvityvnl
121 yssvlilafi sldrylaihv atnsqrprkl laekvvyvgv wipallltip dfifanvsea
181 ddryicdrfy pndlwwvfvq fqhimvglil pgivilscyc iiisklshsk ghqkrkalkt
241 tvililaffa cwlpyyigis idsfilleii kqgcefentv hkwisiteal affhcclnpi
301 lyafllgakfk tsaqhaltsv srgsslkils kgkrgghssv stesesssfh ss
```

//

Εικόνα 3.2: Η ακολουθία των νουκλεοτιδίων mRNA της χημειοκίνης CXCR4-2 για τον homo sapiens από τη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (στο πάνω μέρος) – Η ακολουθία των αμινοξέων του SDF-1b για τον homo sapiens από τη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (στο κάτω μέρος) [20, 21]

3.3.1 CXCR4 και CXCL12 (SDF-1) στην εμβρυική ανάπτυξη

Τα ποντίκια που έχουν έλλειψη στον CXCR4 ή τον συνδέτη του αναπτύσσονται κανονικά τις πρώτες 13 ημέρες (E13), αλλά από την E17,5 η πλειοψηφία αυτών είναι νεκρά, παρουσιάζοντας μείωση του μεγέθους του σώματος, γενικευμένο οίδημα και διπλασία του διαφράγματος της κοιλίας. Παρουσιάζουν ακόμα μια σειρά από ατέλειες στο αιμοποιητικό σύστημα, την καρδιά, τον εγκέφαλο και το αγγειακό σύστημα. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ένα κρίσιμο ρόλο για τον υποδοχέα CXCR4 στη μετανάστευση και σχηματομόρφωση του αριθμού των εμβρυικών κυττάρων και, επίσης, ότι ο συνδέτης CXCL12 (SDF-1) είναι ο μόνος γνωστός συνδέτης για τον υποδοχέα CXCR4. Επομένως, η απενεργοποίηση του CXCR4 σε εμβρυακή κατάσταση είναι θανατηφόρα. [22,23]

3.3.2 CXCR4 και CXCL12 (SDF-1) στην ομοιόσταση

Η CXCL12 (SDF-1) είναι μία ομοιοστατική (homeostatic) χημειοκίνη. Η κύρια λειτουργία των ομοιοστατικών χημειοκινών είναι να ρυθμίζει την κίνηση των αιμοποιητικών κυττάρων και την αρχιτεκτονική του δευτεροβάθμιου λεμφικού ιστού. Μελέτες για την απενεργοποίηση της CXCL12 δείχνουν ότι ο αποικισμός του μυελού των οστών κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της κύησης ελέγχεται από τη λειτουργία του μονοπατιού (pathway function) του CXCL12/ CXCR4. Η λειτουργία του μονοπατιού του CXCL12/ CXCR4 στους ενήλικους είναι αναπόσπαστη για τη διατήρηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSCs- Hematopoietic stem cells) στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και την μετακίνηση των λεμφοκυττάρων. Ο SDF-1 (CXCL12) εκφράζεται συνεχώς σε διάφορα όργανα συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, του ήπατος, των σκελετικών μυών, του εγκεφάλου, της καρδιάς, των νεφρών, του δέρματος και του μυελού των οστών. Ακόμη, λειτουργική πρωτεΐνη του υποδοχέα CXCR4 βρίσκεται στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος [27], σε μονοκύτταρα [28], σε πρώιμα B κύτταρα και πλασματοκύτταρα [29, 30], σε CD16 αρνητικά NK κύτταρα [31], σε δενδριτικά κύτταρα [32], σε μαστοκύτταρα [33], σε ενήλικα CD34+ προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών [34], σε ενδοθηλιακά κύτταρα [35, 36], χρωστικά επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς [37], επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου [38] και οδοντικά επιθηλιακά κύτταρα [39], σε νευρώνες και αστροκύτταρα [23]. Η έκφραση του CXCR4 μπορεί να ρυθμιστεί θετικά από κυτταροκίνες όπως οι TGF-β1, VEGF, bFGF και αρνητικά από κυτταροκίνες όπως οι IL-5, IFN-α και γ. Η CXCL12 (SDF-1) εκφράζεται συνεχώς από στρωματικά κύτταρα σε πολλούς ιστούς και για αυτό θεωρείται ως ομοιοστατική χημειοκίνη. [40]

3.3.3 CXCR4 και CXCL12 (SDF-1) στις φλεγμονώδεις ασθένειες

Ακριβώς όπως ο CXCR4/CXCL12 εμπλέκεται στη διατήρηση των κυττάρων κατά την εμβρυογένεση και την ομοιόσταση των ενήλικων ιστών, υπάρχουν ενδείξεις για παρόμοιο ρόλο στις φλεγμονές. Για παράδειγμα, στη φλεγμονώδη νόσο του ήπατος, ο SDF-1 αυξάνεται στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων και τα επίπεδα του πλάσματος του SDF-1 είναι επίσης υψηλότερα από τους φυσιολογικούς ελέγχους. [41] Έτσι, σε φλεγμονώδη νόσο, ο CXCR4/CXCL12 μπορεί να διαμορφώνεται από την παρουσία κυτταροκινών στους

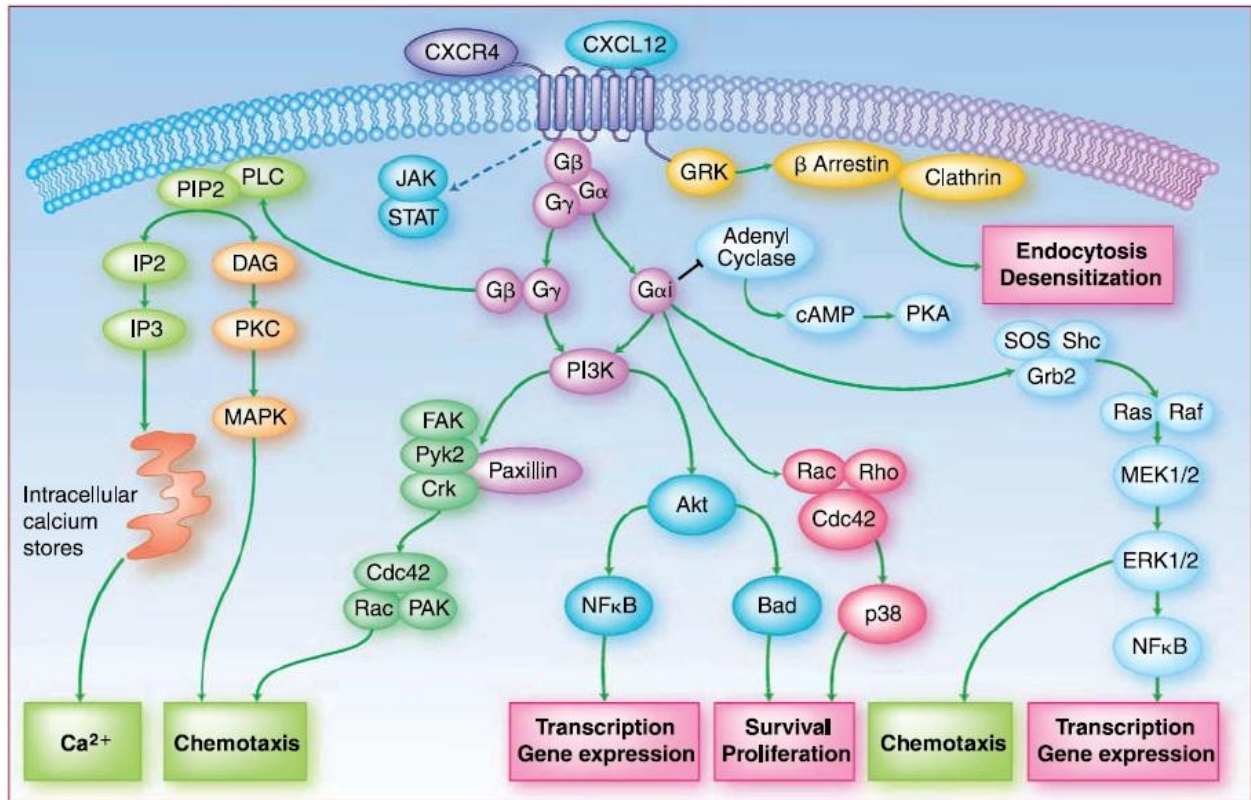
χώρους της φλεγμονής και αυτό μπορεί να οδηγήσει στη προσέλκυση κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής, στη διατήρηση, στη πρόληψη της απόπτωσης, στην ενισχυμένη απόκριση του SDF-1 και στη παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών.

Η έκκριση του SDF-1 (CXCL12) συνδέεται επίσης με βλάβες στους ιστούς, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμία των άκρων, τοξικότητα του ήπατος, υπερβολική αιμορραγία, ακτινοβολία ολόκληρου του σώματος, καθώς και μετά από βλάβες των ιστών που σχετίζονται με τη χημειοθεραπεία. [24, 25]

3.3.4 Μονοπάτια του CXCR4/CXCL12

Η δέσμευση της CXCL12 με τον CXCR4 εισάγει αποκλίνοντα μονοπάτια σηματοδότησης (signaling pathways) στην κάτωδο (downstream - κοινός όρος για τα γεγονότα που συμβαίνουν σε προχωρημένο στάδιο μίας σηματοδοτικής ακολουθίας) του δεσμευτικού συνδέτη, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε μια ποικιλία αποκρίσεων, όπως η χημειοταξία, η επιβίωση του κυττάρου και/ή ο πολλαπλασιασμός του, η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και η μετεγγραφή των γονιδίων. Το σχήμα 3.2 αντιπροσωπεύει μερικά από τα μονοπάτια-κλειδιά σηματοδότησης όπου θεωρείται ότι εμπλέκονται στην μετάδοση του σήματος του CXCR4. Η ακριβής φύση αυτών των μονοπατιών μπορεί να εξαρτάται από τους ιστούς και ως εκ τούτου να διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων. [25]

Ο CXCR4, όπως και όλοι οι υποδοχείς χημειοκινών, είναι ένας υποδοχέας επτά διαμεμβρανικών χώρων που συνδέεται με μια ετεροδιμερική (heterodimeric) G-πρωτεΐνη. Η μετάδοση σήματος από υποδοχείς χημειοκινών οδηγεί σε ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών και της φωσφολιπάσης C και σε ανύψωση του ελεύθερου ασβεστίου του κυτταροπλάσματος. [42] Η διέγερση των υποδοχέων των χημειοκινών έχει επίσης ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ενζύμων ERK-2 και IP 3-κινάση οδηγώντας στο σχηματισμό του ενζύμου PIP3 και στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης PKB/Akt. Σε αντίθεση με άλλους υποδοχείς χημειοκινών, η διέγερση του CXCR4 μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη ενεργοποίηση αυτών των δύο μονοπατιών σηματοδότησης (PIP3 και PKB/Akt). [43] Η σηματοδότηση μέσω CXCR4 ενισχύει επίσης την φωσφορυλίωση της τυροσίνης, την σύνδεση συστατικών με την πρωτεΐνη μεταγωγής σήματος paxillin και την δραστηριότητα του πρωτεϊνικού συμπλέγματος NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) στα εκχυλίσματα του πυρήνα. [42] Η βέλτιστη χημειοτακτική απόκριση των T-κυττάρων στον συνδέτη CXCL12 απαιτεί την ενεργοποίηση και των δύο κλάσεων IA και IB PI 3-κινάσεις. [44] Οι χημειοκίνες, συμπεριλαμβανομένου του CXCR4, ενεργοποιούν της ιντεγκρίνες (integrins - μία ομάδα μορίων προσκόλλησης των κυττάρων) και την Rap1 (Ras-proximate-1 ή Ras-related protein 1 - μικρές κυτοσολικές πρωτεΐνες που δρουν ως κυτταρικοί διακόπτες και είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική μετάδοση του σήματος) που παίζουν κεντρικό ρόλο στα μονοπάτια σηματοδότησης. [45]



Σχήμα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση των ενδοκυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σημάτων του CXCR4/CXCL12 [25]

3.4 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος

Εάν και συγκεκριμένοι υποδοχείς CC και CXC χημειοκινών έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται σε πολλά καρκινικά κύτταρα, [7,13] ο υποδοχέας χημειοκινών που εντοπίζεται συχνότερα σε κύτταρα των όγκων, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματικούς καρκίνους ποντικών, είναι ο CXCR4. Η έκφραση του CXCR4 έχει αναφερθεί σε τουλάχιστον 23 διαφορετικούς επιθηλιακούς, μετεσχηματικούς και αιμοποιητικούς καρκίνους. Ωστόσο, δεν είναι όλα τα καρκινικά κύτταρα που έχουν μελετηθεί θετικά στην ύπαρξη έκφρασης του CXCR4. Μερικές από τις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς και το γλοιώμα είναι αρνητικές στον CXCR4 όπως είναι τα πρωτογενή κύτταρα από την οξεία μυελογενή AML, ερυθροειδή AML και αδιαφοροποίητη AML. Επιπλέον, μέσα σε πρωτογενείς όγκους, όπως καρκίνος του πνεύμονα σε μη-μικά κύτταρα, μόνο ένας υποπληθυσμός κυττάρων εκφράζουν τον CXCR4. Όταν κατέστη δυνατή η μελέτη των πρωτογενών κυττάρων του όγκου (δηλαδή από λευχαιμίες και από απομονωμένα κύτταρα από καρκίνο των ωοθηκών), ο υποδοχέας CXCR4 λειτουργεί με μια ποικιλία ενεργοποίησης μονοπατιών σηματοδότησης.

Η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης στην μεταστατική εστία διαφέρει ανάλογα με το όργανο που φιλοξενεί την μεταστατική εστία, ενώ πολλοί καρκίνοι δείχνουν προτίμηση προς συγκεκριμένα όργανα-στόχους για να δώσουν μετάσταση. Για παράδειγμα ο καρκίνος του παχέος εντέρου δίνει μετάσταση συνήθως στο ήπαρ, ο καρκίνος του προστάτη στα οστά και ο καρκίνος του μαστού δίνει μεταστάσεις κυρίως στους επιχώριους λεμφαδένες, οστά, ήπαρ, εγκέφαλο και πνεύμονες.

Το μονοπάτι του CXCL12/CXCR4 μπορεί να επηρεάζει τη βιολογία του καρκίνου και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατευθύνοντας τη μετάσταση των CXCR4+ καρκινικών κυττάρων σε όργανα που εκφράζουν τον SDF-1 (π.χ. λεμφαδένες, πνεύμονες, ήπαρ ή οστά). Πολλές μορφές CXCR4+ καρκίνων δημιουργούν μεταστάσεις στα οστά και στους λεμφαδένες με ένα CXCL12-εξαρτημένο τρόπο στον οποίο συγκεκριμένα ο μυελός των οστών μπορεί να παρέχει ένα προστατευτικό περιβάλλον για τα κύτταρα του εγκεφάλου. Ο CXCR4 μπορεί να προωθήσει επίσης την αγγείωση του όγκου και ενεργεί ως ένας παράγοντας επιβίωσης και ανάπτυξης. [26]

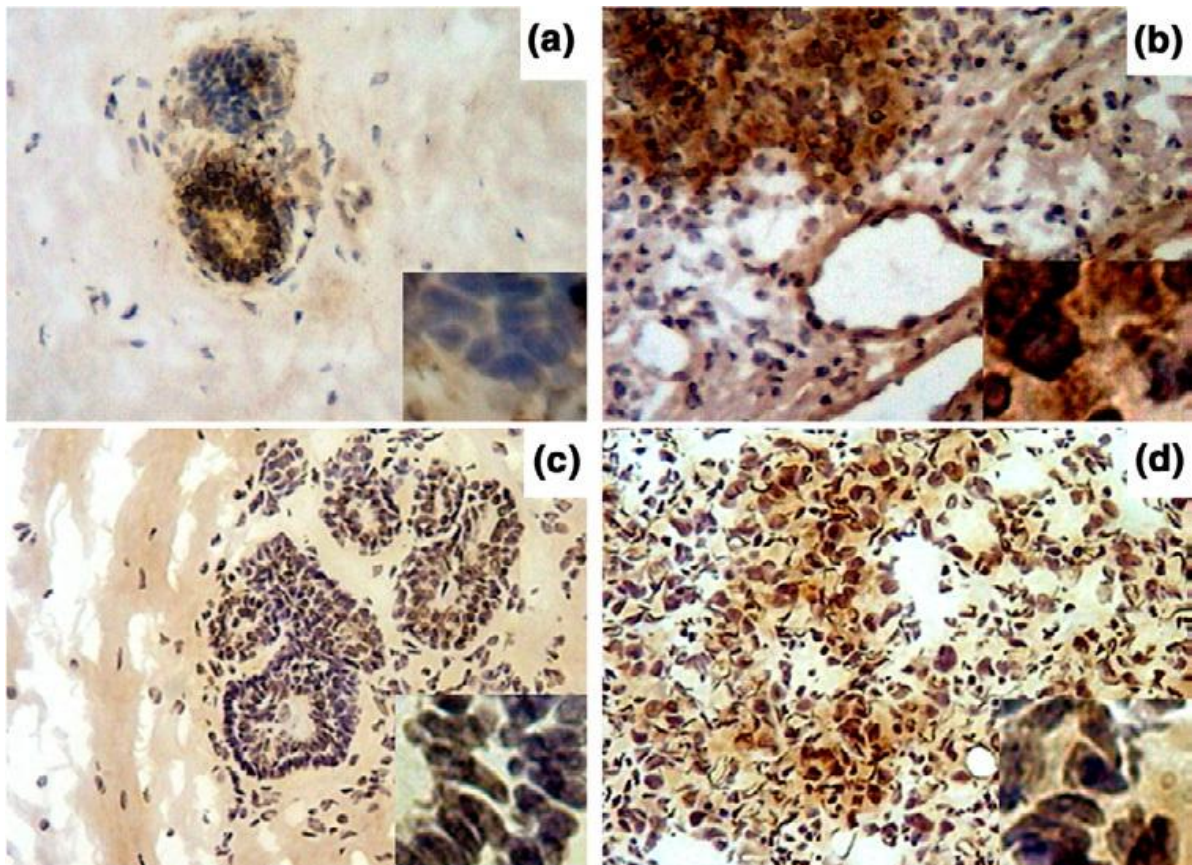
3.4.1 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συνηθισμένος καρκίνος που προσβάλλει τις γυναίκες στο Ηνωμένο Βασίλειο και τις ΗΠΑ. Μια στις δέκα γυναίκες θα αναπτύξει καρκίνο του μαστού στην διάρκεια της ζωής του στις δυτικές χώρες. Η κακή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού σχετίζεται με την επανεμφάνιση του όγκου και τη μετάσταση. Ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται από μετάσταση στην περιοχή των λεμφαδένων, στο μυελό των οστών, στους πνεύμονες και στο συκώτι. [46] Προηγούμενες μελέτες [47, 48], κατέδειξαν ότι οι τοποθεσίες των μεταστάσεων καθορίζονται όχι μόνο από τα χαρακτηριστικά των νεοπλασματικών κυττάρων αλλά και από το μικροπεριβάλλον των συγκεκριμένων οργάνων. Συγκεκριμένα προσελκυστικά μόρια οργάνων μπορούν να προωθήσουν την παλιννόστηση των καρκινικών κυττάρων σε συγκεκριμένες τοποθεσίες. [46]

Ο SDF-1/CXCR4 παίζει ένα κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό του μεταστατικού προορισμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Επιπλέον κατέδειξαν ότι η εξουδετέρωση με ένα ειδικό μονόκλωνο αντίσωμα κατά του CXCR4 ανέστειλε αποτελεσματικά τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του μαστού στον πνεύμονα ή στους λεμφαδένες σε ποντίκια. [49] Ωστόσο, παρά τις συσσωρευμένες πληροφορίες σχετικά με τον CXCR4, έχουν διεξαχθεί λίγες μελέτες για την αξιολόγηση της έκφρασης του SDF-1 και την προγνωστική αξία τους σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Τα στοιχεία δείχνουν ότι ο υποδοχέας CXCR4 είναι κρίσιμος για τις διαδικασίες τη διάδοσης, της εισβολής και του σχηματισμού των μεταστάσεων στον καρκίνο του μαστού. Οι πολυλειτουργικές επιπτώσεις του SDF-1 στη βιολογία του όγκου του μαστού τον κάνει βέλτιστο υποψήφιο ως διαγνωστικό δείκτη και ως θεραπευτικό στόχο. Ωστόσο, οι κλινικές πληροφορίες σχετικά με τη συχνότητα και το επίπεδο της έκφρασης του SDF-1 δεν είναι πλήρης (ιδίως όσον αφορά την διαφοροποίηση της σημασίας της πυρηνικής και της κυτταροπλασματικής χρώσης), ενώ η σχέση με άλλα προγνωστικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του καρκίνου του μαστού είναι περιορισμένη από το ανεπαρκές μέγεθος του δείγματος σε δημοσιευμένες εκθέσεις. [50]

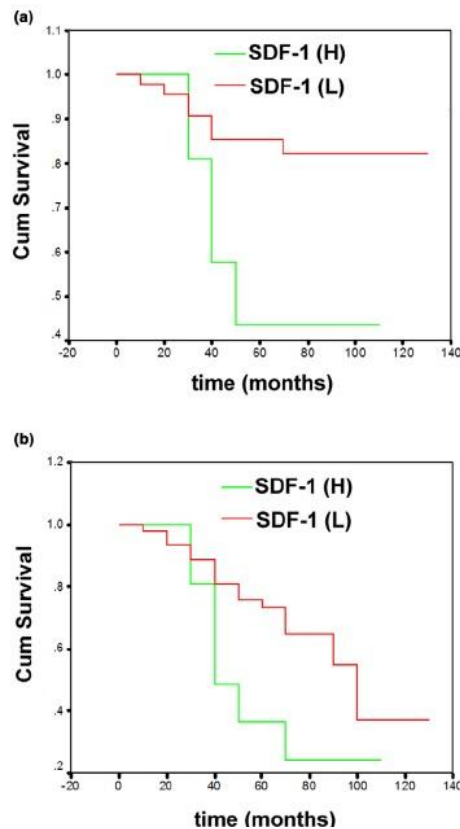
Από τις μελέτες, η ανοσοϊστοχημική χρώση επιβεβαίωσε έκφραση του SDF-1 σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε δείγματα ιστών του καρκίνου του μαστού. Όπως ήταν αναμενόμενο, χρώση του CXCR4 παρατηρήθηκε τόσο σε κανονικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα, με τη χρώση στα κύτταρα του όγκου είναι σημαντικά ισχυρότερη (εικόνα 3.3). [46]



Εικόνα 3.3: Ανοσοϊστοχημική ανάλυση των SDF1 και του υποδοχέα της. Ανοσοϊστοχημική χρώση του SDF-1 (a,b) και του SDF-1 υποδοχέα CXCR4 (c,d) του μαστικού ιστού. Οι αριστερές εικόνες δείχνουν φυσιολογικούς ιστούς, και οι δεξιές εικόνες δείχνουν ιστούς του στήθους με όγκο. [46]

Για τον καρκίνο του μαστού, η έκφραση του CXCR4 σχετίζεται με την αναλογία σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα και επομένως με την επιθετικότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών. Η υπερέκφραση του CXCR4 σχετίζεται με τη χειρότερη πρόγνωση και μειωμένη επιβίωση των ασθενών ανεξάρτητα από την κατάσταση των υποδοχέων των οιστρογόνων (Estrogens receptors - υπερεκφράζονται στο 70% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού και αυτές οι περιπτώσεις αναφέρονται ως "ER-positive"). Η ενεργοποίηση του CXCR4 σε ελάχιστα μεταστατικά κύτταρα MCF-7 οδηγεί σε αυξημένη ανάπτυξη του όγκου και μεταστάσεις που θα μπορούσαν να αντιστραφούν με αναστολή του CXCR4. Τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης του CXCR4 σχετίζονται με την ενεργοποίηση της καθόδου (downstream) σηματοδότησης μέσω των ERK1/2 και p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) λόγω της μεσολάβησης του SDF-1 και με την ενίσχυση της μεσολάβησης της γονιδιακής έκφρασης του ER. Μαζί, όλα αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ενίσχυση της σηματοδότησης του CXCR4 αρκεί για να οδηγήσει τον ER-θετικό καρκίνο του μαστού σε μεταστατικό και ενδοκρινικό φαινότυπο με ανθεκτικότητα στη θεραπεία μέσω της αυξημένης MAPK σηματοδότησης. [51]

Επιπρόσθετα, εμφανίζεται μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του SDF-1 και overall survival¹ και disease-free survival² σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Το υψηλό επίπεδο της έκφρασης του SDF-1 υποδηλώνει ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα μετάστασης, τοπικής υποτροπής και θανάτου από καρκίνο του μαστού σε τέτοιους ασθενείς. Το μοτίβο της έκφρασης του CXCR4 σχετίζεται σημαντικά με το βαθμό της μετάστασης στις λέμφους αλλά όχι με τις αιματογενείς μεταστάσεις. Ως εκ τούτου ο SDF-1 σε συνδυασμό με τον υποδοχέα του CXCR4, ενδέχεται να έχει αξία κατά την αξιολόγηση των μακροπρόθεσμων κλινικών αποτελεσμάτων για τον καρκίνο του μαστού. [46]



Σχήμα 3.3: Kaplan–Meier καμπύλες επιβίωσης. (a) Overall survival ($P = 0.01$). (b) Disease-free survival ($P = 0.035$). Μέση παρακολούθηση: 72.2 months. SDF-1 (H), ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης SDF-1 (δείγμα $n=79$); SDF-1 (L), ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης SDF-1 ($n=41$). Από το διάγραμμα (a) Υψηλά επίπεδα του SDF-1 σχετίζεται σημαντικά με τη μικρότερη συνολική επιβίωση. Μέση επιβίωση 94,1 μηνών έναντι 143,6 μήνες για όσους παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα του SDF-1. [46]

¹Overall Survival: Το ποσοστό των ατόμων σε μια ομάδα μελέτης ή θεραπείας που είναι εν ζωή για ορισμένο χρονικό διάστημα, αφού είχε διαγνωστεί ή θεραπευτεί η ασθένεια, όπως ο καρκίνος. Το συνολικό ποσοστό επιβίωσης συχνά αναφέρεται ως πενταετές ποσοστό επιβίωσης, που είναι το ποσοστό των ατόμων σε μια ομάδα μελέτης ή θεραπείας που είναι εν ζωή πέντε χρόνια μετά τη διάγνωση ή τη θεραπεία. [52]

²Disease-free survival: Το χρονικό διάστημα μετά τη θεραπεία για μια συγκεκριμένη ασθένεια κατά την οποία ο ασθενής επιβιώνει χωρίς καμία ένδειξη της νόσου. Η Disease-free survival μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια κλινική μελέτη ή δοκιμή για να βοηθήσει στη μέτρηση του πόσο καλά δουλεύει μια νέα θεραπεία. [53]

3.4.2 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος του προστάτη

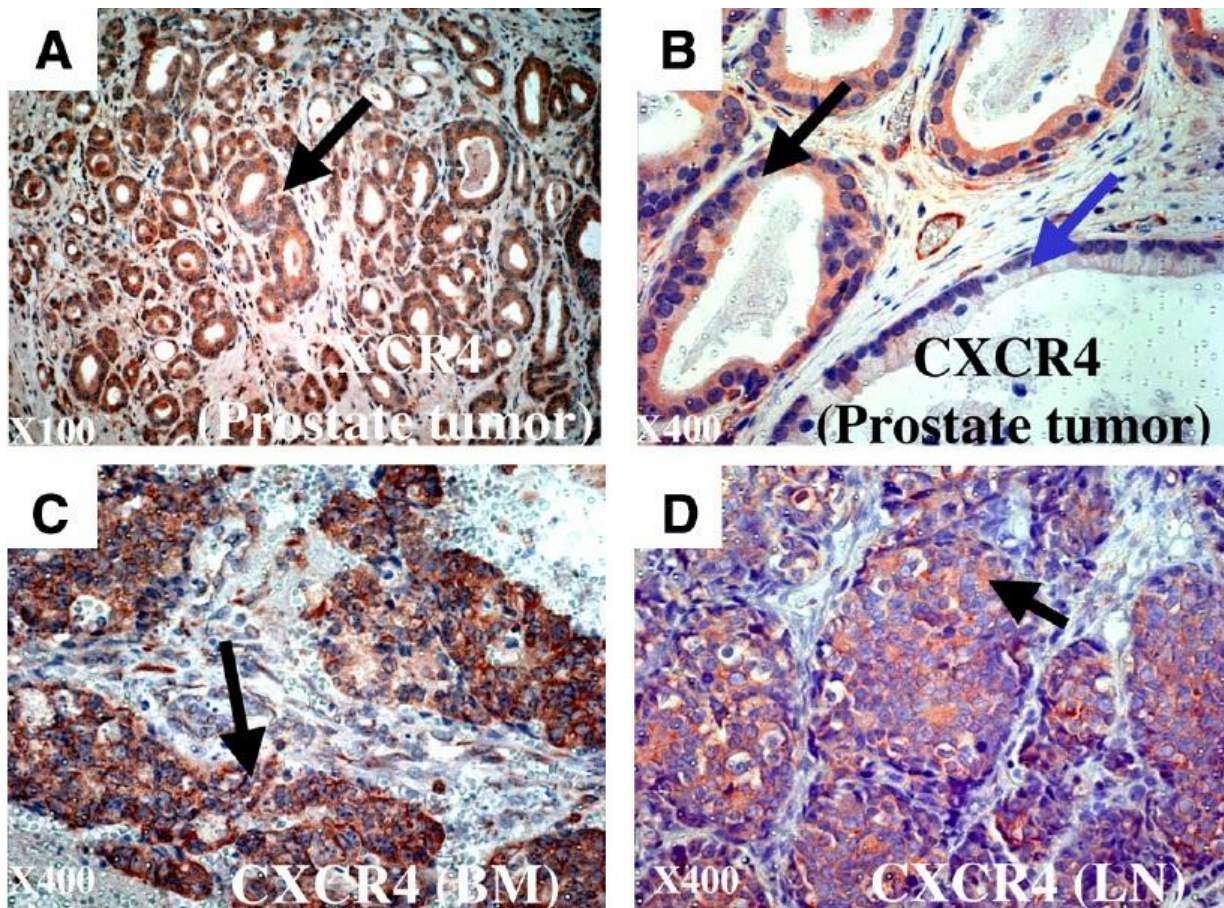
Ο καρκίνος του προστάτη είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτων σχετιζόμενων με καρκίνο στον αρσενικό πληθυσμό των δυτικών χωρών. Ο καρκίνος του προστάτη εμφανίζει προτίμηση στους λεμφαδένες και στο μυελό των οστών ως πρωταρχική περιοχή μετάστασης. [54] Ο υποδοχέας χημειοκινών CXCR4 και ο συνδέτης του CXCL12 έχει αποδειχθεί ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο στη διακίνηση των αιμοποιητικών κυττάρων στον μυελό των οστών. Η συμμετοχή του CXCR4 και του CXCL12 σε αυτή τη διαδικασία κάνει αυτό το ζεύγος υποδοχέα-χημειοκίνης να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη διερεύνηση του ρόλου του στην ανάπτυξη όγκου και μεταστάσεων στον μυελό των οστών. Μελέτες [55,56] έχουν δείξει ότι ο CXCR4 εκφράζεται σε καρκινικές κυτταρικές γραμμές του προστάτη και σε βιοψίες. Ωστόσο, η σημασία των υψηλών επιπέδων έκφρασης του CXCR4 στη διαδικασία μεταστατικού καρκίνου παραμένει ασαφής.

Ένας μηχανισμός που συχνά προτείνεται είναι ότι ο CXCR4 αυξάνει την πιθανότητα για τα καρκινικά κύτταρα στην αρχική καρκινική περιοχή και στις μεταστατικές περιοχές και τη κυκλοφορία μέσα και έξω από το μικροπεριβάλλον του καρκινικού ιστού. [58] Η υπόθεση αυτή βασίζεται στο ρόλο που διαδραματίζουν οι υποδοχείς χημειοκινών μεταξύ των οποίων και ο CXCR4, κατά τη διακίνηση των βλαστικών κυττάρων και κυρίως μέσω της ρύθμισης της πρόσδεσης και της σύλληψης αυτών των κυττάρων πάνω στο ενδοθηλιακό στρώμα διαφόρων ιστών. Αν και τα δεδομένα δείχνουν ένα κρίσιμο ρόλο για τον υποδοχέα CXCR4 στη μεταστατική διαδικασία, δεν διακρίνεται ο ρόλος των υποδοχέων χημειοκινών στην σύλληψη των καρκινικών κυττάρων από τον ενδοθήλιο και στην εξαγγείωση μέσα στον ιστό-στόχο, ή στην αρχική επιβίωση, ανάπτυξη, αγγείωση και εισβολή μέσα στον ιστό-στόχο. [57]

Από τη ανοσοϊστοχημική χρώση διαπιστώθηκε η έκφραση του υποδοχέα CXCR4 σχεδόν σε όλες τις αρχικές βιοψίες του όγκου του ανθρώπινου προστάτη, αλλά όχι στο φυσιολογικό ανθρώπινο ιστό του προστάτη (εικόνα 3.4). [57]

Οι πιο πρόσφατες μελέτες σχετικά με την έκφραση του CXCR4 σε κακοήθεις ιστούς δείχνουν ότι ο υποδοχέας αυτός είναι σημαντικός για την στρατολόγηση νεοπλασματικών κυττάρων που κυκλοφορούν σε απομακρυσμένες περιοχές. Τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR4 έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένες περιοχές όπου βρίσκονται υψηλά επίπεδα του CXCL12. Αυτό κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στη βελτίωση της αλληλεπίδρασης με τα ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού των οστών και/ή την αυξημένη κινητικότητα και διεισδυτικότητα που αποκτήθηκε από τα κύτταρα με την εξαγγείωση τους στον ιστό-στόχο. Έτσι, η δραστηριότητα του CXCR4 είναι κρίσιμης σημασίας για τη κυκλοφορία και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, μέχρι το σημείο όπου η εστία της μετάστασης εγκατασταθεί σε μια απομακρυσμένη περιοχή. Ο ρόλος του υποδοχέα CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη εξαπλώνεται μέσα στον ιστό-στόχο με την ενίσχυση της διασποράς και την επιτάχυνση της αγγειογένεσης. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να δράσουν στις αρχικές περιοχές του καρκίνου, καθώς και στις απομακρυσμένες, κατά τη διάρκεια της ζωής του όγκου. Η υπερέκφραση του CXCR4 στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη και του καρκίνου του μαστού δείχνει έναν γενικότερο ρόλο των υψηλών επιπέδων έκφρασης του CXCR4 στην ανάπτυξη του όγκου. [57]

Τα υψηλά επίπεδα του υποδοχέα χημειοκινών CXCR4 παρέχουν μια πιο επιθετική συμπεριφορά στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη και πιθανώς σε άλλου επιθηλιακού όγκους. Επιπλέον, ο CXCR4 όχι μόνο δεν δρα ως υποδοχέας για την παλιννόστηση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, αλλά και ως ένας θετικός ρυθμιστής για την ανάπτυξη και αγγειογένεση του όγκου, και ως εκ τούτου, υποδεικνύεται η δυνατότητα χρήσης του CXCR4 ως μελλοντικός θεραπευτικός επεμβατικός στόχος ακόμη και σε προχωρημένες περιπτώσεις μεταστατικού καρκίνου του προστάτη. [57]



Εικόνα 3.4: Έκφραση του CXCR4 στη βιοψία του καρκίνου του προστάτη στον άνθρωπο. Η χρώση (βέλη) του CXCR4 σε όγκους του προστάτη με χρήση του μονόκλωνου αντισώματος 44708 για το ανθρώπινο CXCR4. Αρχική μεγέθυνση x400 εμφανίζεται στις εικόνες B,C,D και x100 στην A. Οι όγκοι στον προστάτη φαίνονται με θετική χρώση για τον υποδοχέα CXCR4 στην εικόνα A και B (μαύρο βέλος). Κανονικά ανθρώπινα κύτταρα του προστάτη δίπλα στον όγκο έχουν αρνητική χρώση για τον υποδοχέα CXCR4 (B, μπλε βέλος). Τα υψηλά επίπεδα της έκφρασης του CXCR4 βρέθηκαν στις μεταστατικές βλάβες του μυελού των οστών (BM) και λεμφαδένων (LN) (C και D) [57]

3.4.3 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος των πνευμόνων

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κύρια αιτία θανάτων από καρκίνο παγκοσμίως σε γυναίκες και είναι υπεύθυνος για 1,3 εκατομμύριο θανάτους ετησίως. [59] Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (small cell lung cancer SCLC), ο οποίος αποτελεί το 15% όλων των καρκίνων του πνεύμονα, είναι σχεδόν αποκλειστικά λόγω του καπνίσματος και είναι ιδιαίτερα επιθετικός, λόγω της εκτενής μετάστασης σε πολύ αρχικό στάδιο. [60]

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει έναν σχηματισμό μεταξύ της έκφρασης του CXCR4 και των κλινικών αποτελεσμάτων του καρκίνου του πνεύμονα, με αυξημένη έκφραση στον καρκίνο ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό των πνευμόνων, καθώς και αυξημένη έκφραση σε όγκους ασθενών με μεταστάσεις σε σχέση με εκείνους που δεν έχουν κλινική μετάσταση. [61] Ωστόσο, η ανάλυση του υποκυτταρικού εντοπισμού του CXCR4 αποδίδει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ενώ σε μία μελέτη από 46 δείγματα με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) σημειώθηκε σημαντική συσχέτιση σε 5 δείγματα NSCLC με την πυρηνική ανοσοϊστοχημική έκφραση του CXCR4 και την αύξηση των μεταστάσεων των λεμφαδένων ($p^3=0.008$) [63], μια άλλη μελέτη έδειξε ισχυρή πυρηνική χρώση του CXCR4 σε 17 από 61 δείγματα από ασθενείς σε στάδιο I NSCLC που συνδέονται με ένα σημαντικό καλύτερο αποτέλεσμα σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς πυρηνική χρώση CXCR4 ($p=0.039$). [64] Η έκφραση του CXCR4 είναι επίσης παρών σε σημαντικά περισσότερες περιπτώσεις σε προχωρημένα στάδια (II,III ή IV) σε σχέση με το στάδιο I ($p=0.0121$). [60]

Όλο και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι το ζεύγος CXCR4/SDF-1 παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετάσταση του καρκίνου του πνεύμονα, ιδίως στον NSCLC. Πρώτον σε μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι οι κυτταρικές σειρές NSCLC εκφράζουν υψηλά επίπεδα CXCR4 και ο ενεργοποιημένος παράγοντας SDF-1 προωθεί τη μετανάστευση και την εισβολή των κυτταρικών σειρών *in vitro*. [65] Η διακοπή του CXCR4 με ρύθμιση μέσω διαμόλυνσης του υποδοχέα με ένα αντιαγγελιοφόρο νουκλεοτιδικό τμήμα του CXCR4 ή με εξουδετέρωση του CXCR4 μέσω αντισωμάτων, μειώνει σημαντικά τη μετανάστευση, εισβολή και τη προσκόλληση των κυτταρικών σειρών NSCLC *in vitro*. [61] Δεύτερον, *in vivo* μελέτες, χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο ποντικού SCID ή ξενο-εμφύτευση των ανθρώπινων κυττάρων NSCLC δείχνουν ότι οι προτιμώμενες τοποθεσίες για τη μετάσταση του καρκίνου του πνεύμονα έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης SDF-1 από τον πρωτογενή όγκο ή τα επίπεδα στο κυτταρόπλασμα δείχνουν ότι η χημειοτακτική κλίση ίσως να δημιουργείται μεταξύ της περιοχής του πρωτογενούς όγκου και τις μεταστατικές περιοχές. [65] Η εξουδετέρωση του SDF-1 από ένα αντί-SDF1 ή αντί-CXCR4 μονόκλωνο αντίσωμα *in vivo* οδήγησε σε σημαντική μείωση της μετάστασης του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) σε διάφορα όργανα συμπεριλαμβανομένου των επινεφρίδιων αδένων, του εγκεφάλου και του μυελού των οστών και του ήπατος. [65] Τα παραπάνω υποστηρίζονται από κλινικές μελέτες που δείχνουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της έκφρασης του CXCR4 στον πρωτογενή όγκο και στην κλινική έκβαση ασθενών με NSCLC. Ασθενείς με υψηλή έκφραση του CXCR4 στον καρκίνο εμφανίζονται πιο επιρρεπείς σε μετάσταση από ασθενείς με χαμηλή έκφραση CXCR4. [65] Έτσι, αυτές οι μελέτες μας οδηγούν να επιδιώξουμε μια προσέγγιση αντι-CXCR4/SDF-1 σε κλινικές δοκιμές.

³P-τιμή: Ένας όρος στον τομέα της στατιστικής. Βοηθά να δείχνουν αν η διαφορά που διαπιστώθηκε μεταξύ των ομάδων που συγκρίνονται οφείλεται στην τύχη. Μια μικρή τιμή p συνήθως σημαίνει ότι η διαφορά μεταξύ των ομάδων δεν οφείλεται μόνο στην τύχη, αλλά οφείλεται σε κάποιο άλλον παράγοντα, όπως η επεξεργασία μίας από τις ομάδες που έλαβαν. Μια μεγάλη τιμή p συνήθως σημαίνει ότι η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων είναι πιθανόν να οφείλεται στην τύχη και μόνο. [62]

3.4.4 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και καρκίνος των ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι η κύρια αιτία των γυναικολογικών καρκινικών θανάτων. Η ασθένεια έχει ύπουλη έναρξη, συχνά παρουσιάζονται ασαφή μη-συγκεκριμένα συμπτώματα, όπως η αύξηση της κοιλιακής περιμέτρου, αλλαγές στο έντερο και/ή τις συνήθειες της ουροδόχου κύστης. Οι περισσότεροι ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, όταν διαγιγνώσκεται, βρίσκονται ήδη σε προχωρημένα στάδια (III και IV). Σε παγκόσμιο επίπεδο, λιγότερο από το 30% των ασθενών με προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών επιβιώνουν 5 χρόνια μετά την αρχική διάγνωση. [88] Σε προχωρημένα στάδια, όταν η νόσος έχει εξαπλωθεί πέρα από την ωοθήκη, η θεραπεία γίνεται όλο και πιο αναποτελεσματική. Φαίνεται ότι Κάποια κατανόηση του ενδεχόμενου μηχανισμού που διέπει η εξέλιξη του καρκίνου των ωοθηκών είναι απαραίτητη για τη βελτίωση της κλινικής έκβασης.

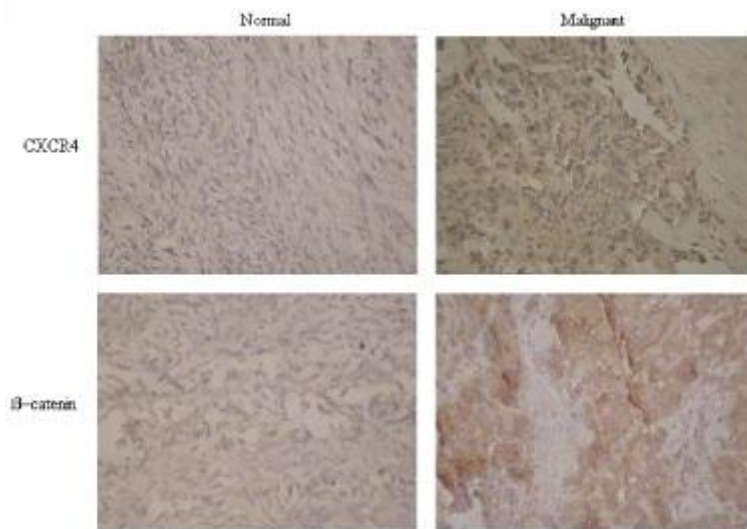
Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt διαδραματίζει βασικό ρόλο σε πολλές πτυχές της ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της πολικότητας και της μετανάστευσης των κυττάρων. Οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες Wnt ασκούν την επίδρασή τους μέσω 2 οδών: Wnt/β-κατενίνη - "κανονικό" μονοπάτι και β-κατενίνη - ανεξάρτητο "μη-κανονικό" μονοπάτι. Το Wnt / β-κατενίνης κανονικό μονοπάτι, στο οποίο επικεντρώνονται οι περισσότερες έρευνες που δημοσιεύονται, έχει εμπλακεί σε ογκογένεση σε διάφορες τοποθεσίες, συμπεριλαμβανομένων του παχέος εντέρου, του ορθού, του μαστού, του ήπατος, και της ωοθήκης. [89] Ομοίως, η σηματοδότηση Wnt είναι ένα από τα πολλά μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στη διαδικασία της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT-epithelial-mesenchymal transition), η οποία εμπλέκεται στην εξέλιξη του καρκίνου. [90] Η κρίσιμη συνιστώσα του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού, β-κατενίνης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή. Ένας αριθμός με επενεργητές του Wnt/β-κατενίνης σηματοδοτικού μονοπατιού έχει αναφερθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου και ανάπτυξη του επηρεάζοντας την κυτταρική ανάπτυξη και εισβολή. Ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι το Wnt/β-κατενίνη σηματοδοτικό μονοπάτι εμπλέκεται στον καρκίνο των ωοθηκών μέσω πολλαπλών διαφορετικών μηχανισμούς. Έχει αναφερθεί ότι μπορεί η σηματοδότηση του SDF-1/CXCR4 αλληλεπιδρούν με το Wnt/β-κατενίνη μονοπάτι για τη ρύθμιση της ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος, [91] ερευνάται αν ο υποδοχέας CXCR4 διαμορφώνει το Wnt/β-κατενίνη μονοπάτι των ωοθηκών στην εξέλιξη του καρκίνου.

Το ζεύγος SDF-1/CXCR4 διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε μεταστατικές τοποθεσίες στον ανθρώπινο καρκίνο. Στην μελέτη [92], για πρώτη φορά, καθορίζεται ο ρόλος του CXCR4 στην ανάπτυξη του καρκίνου των ωοθηκών με παρέμβαση RNA και παρέχει τεκμήρια *in vitro* ότι τα CXCR4 και Wnt/β-κατενίνη μονοπάτια συνδέονται λειτουργικά με τον καρκίνο των ωοθηκών, υποδεικνύοντας ότι ο CXCR4 μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο δείκτη για την εξέλιξη του καρκίνου των ωοθηκών. [92]

Στη μελέτη αυτή, η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του υποδοχέα CXCR4 και των κλινικών χαρακτηριστικών του καρκίνου των ωοθηκών μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημική χρώση. Βρέθηκε κυτταροπλασματική έκφραση υποθ CXCR4 στα περισσότερα καρκινώματα (92%), αλλά η έκφραση του υποδοχέα CXCR4 δεν ήταν ανιχνεύσιμη σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς των ωοθηκών. Υψηλότερη έκφραση της πρωτεΐνης του CXCR4 βρέθηκε

στο καρκίνου των ωοθηκών με μετάσταση στους λεμφαδένες από ότι χωρίς μετάσταση στους λεμφαδένες. [92]

Επομένως, ο υποδοχέας CXCR4 σχετίζεται σημαντικά με το μεταστατικό στάδιο των λεμφαδένων και σχετίζεται με την ανάπτυξη του όγκου και την εισβολή του καρκίνου των ωοθηκών. Σε επόμενο κεφάλαιο, θα αναφερθούμε στα αποτελέσματα της μελέτης για τη σύγκριση του CXCR4 που μπορεί να αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνη. [92]



Εικόνα 3.5: Ανοσοϊστοχημική χρώση του CXCR4 και β -κατενίνης στους ιστούς των ωοθηκών (normal: φυσιολογικοί ιστοί των ωοθηκών, malignant: κακοήθεις ιστοί των ωοθηκών). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με αρχική μεγέθυνση 400. Τα CXCR4 θετικά κύτταρα είναι εκείνα που περιέχει κόκκους καφέ σκούρο που διανεμούνται στην κυτταρόπλασμα. β -κατενίνη θετικά κύτταρα είναι αυτά που περιέχουν σκούρο καφέ σε κόκκους που κυρίως έχει διανεμηθεί στους πυρήνες ή κυτταρόπλασμα. [92]

3.4.5 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και αιμοποιητικές κακοήθειες

Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Η Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση των μονόκλωνων λεμφοκυττάρων που φαίνεται να προέρχονται από τα ώριμα Β λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας συσσωρεύονται στο αίμα, το μυελό και στους δευτερεύοντες λεμφικούς ιστούς. Παρά την φαινομενική μακροζωία τους *in vivo*, απομονωμένα κύτταρα της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας υφίστανται γενικά απόπτωση *in vitro* όταν καλλιεργούνται υπό συνθήκες όπου υποστηρίζουν την ανάπτυξη των ανθρώπινων Β-κυττάρικων γραμμών. [80]

Τα κύτταρα της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα τον υποδοχέα CXCR4. Η συγκαλλιέργεια των κυττάρων της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας με τα στρωματικά κύτταρα του μυελού που εκκρίνουν τον συνδέτη CXCL12, προκαλούν τα νεοπλασματικά Β-κύτταρα να μεταναστεύσουν σε άλλα στρωματικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR4. [67] Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν ένα μοντέλο που προτείνει ότι η έκφραση του υποδοχέα CXCR4 από κύτταρα της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας επιτρέπει την επανακυκλοφορία τους μεταξύ του αίματος και

στους ιστούς του μυελού των οστών ή στους λεμφαδένες, από όπου λαμβάνουν προστατευτικά σήματα επιβίωσης.

Επειδή ο συνδέτης CXCL12 όχι μόνο προσελκύει τα κύτταρα της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας στο υποστηρικτικό μικροπεριβάλλον, αλλά και διεγείρει άμεσα την επιβίωση των κύτταρα της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, [80] το ζεύγος CXCR4-CXCL12 μπορεί να είναι ένας σημαντικός θεραπευτικός στόχος στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι ένα μικρό πεπτίδιο CXCR4-αντιγόνο μπλοκάρει αποτελεσματικά τον συνδέτη CXCL12 που προκαλείται από την ενεργοποίηση, τη μετανάστευση και τη σηματοδότηση των κυττάρων της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. [81] Στρωματικά κύτταρα με τη μεσολάβηση της προστασίας μπλοκάρει μερικών την απόπτωση των κυττάρων της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, γεγονός που υποδηλώνει ένα πιθανό ρόλο του CXCR4 ανταγωνιστή σε συνδυασμό με μια στοχευμένη B-κυτταρική θεραπεία στη θεραπεία της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.

Non-Hodgkin's λέμφωμα

Η χημειοκίνη SDF-1/CXCL12 εμπλέκεται στην ανάπτυξη και διακίνηση των B-κυττάρων και των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων. Η SDF-1/CXCL12 ενισχύει την μετανάστευση των θυλακιωδών κυττάρων του non-Hodgkin λεμφώματος (NHL- non-Hodgkin's lymphoma) [66] και ο υποδοχέας CXCR4 με τον συνδέτη του SDF-1/CXCL12 φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας [67] και στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία των B-κυττάρων [68].

Αρκετές μελέτες έχουν αποκαλύψει έναν ρόλο της αλληλεπίδρασης του CXCR4/SDF-1 στην ανάπτυξη των T λεμφοκυττάρων. Στην αρχική ανάπτυξη των T-κυττάρων, ο SDF-1 που παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένου είναι απαραίτητος για την ωρίμανση των CD34+ προγονικών κυττάρων του θύμου σε ανώριμα CD4+ T κύτταρα. [69] Ο SDF-1 είναι ακόμα ένας συνδιεγέρτης για την ενεργοποίηση των CD4+ T κυττάρων. [70] Σε μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης των T-κυττάρων, ο υποδοχέας CXCR4 εκφράζεται κατά προτίμηση στο Th2⁴ εναντίον του Th1⁴ υποσυνόλου των ώριμων T-κυττάρων [71] και εκφράζεται από ώριμα T-κύτταρα στους λεμφικούς ιστούς [72].

Σε προκλινικά μοντέλα, η εξουδετέρωση του CXCR4 έδειξε αξιοσημείωτα αποτελέσματα σε κάθε πρόκληση όγκου καθώς απουσία εμφανής βραχυπρόθεσμης ή μακροπρόθεσμης τοξικότητας από τις δοκιμαστικές θεραπείες. Επιπλέον, εξουδετέρωση του CXCR4 οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων σε 24 ώρες μετά από ενδοφλέβια ένεση, γεγονός που υποδηλώνει έναν κρίσιμο ρόλο του CXCR4 στην εξαγγελίωση του όγκου των κυττάρων. Το ζεύγος CXCR4/SDF-1 μπορεί να είναι ένας χρήσιμος στόχος για τη θεραπεία του NHL, όπως θα δούμε και στο επόμενο κεφάλαιο. [74]

Οξεία λευχαιμία

Σε αντίθεση με συμπαγείς όγκους που εισβάλουν στο μυελό των οστών, οι οξείες λευχαιμίες προέρχονται από το μυελό. Στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, τα κύτταρα της οξείας λευχαιμίας βρίσκονται σε στενή επαφή με τα στρωματικά κύτταρα του

μυελού που παρέχουν ανάπτυξη και επιβίωση σημάτων μέσω της επιφάνειας-δέσμωσης ή τους εκκρινόμενους παράγοντες. Επειδή ο υποδοχέας CXCR4 διαδραματίζει ένα κρίσιμο ρόλο για την διατήρηση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών, αρκετές ομάδες έχουν εξετάσει το ρόλο που διαδραματίζει ο CXCR4 σε προγονικά κύτταρα λευχαιμίας. Πρόδρομα Β-κύτταρα της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR4 [68] τα οποία συμμετέχουν στη μετανάστευση των κυττάρων της λευχαιμίας στο μυελό των οστών σε ποντίκια NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency). [8, 82]

Οξεία μυελογενή λευχαιμία

Παρά τη γενική ευαισθησία στη χημειοθεραπεία, η μακροπρόθεσμη disease-free survival στη οξεία μυελογενή λευχαιμία παραμένει σε χαμηλά επίπεδα διότι η πλειοψηφία των ασθενών υποτροπιάζει από ασθενείς υπολειμματικές νόσους (minimal residual disease - MRD). Ο μυελός των οστών θεωρείται η κύρια περιοχή για MRD όπου η προσκόλληση σε στρωματικά στοιχεία μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα της οξείας μυελογενής λευχαιμίας από κυτταροτοξικά φάρμακα. Μόρια προσκόλλησης των πολύ αργών αντιγόνων VLA-4 τύπου ιντεγκρίνης σε κύτταρα της οξείας μυελογενής λευχαιμίας παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο για τη διαμεσολάβηση της προσκόλλησης της στρωματικής φμπρονεκτίνης. [83] Ο υποδοχέας CXCR4 μπορεί να διευκολύνει τη σηματοδότηση του VLA-4 κατευθύνοντας την αυθόρμητη μετανάστευση των κυττάρων κάτω από στρωματικά κύτταρα της οξείας μυελογενής λευχαιμίας του μυελού. (“pseudoemperipolesis”). [84]

Στην προσκόλληση της στρωματικής φμπρονεκτίνης, τα κύτταρα της οξείας μυελογενής λευχαιμίας γίνονται ανθεκτικά στην απόπτωση in vitro. [83] Ως εκ τούτου, μόρια προσκόλλησης και CXCR4 εμφανίζονται να είναι κεντρικοί ρυθμιστές των σημάτων επιβίωσης που λαμβάνεται υπόψη για την αντικαρκινική ανθεκτικότητα των φαρμάκων. Αυτό το σχέδιο υποστηρίζεται από τα ευρήματα ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα CXCR4 από λευχαιμικά κύτταρα είναι ένας αρνητικός προγνωστικός δείκτης στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. [85, 86]

⁴Τα βοηθητικά Τ κύτταρα υποδιαιρούνται σε δυο βασικές υποομάδες, γνωστές ως Th1 και Th2, οι οποίες διαφέρουν ως προς τις λειτουργίες των κυττάρων τους και διαχωρίζονται με βάση τις κυτταροκίνες που αυτά εκκρίνουν. Τα Th1 κύτταρα θεωρούνται προφλεγμονώδη κύτταρα, εκκρίνουν ιντερλευκίνη-2 και ιντερφερόνη-γ και βοηθούν στην ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Τα Th2 κύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνη-4 (IL-4), ιντερλευκίνη-5 (IL-5), ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ιντερλευκίνη-10(IL-10) και ιντερλευκίνη-13 (IL-13), επάγουν την ανοσολογική απόκριση που διαμεσολαβεί από τα Β λεμφοκύτταρα και έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν αρνητικά τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις κυρίως μέσω της παραγωγής της IL-10. [73]

3.4.6 Αυξητικός παράγοντας SDF-1 και γαστρεντερικοί όγκοι

Η σημασία της έκφρασης του υποδοχέα CXCR4 στην εξέλιξη του όγκου έχουν περιγραφεί σε διάφορες γαστρεντερικές κακοήθειες.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μια από τις πιο συχνές κακοήθειες σε όλο τον κόσμο. Η 5-ετής επιβίωση του 90% σε ασθενείς με όγκο που περιορίζεται στο παχύ έντερο μειώνεται στο 10% με την παρουσία των απομακρυσμένων μεταστάσεων. [87] Η υπερέκφραση του υποδοχέα CXCR4 στον καρκίνο του παχέος εντέρου σχετίζεται σημαντικά με προχωρημένα στάδια όγκου III/IV και με λεμφογενείς ή αιματογενείς μεταστάσεις, αντίστοιχα. Επιπλέον, ο συνδέτης SDF-1a του CXCR4 τονώνει τη μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου SW480 και SW620, που εκφράζουν τον CXCR4, in vitro. [75]

Στο καρκίνο του οισοφάγου, η μέση Overall Survival των ασθενών που οι όγκοι εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR4 ήταν 20 μήνες σε σύγκριση με 76 μήνες που είναι για τις περιπτώσεις όπου οι όγκοι δεν εκφράζουν τον CXCR4. Η έκφραση του CXCR4 σχετίζεται σημαντικά με την αυξανόμενη συμμετοχή λεμφαδένων και μυελού των οστών. Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, η έκφραση του CXCR4 είναι μια ανεξάρτητη μεταβλητή και συνδέεται στενά με τη μείωση του disease-specific survival και overall survival. [76]

Στο γαστρικό καρκίνο ή καρκίνο του στομάχου, η έκφραση του υποδοχέα CXCR4 από τα πρώιμα καρκινικά κύτταρα του στομάχου σχετίζεται σημαντικά με την ανάπτυξη της περιτοναϊκής καρκινωμάτωσης και κακοήθη ασκίτη που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις CXCL12. [77]

Στη περίπτωση του καρκίνου του παγκρέατος, η υπερέκφραση του υποδοχέα CXCR4 συσχετίζεται με τα προχωρημένα στάδια III/IV του καρκίνου και έδειξαν μια τάση για δημιουργία αιματογενών μεταστάσεων και ανάπτυξη των σταδίων των τοπικών όγκων χωρίς να επηρεάζει την επιβίωση. [78]

Στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, η υψηλή έκφραση του υποδοχέα CXCR4 συνδέεται με προχωρημένους τοπικούς πρωτογενείς όγκους και λεμφογενείς μεταστάσεις. Επιπλέον, η υψηλή έκφραση του υποδοχέα CXCR4 οδήγησε σε σημαντική αύξηση των αιματογενών μεταστάσεων και σε μειωμένη τρίχρονη επιβίωση. [79]

Συμπερασματικά, ο υποδοχέας CXCR4 αυξάνει το μεταστατικό φαινότυπο για διάφορες γαστρεντερικές κακοήθειες. Τρέχουσες αναλύσεις διερευνούν κατά πόσο η έκφραση του CXCR4 μπορεί να είναι πολύτιμος προγνωστικός παράγοντας για την υποτροπή του όγκου.

Βιβλιογραφία-Πηγές 3^ο Κεφαλαίου

- [1] Thomas Yorio, Abbot F. Clark, Martin B. Wax (2007), *Ocular Therapeutics: Eye on New Discoveries*, chapter 5
- [2] Abbas KA, Lichtman HA. (2003), *Cellular and Molecular Immunology*
- [3] Moser B, Wolf M, Walz A et al. (2004) Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control, *Trends in Immunology* vol.25 p.75-84
- [4] De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, Zhang HH, Fales H, Tosato G (April 2004), Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood* 103
- [5] Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, et al. (1995) Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene, *Genomics*
- [6] Sehgal, A., Keener, C., Boynton, A. L., Warrick, J., and Murphy, G. P. (1998) CXCR-4, a Chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J. Surg. Oncol.* 69, p. 99–104
- [7] Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., et al. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, p.50-56
- [8] Shen, W., Bendall, L. J., Gottlieb, D. J., and Bradstock, K. F. (2001) The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Exp. Hematol.* 29, p.1439-1447
- [9] Peled, A., Hardan, I., Trakhtenbrot, L., Gur, E., Magid, M., Darash-Yahana, M., Cohen, N., Grabovsky, V., Franitza, S., Kollet, O., et al. (2002) Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem Cells* 20, p.259-266
- [10] Milliken, D., Scotton, C., Raju, S., Balkwill, F., and Wilson, J. (2002) Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites. *Clin. Cancer Res.* 8, p.1108–1114
- [11] Geminder, H., Sagi-Assif, O., Goldberg, L., Meshel, T., Rechavi, G., Witz, I. P., and Ben-Baruch, A. (2001) A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *J.Immunol.* 167, p.4747–4757
- [12] Koshiba, T., Hosotani, R., Miyamoto, Y., Ida, J., Tsuji, S., Nakajima, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, H., Doi, R., Hori, T., et al. (2000) Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 6, p.3530–3535
- [13] Balkwill F. (2003) Chemokine biology in cancer. *Sem Immunol*;15:49–55.
- [14] Murphy PM. (2001) Chemokines and molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med*;354:833–5.
- [15] Rossi D, Zlotnik A.(2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*;18:217–42.
- [16] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7852>
- [17] <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/CXCR4.jpeg>

- [18] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001008540.1
- [19] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001008540.1#sequence_56790927
- [20] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_003467.2
- [21] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/4503175?report=genpept>
- [22] Tachibana K, Hirota S, Lizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591.
- [23] Zou Y-R, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998;393:595.
- [24] Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 2006;20:1915–24.
- [25] Beverly A, Teicher and Simon P. Fricker, CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer, *Clin Cancer Res* 2010;16:2927-2931. Published OnlineFirst May 18, 2010.
- [26] Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 2008;14:2519–26.
- [27] Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1925–30.
- [28] Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829–33.
- [29] Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O. Profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J Immunol* 2003;170:1136–40.
- [30] Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A, et al. Chemotactic responsiveness towards ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* 2002;169:1277–82.
- [31] Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D, Prus D., Markel G., Gazit R., et al. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16 negative human natural killer cells. *Blood* 2003.
- [32] Zoetewij JP, Golding H, Mostowski H, Blauvelt A. Cytokines regulate expression and function of the HIV coreceptor CXCR4 on human mature dendritic cells. *J Immunol* 1998;161:3219–23.
- [33] Juremalm M, Hjertson M, Olsson N, Harvima I, Nilsson K, Nilsson G. The chemokine receptor CXCR4 is expressed within the mast cell lineage and its ligand stromal cell-derived factor-1a acts as a mast cell chemotaxin. *Eur J Immunol* 2000;30:3614–22.
- [34] Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Guttierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilisation of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185:111–20.
- [35] Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:4282–7.

- [36] Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells. *Am J Pathol* 1999;154:1125–35.
- [37] Crane IJ, Wallace CA, McKillop-Smith S, Forrester JV. CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from the blood–retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1a. *J Immunol* 2000;165:4372–8.
- [38] Dwinell MB, Eckmann L, Leopard JD, Varki NM, Kagnoff MF, et al. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1999;117:359–67.
- [39] Murdoch C, Monk PN, Finn A. Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells. *Immunology* 1999;98:36–41.
- [40] Ara T, Nakamura Y, Egawa T, Sugiyama T, Abe K, Kishimoto T, et al. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *PNAS* 2003;100:5319–23.
- [41] Terada R, Yamamoto K, Hadoka T, Shimada N, Okano N, Baba N, et al. Stromal cell-derived factor-1 from biliary epithelial cells recruits CXCR4-positive cells: implications for inflammatory liver disease. *Lab Invest* 2003;83:665–72.
- [42] Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1998;273:23169–75.
- [43] Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clarke-Lewis I, et al. Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med* 2000;192:313–24.
- [44] Curnock AP, Sotsios Y, Wright KL, Ward SG. Optimal chemotactic responses of leukemic T cells to stromal cell-derived factor-1 requires the activation of both class 1A and 1B phosphoinositide 3-kinases. *J Immunol* 2003;170:4021–30.
- [45] Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, et al. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol* 2003;161:417–27.
- [46] Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. , Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7(4):R402-10.
- [47] Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM: The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor4 biological axis in non–small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167:1676-1686.
- [48] Hart IR, Fidler IJ: Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res* 1980, 40:2281-2287.
- [49] Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, et al.: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001, 410:50-56.

- [50] Ombretta Salvucci, Amelie Bouchard, Andrea Baccarelli, Jean Deschenes, Guido Sauter, Ronald Simon, Rosella Bianchi, and Mark Basik. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Research and Treatment* (2006) 97: 275–283.
- [51] Lyndsay V. Rhodes, Sarah P. Short, Nicole F. Neel, et al. Cytokine Receptor CXCR4 Mediates Estrogen-Independent Tumorigenesis, Metastasis, and Resistance to Endocrine Therapy in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2011;71:603-613.
- [52] <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=44070>
- [53] <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=44023>
- [54] Foster, C. S., Cornford, P., Forsyth, L., Djamgoz, M. B., and Ke, Y. (1999) The cellular and molecular basis of prostate cancer. *BJU Int.* 83, 171–194
- [55] Taichman, R. S., Cooper, C., Keller, E. T., Pienta, K. J., Taichman, N. S., and McCauley, L. K. (2002) Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 62, 1832–1837
- [56] Sun, Y. X., Wang, J., Shelburne, C. E., Lopatin, D. E., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., Pienta, K. J., and Taichman, R. S. (2003) Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J. Cell. Biochem.* 89, 462–473
- [57] Merav Darash-Yahana, Eli Pikarsky, Rinat Abramovitch, Evelyne Zeira, Boaz Pal, Rebekah Karplus, Katia Beider, Shani Avniel, Shafika Kasem, Eithan Galun, Amnon Peled (2004) Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *The FASEB Journal* express article 10.1096/fj.03-0935fje
- [58] Bernardis, R. (2003) Cancer: cues for migration. *Nature* 425, 247–248
- [59] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- [60] Tara Gangadhar, Suvobroto Nandi and Ravi Salgia (2010) The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer. *Cancer Biology & Therapy* 9:6, 409-416;
- [61] Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, et al.(2005) Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res*; 11. 8273– 8280.
- [62] <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=44955>
- [63] Na I, Scheibenbogen C, Adam C, Stroux A, Ghadjar P, Thiel E, et al. (2008) Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis. *Hum Pathol*; 39:1751-5.
- [64] Spano J, Andre F, Morat L, Sabatier L, Besse B, Combadiere C, et al. (2004) Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol*; 15:613-7.
- [65] Belperio JA, Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Keane M, Strieter R. (2004) The SDF-1/CXCL 12/CXCR4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Chest.* 125(5 Suppl): 156S.
- [66] Corcione, A., Ottonello, L., Tortolina, G., Facchetti, P., Airolidi, I., Guglielmino, R., Dadati, P., Truini, M., Sozzani, S., Dallegri, F., and Pistoia, V. (2000) Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92: 628–635.

- [67] Burger, J. A., Burger, M., and Kipps, T. J. (1999) Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, 94: 3658–3667.
- [68] Bradstock, K. F., Makrynika, V., Bianchi, A., Shen, W., Hewson, J., and Gottlieb, D. J. (2000) Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers. *Leukemia (Baltimore)*, 14: 882–888.
- [69] Hernandez-Lopez C, Varas A, Sacedon R, et al. (2002) Stromal cell–derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood*;99:546-554.
- [70] Nanki T, Lipsky PE. (2000) Stromal cell derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation. *J Immunol*;164:5010-5014.
- [71] Chtanova T, Kemp RA, Sutherland APR, et al. (2001) Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4(+) and CD8(+) type 1 and type 2 T cells. *J Immunol*;167:3057-3063.
- [72] Zhang L, He T, Talal A, et al. (1998) In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J Virol*;72:5035-5045.
- [73] Romagnani S. (2006) Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy*;36 (11):1357-66
- [74] Francesco Bertolini, Chiara Dell'Agola, Patrizia Mancuso, et al. (2002) CXCR4 Neutralization, a Novel Therapeutic Approach for Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Res*;62:3106-3112.
- [75] Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, Jayasinghe C, Gonner U, Wilsberg V, Junginger T, Berger MR, Galle PR, Moehler M. (2005) Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res*; 11: 1743-1750
- [76] Gockel I, Schimanski CC, Heinrich C, Wehler T, Frerichs K, Drescher D, von Langsdorff C, Domeyer M, Biesterfeld S, Galle PR, Junginger T, Moehler M. (2006) Expression of chemokine receptor CXCR4 in esophageal squamous cell and adenocarcinoma. *BMC Cancer*; 6: 290
- [77] Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, Minami T, Nakayama T, Sakurai H, Takahashi Y, Yoshie O, Saiki I. (2006) Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res*; 66: 2181-2187
- [78] Wehler T, Wolfert F, Schimanski CC, Gockel I, Herr W, Biesterfeld S, Seifert JK, Adwan H, Berger MR, Junginger T, Galle PR, Moehler M. (2006) Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by pancreatic cancer correlates with advanced disease. *Oncol Rep*; 16: 1159-1164
- [79] Schimanski CC, Bahre R, Gockel I, Muller A, Frerichs K, Horner V, Teufel A, Simiantonaki N, Biesterfeld S, Wehler T, Schuler M, Achenbach T, Junginger T, Galle PR, Moehler M. (2006) Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. *Br J Cancer*; 95: 210-217

- [80] Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96:2655-2663.
- [81] Burger M, Hartmann T, Krome M, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005;106:1824-1830.
- [82] Spiegel A, Kollet O, Peled A, et al. Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood*. 2004;103:2900-2907.
- [83] Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2003;9:1158-1165.
- [84] Burger JA, Spoo A, Dwenger A, Burger M, Behringer D. CXCR4 chemokine receptors (CD184) and alpha4beta1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34 progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis). *Br J Haematol*. 2003;122:579-589.
- [85] Rombouts EJ, Pavic B, Lowenberg B, Ploemacher RE. Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;104:550-557.
- [86] Spoo AC, Wierda WG, Burger JA. The CXCR4 score: a new prognostic marker in acute myelogenous leukemia [abstract]. *Blood*. 2004;104:304a.
- [87] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ: Cancer statistics 2005. *CA Cancer J Clin* 2005, 55:10-30.
- [88] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:74Y108.
- [89] Cui J, Zhou X, Liu Y, et al. Alterations of beta-catenin and Tcf-4 instead of GSK-3beta contribute to activation of Wnt pathway in hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2003;116:1885Y1892.
- [90] Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:131Y142.
- [91] Luo Y, Cai J, Xue H, et al. SDF-1alpha/CXCR4 signaling stimulates beta-catenin transcriptional activity in rat neural progenitors. *Neurosci Lett*. 2006;398:291Y295.
- [92] Jia Wang, Jing Cai, Fang Han, Chun Yang, Qiaolin Tong, Ting Cao, Liying Wu, Zehua Wang. Silencing of CXCR4 Blocks Progression of Ovarian Cancer and Depresses Canonical Wnt Signaling Pathway. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21: 981Y987

Κεφάλαιο 4^ο: Θεραπεία Καρκίνου και ο Αυξητικός Παράγοντας SDF-1

4.1 Υπάρχουσες θεραπείες καρκίνου

Για πολλά χρόνια οι τρεις βασικές μέθοδοι αντικαρκινικής θεραπείας παρέμεναν η χειρουργική, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Σήμερα προστίθεται η βιολογική θεραπεία (η οποία ενεργοποιεί και κατευθύνει το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού να καταπολεμήσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων), καθώς και η ορμονοθεραπεία για τους ορμονοευαίσθητους όγκους. Επειδή υπάρχουν πολλές διαφορετικές μορφές καρκίνου, μια θεραπεία που είναι η καλύτερη για μία μορφή δεν είναι αναγκαστικά η καλύτερη θεραπεία για κάποια άλλη. Ακόμη, αρκετές φορές πιθανόν να χρειαστεί και συνδυασμό των θεραπειών αυτών για την καταπολέμηση του καρκίνου. Θα εξετάσουμε εν συντομία τις πιο διαδεδομένες θεραπευτικές επιλογές:

- **Χειρουργική:** είναι η παλαιότερη και η πιο επιτυχής θεραπευτική μέθοδος. Αν είναι εφικτό να αφαιρεθεί ασφαλώς ο όγκος και να μην παραμείνουν καρκινικά υπολείμματα, μπορεί να επιτευχθεί πλήρης ίαση. Υπάρχουν δυο χειρουργικές προσεγγίσεις: Κατά τη διαδικασία σ' ένα στάδιο, μετά τη διαγνωστική βιοψία, αφαιρείται χειρουργικά ο όγκος ενώ ο ασθενής παραμένει υπό γενική νάρκωση. Μετά την επέμβαση εξετάζεται το ενδεχόμενο να εφαρμοστεί και άλλη θεραπευτική αγωγή, οπότε πρέπει να επιλεγεί η πιο αποτελεσματική ή ίσως η σειρά των θεραπευτικών μεθόδων, ιδιαίτερα όταν υπάρχουν πολλές εφαρμόσιμες εναλλακτικές επιλογές. Κατά τη δεύτερη προσέγγιση γίνεται μόνο βιοψία. Αν η βιοψία δείξει την ύπαρξη καρκίνου, τότε ασθενής και ιατρός σχεδιάζουν την οριστική θεραπευτική αγωγή. Αν επιλεγεί η χειρουργική, γίνεται η κατάλληλη επέμβαση. [1]

- **Ακτινοθεραπεία:** Στόχος της ακτινοθεραπείας είναι η υποχώρηση-σμίκρυνση ή η εξαφάνιση του όγκου. Με την ακτινοθεραπεία καταστρέφεται η γενετική δομή (DNA) των κυττάρων του όγκου και έτσι δεν αναπτύσσονται ούτε και διαιρούνται περαιτέρω. Η καταστροφή τους επιτυγχάνεται από μια δέσμη ακτινών υψηλής ενέργειας που κατευθύνονται απευθείας στον όγκο από ειδικό μηχάνημα (γραμμικός επιταχυντής ή κάποια πηγή ραδιενεργού υλικού), το οποίο βρίσκεται σε ορισμένη απόσταση από το σώμα (τηλεθεραπεία), ή ακόμα με ραδιενεργά υλικά τα οποία τοποθετούνται μέσα ή κοντά στον όγκο (βραχυθεραπεία). Κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας ο ασθενής δεν αισθάνεται πόνο ούτε άλλη δυσφορία. Η ακτινοβόληση μοιάζει με την ακτινογράφιση του θώρακα, με τη διαφορά ότι το μηχάνημα παραμένει για μερικά λεπτά και όχι για ένα-δυο δευτερόλεπτα. Η ακτινοθεραπεία ως μονοθεραπεία, μπορεί να επαρκής θεραπεία για μερικές μορφές εντοπισμένων καρκίνων ή να αποτελεί μέρος θεραπευτικού σχήματος συνδυασμού μορφών αντικαρκινικής θεραπείας. [1]

- **Χημειοθεραπεία:** Ο όρος, που συχνά παρεξηγείται, υποδηλώνει μια μέθοδο θεραπείας με χημικές ουσίες (φάρμακα). Η θεραπεία του καρκίνου με 5-φθοροουρακίλη είναι χημειοθεραπεία. Όμως το ίδιο συμβαίνει ουσιαστικά και με τη θεραπεία μιας λοίμωξης με πενικιλίνη ή μιας κεφαλαλγίας με δυο ασπιρίνες. Εντούτοις, όταν ο όρος χημειοθεραπεία αναφέρεται σε συνδυασμό με τη λέξη καρκίνος προκαλεί πανικό. Συχνά ακούγονται αποκρουστικές ιστορίες για τις σοβαρές παρενέργειές της, οι οποίες μπορεί πράγματι σε κάποιες περιπτώσεις να είναι δυσάρεστες, αλλά συνήθως υπερτονίζονται. Γεγονός είναι ότι η

ανοχή στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ποικίλλει και δεν αποκλείεται κάποια άτομα να μην τους ανέχονται και καθόλου, η πλειονότητα όμως τους ανέχεται πολύ καλά. Ο ασθενής πρέπει να έχει υπόψη του ότι στη χημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται πολλά φάρμακα, που δεν έχουν όλα εξίσου σοβαρές παρενέργειες. Επιπλέον, οι παρενέργειες μετριάζονται ή ρυθμίζονται με άλλα φάρμακα, όπως λόγω χάρη σε περίπτωση ναυτίας. Ας μην ξεχνάμε ότι γίνονται διαρκώς έρευνες για την δημιουργία φαρμάκων και θεραπευτικών σχημάτων με τις κατά το δυνατόν μικρότερες πιθανότητες πρόκλησης παρενεργειών και ότι γίνονται σημαντικά βήματα προς αυτές τις κατευθύνσεις. Ενώ η χειρουργική και η ακτινοθεραπεία εφαρμόζονται για να θεραπεύσουν καρκίνους που αναπτύσσονται σε ορισμένη περιοχή, η χημειοθεραπεία εφαρμόζεται γενικότερα για καρκίνους οι οποίοι διασπείρονται, μέσω της αιματικής ροής ή του λεμφικού συστήματος, σε πολλά σημεία του σώματος, έχει δηλαδή συστηματική δράση. Στο παρελθόν χρησιμοποιούσαν τη χημειοθεραπεία μόνο όταν η χειρουργική και η ακτινοθεραπεία ήταν ατελέσφορες. Σήμερα, όμως, είναι η θεραπεία που προτιμάται για ορισμένες μορφές καρκίνου, συχνά δε εφαρμόζεται σε συνδυασμό με τις δυο άλλες, ιδιαίτερα για τους εντοπισμένους καρκίνους. [1,2]

- **Βιολογική θεραπεία:** Αποτελεί έναν σχετικά νέο τρόπο αντικαρκινικής θεραπείας. Σε σχετικές έρευνες αποδείχθηκε ότι πλεονεκτεί σε αρκετά σημεία, επειδή το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει ούτως ή άλλως ουσιαστικό ρόλο προστατεύοντας τον οργανισμό εναντίον του καρκίνου. Επιπλέον, το ανοσοποιητικό σύστημα συμβάλλει στην καταπολέμηση του όταν αυτός έχει ήδη αναπτυχθεί. Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από λευκά αιμοσφαίρια, μεταξύ των οποίων τα λεμφοκύτταρα, που δρουν ως αμυντικό σύστημα κατά των ξένων οργανισμών, όπως είναι τα βακτήρια και οι ιοί. Ένας ειδικός τύπος λεμφοκυττάρων, τα T κύτταρα, τα οποία παράγονται από τον θύμο αδένα αποτελούν τον φυσικό δολοφόνο των ξένων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών. Ένα άλλο είδος λεμφοκυττάρων τα B λεμφοκύτταρα, παράγουν αντισώματα αντιδρώντας στο ερέθισμα μιας εξωγενούς πρωτεΐνης. Τα B λεμφοκύτταρα μπορούν επίσης να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Ένας άλλος τύπος λευκοκυττάρων, τα μονοκύτταρα, αλληλεπιδρά με τα κύτταρα T και B, προάγοντας περαιτέρω την άμυνα του οργανισμού. Η βιολογική θεραπεία συνίσταται κυρίως χρήση ειδικών πρωτεϊνών υψηλής καθαρότητας, κυρίως ιντερφερόνης και ιντερλευκίνης-2, για να ενεργοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα. Η ιδιότητα των λεμφοκυττάρων που τα καθιστά ικανά να καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα ενισχύεται όπως βλέπουμε με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. [1]

- **Ορμονοθεραπεία:** Η ορμονοθεραπεία είναι μια αντικαρκινική θεραπεία που αναστέλλει την έκκριση ορμονών ή εμποδίζει τη δράση τους δυσχεραίνοντας έτσι την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Οι ορμόνες είναι ουσίες που παράγονται από αδένες του σώματος και κυκλοφορούν στο αίμα. Η παρουσία ορισμένων ορμονών μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση ορισμένων τύπων καρκίνου. Εάν αποδεικνύεται εργαστηριακά ότι τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν θέσεις στις οποίες μπορούν να συνδεθούν οι ορμόνες (υποδοχείς), χρησιμοποιούνται κυρίως φάρμακα ή χειρουργική επέμβαση για να μειωθεί η παραγωγή αυτών των ορμονών ή να ανασταλεί η δράση τους. Ορμονοθεραπεία με χορήγηση ορμονών ή αντι-ορμονών είτε χειρουργικοί ορμονικοί χειρισμοί (ωοθηκεκτομή ή ορχεκτομή) μπορούν να γίνουν σε όγκους που αποδεδειγμένα, μετά από ειδικές εξετάσεις, βρέθηκαν ορμονοευαίσθητοι, όπως π.χ. περιπτώσεις καρκίνου του μαστού ή του προστάτη. Κάποιοι

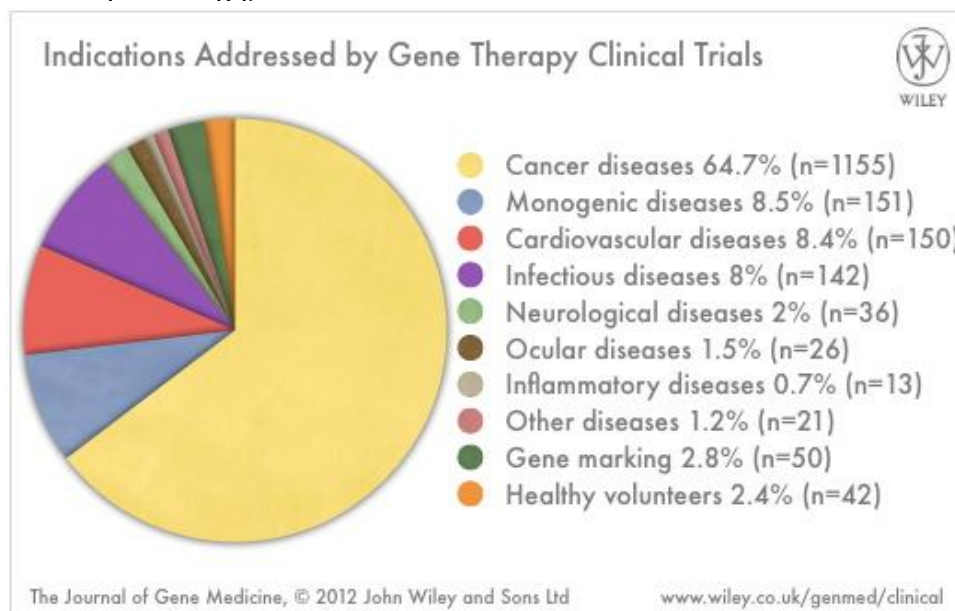
από αυτές τις θεραπείες ενέχουν μελλοντικούς κινδύνους, όπως την ανάπτυξη κάποιου δευτεροπαθούς όγκου, για αυτό και μετά την θεραπεία υπάρχει παρακολούθηση του/της ασθενούς σε τακτά διαστήματα για την πρόληψη αυτού του ενδεχόμενου. [1]

4.2 Γονιδιακή θεραπεία

Στόχος της γονιδιακής θεραπείας είναι η τροποποίηση του γενετικού υλικού ανθρώπινων κυττάρων για θεραπευτικούς σκοπούς. Αυτή η γενετική τροποποίηση αφορά τη μεταφορά ενός εξωγενούς γονιδίου (που αναφέρεται ως “διαγονίδιο”) ή μιας λειτουργικής αλληλουχίας νουκλεϊκού οξέος σε ανθρώπινα κύτταρα με στόχο την αλλαγή του φαινοτύπου τους. Η προσδοκώμενη αλλαγή του φαινοτύπου συνίσταται είτε στην υποκατάσταση ενός ελλείμματος είτε στην απόκτηση μιας νέας ιδιότητας με στόχο μια θεραπευτική δράση. [3]

Σήμερα, η έρευνα πάνω στη γονιδιακή θεραπεία στον άνθρωπο αφορά αποκλειστικά τη γονιδιακή μεταφορά σε σωματικά κύτταρα, της οποίας οι επιπτώσεις, θετικές ή αρνητικές, περιορίζονται σε ένα άτομο. Η γενετική τροποποίηση γαμετικών κυττάρων, αντίθετα, εγείρει μείζονα ηθικά ζητήματα, καθώς κληρονομείται στους απογόνους και μπορεί να έχει συνέπειες για τις μελλοντικές γενεές.

Αν και τα γενετικά νοσήματα αποτελούν τους καταλληλότερους στόχους γονιδιακής θεραπείας, στην πορεία, στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας αναπτύχθηκαν και για μια πληθώρα άλλων νοσημάτων που απαντούν πολύ συχνότερα στον ανθρώπινο πληθυσμό, όπως λοιμωδών και πολυπαραγοντικών νοσημάτων, καθώς και αυτά οφείλονται, τουλάχιστον εν μέρει, σε γενετικές διαταραχές. [4] Σήμερα περίπου 60% των συνολικών κλινικών μελετών αφορούν στον καρκίνο (Σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1: Τα είδη των νοσημάτων που αφορούν οι τρέχουσες κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας μέχρι σήμερα. [5]

Διαφορετικές στρατηγικές γενετικής τροποποίησης κυττάρων ακολουθούνται ανάλογα με τη γενετική βάση της παθογένειας του δεδομένου νοσήματος.

α) Μεταφορά του φυσιολογικού αλληλομόρφου ενός γονιδίου.

Η στρατηγική αυτή αναφέρεται ως “gene addition”, “gene replacement”, “gene augmentation”, καθώς και ως “κλασική γονιδιακή θεραπεία”. Προσφέρεται για μονογονιδιακά γενετικά νοσήματα που οφείλονται στη μείωση ή την πλήρη έλλειψη της έκφρασης ενός γονιδίου λόγω μετάλλαξης, ιδιαίτερα όταν υπάρχει ποικιλία διαφορετικών μεταλλάξεων υπεύθυνων για το νόσημα στο γενικό πληθυσμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η β-θαλασσαιμία, η οποία οφείλεται σε μειωμένη ή απύουσα έκφραση του γονιδίου της β σφαιρίνης και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια γονοτύπων. [6]

Η μεταφορά του φυσιολογικού γονιδίου μπορεί να στοχεύει τα κύτταρα στα οποία αυτό φυσιολογικά εκφράζεται ή, πολύ σπανιότερα, άλλα είδη κυττάρων, σε περιπτώσεις γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με συστηματική δράση (π.χ. ορμόνες, παράγοντες πήξης). [7]

β) Μεταφορά ενός γονιδίου που φυσιολογικά δεν εκφράζεται στα συγκεκριμένα κύτταρα και του οποίου η έκφραση προσδίδει σε αυτά ένα νέο φαινότυπο.

Η στρατηγική αυτή συνήθως χρησιμοποιείται για τη στόχευση καρκινικών κυττάρων με σκοπό τη θανάτωσή τους, μέσω της μεταφοράς γονιδίου που κωδικοποιεί μια τοξίνη ή μια πρωτεΐνη της οποίας η έκφραση καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στη δράση ενός προ-φαρμάκου. [8, 9]

γ) Αναστολή της έκφρασης ενός γονιδίου (“gene knock down”) που οδηγεί σε ένα προϊόν επιβλαβές για το κύτταρο.

Η στρατηγική αυτή προσφέρεται σε περιπτώσεις νοσημάτων που οφείλονται σε μεταλλάξεις “gain-of-function”, καθώς και κακοηθειών που οφείλονται στην υπερέκφραση πρωτο-ογκογονιδίων ή μη φυσιολογικών πρωτεϊνών εκ σύντηξης (π.χ. bcr-abl στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία). [10] Η αναστολή της έκφρασης μπορεί να επιτευχθεί μέσω μεταφοράς αντι-νοηματικών (anti-sense) ολιγονουκλεοτιδίων, siRNAs (small interfering RNAs) ή ριβοενζύμων. [11-13]

δ) Διόρθωση μεταλλάξεων.

Η στρατηγική αυτή αφορά στη διόρθωση μεταλλάξεων μέσω τροποποίησης του γονότυπου (genome editing). Καθώς η διόρθωση μεταλλάξεων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού είναι πολύ αναποτελεσματική, μια νεότερη προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση νουκλεασών με δομή δακτύλων ψευδαργύρου (zinc-finger nucleases, ZFNs), οι οποίες προκαλούν στοχευμένη θραύση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. [14,15] Στη συνέχεια, μηχανισμοί του κυττάρου επιδιορθώνουν τη θραύση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού χρησιμοποιώντας ως μήτρα το φυσιολογικό αλληλόμορφο. [16]

4.3 Ο Αυξητικός παράγοντας SDF-1 στη θεραπεία του καρκίνου

4.3.1 Η σίγηση του CXCR4 στη μετάσταση του καρκίνου του μαστού

Η παρεμβολή του RNA είναι ένας κυτταρικός μηχανισμός με τον οποίο το δίκλωνο RNA πυροδοτεί τη σίγηση του αντίστοιχου κυτταρικού γονιδίου. [17] Το δίκλωνο RNA στα κύτταρα μετατρέπεται σε μικρά δίκλιωνα RNA 21- με 22-νουκλεοτιδίων που ονομάζονται μικρά παρεμβατικά RNA. (siRNA - small interfering RNA). [18] Μια σημαντική εξέλιξη στην εφαρμογή της τεχνολογίας του παρεμβατικού RNA στα κύτταρα των θηλαστικών προήλθε από την ανάπτυξη σύνθετων siRNA 21- με 22-νουκλεοτιδίων για την σίγηση στοχευόμενων γονιδίων σε κύτταρα θηλαστικών. [19, 20]

Καρκινικά κύτταρα του μαστού συνήθως μεταναστεύουν στους περιφερειακούς λεμφαδένες, στο μυελό των οστών στους πνεύμονες και το ήπαρ. Ο υποδοχέας CXCR4, όπως αναφέραμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, παίζει κρίσιμο ρόλο στη μετάσταση του καρκίνου του μαστού μέσω του συνδέτη του, SDF-1. Στη μελέτη [21], που δημοσιεύτηκε στο “Cancer Research”, παρουσιάζεται με επιτυχία την παρεμπόδιση της εισβολής *in vitro* και *in vivo* της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων του μαστού σε ζωικό μοντέλο με σίγηση της γονιδιακής έκφρασης του CXCR4 με τη βοήθεια των siRNA. Τα siRNA που απευθύνονται στον υποδοχέα CXCR4 θα είναι χρήσιμα τόσο στη μελέτη της λειτουργίας τους γονιδίου CXCR4, όσο και στις θεραπευτικές εφαρμογές για τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού.

Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά διπλά siRNA του CXCR4 (αριθμός ένταξης Genbank no. NM_003467):

- siRNA1 (sense, 5'-UAAAAUCUUCUGCCACCCdTdT-3')
- siRNA2 (sense, 5'- GGAAGCUGUUGGCUGAAAAdTdT- 3')

από την Dharmacon (Lafayette, CO). Τα διπλά siRNA μη ειδικού έλεγχου (nonspecific control siRNA duplexes) αγοράστηκαν από την Dharmacon με το ίδιο GC-περιεχόμενο όπως και τα siRNA για τον CXCR4 (42%, D001206-10). Η κυτταρική σειρά MDA-MB-231 ανθρώπινου καρκίνου του μαστού καλλιιεργήθηκε σε 5% CO₂ σε θερμοκρασία 37°C στο RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) και συμπληρώθηκε με 10% εμβρυικό ορό βοοειδών (Sigma). Τα siRNA επιμόλυναν τα κύτταρα MDAMB-231 σε τελική συγκέντρωση 120 nmol/L χρησιμοποιώντας LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) *in vitro*. [21]

Τα πειράματα σε ζώα έγιναν σε CB-17 θηλυκά ποντίκια (SCID) ηλικίας 6-8 εβδομάδων (Taconic Farms, Germantown, NY) και χωρίστηκαν σε 6 ομάδες των 6 ποντικών. Στην ομάδα 1 των ποντικών τους χορηγήθηκαν με ένεση 2x10⁶ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα επιμολυσμένα με διπλά siRNA μη ειδικού ελέγχου και αργότερα χορηγήθηκαν ενέσεις με siRNA ελέγχου δύο φορές την εβδομάδα. Στις ομάδες 2 και 3 των ποντικών χορηγήθηκαν ενδοφλέβιες ενέσεις στην φλέβα της ουράς του 2x10⁶ MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα επιμολυσμένα με CXCR4 siRNA1+2, 48 ώρες πριν ξεκινήσουν οι ενέσεις. Τα ποντίκια στην ομάδα 2 υποβλήθηκαν σε θεραπεία με CXCR4 siRNA1+2 δύο φορές εβδομαδιαίως (0.5 μg/g βάρους σώματος), ενώ τα ποντίκια της ομάδας 3 δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία μετά τη χορήγηση των καρκινικών κυττάρων. Στα ποντίκια της ομάδας 4 χορηγήθηκαν με ένεση 2x10⁶ MDA-MB-231 χωρίς προηγούμενη επιμόλυνση με siRNA1+2 και υποβλήθηκαν σε θεραπεία μόνο με CXCR4 siRNA1+2 δύο φορές τη εβδομάδα (0.5 μg/g βάρους σώματος) μετά την ένεση. Οι ομάδες 5 και 6 των ζώων έλαβαν ενδοφλέβιες

ενέσεις από την φλέβα της ουράς των 2×10^6 MDA-MB-231 επιμολυσμένα με CXCR4 siRNA1 ή 2, αντίστοιχα, 48 ώρες πριν την έναρξη της χορήγησης ενέσεων στα ζώα και υποβλήθηκαν σε θεραπεία με siRNA δύο φορές την εβδομάδα. Συγκεντρωτικά οι ομάδες αναφέρονται στον πίνακα 4.1. [21]

Group	siRNAs	Pretransfection of siRNAs	Posttreatment of naked siRNAs
1	Control siRNA	Yes	Yes
2	siRNA1+ siRNA2	Yes	Yes
3	siRNA1+ siRNA2	Yes	No
4	siRNA1+ siRNA2	No	Yes
5	siRNA1	Yes	Yes
6	siRNA2	Yes	Yes

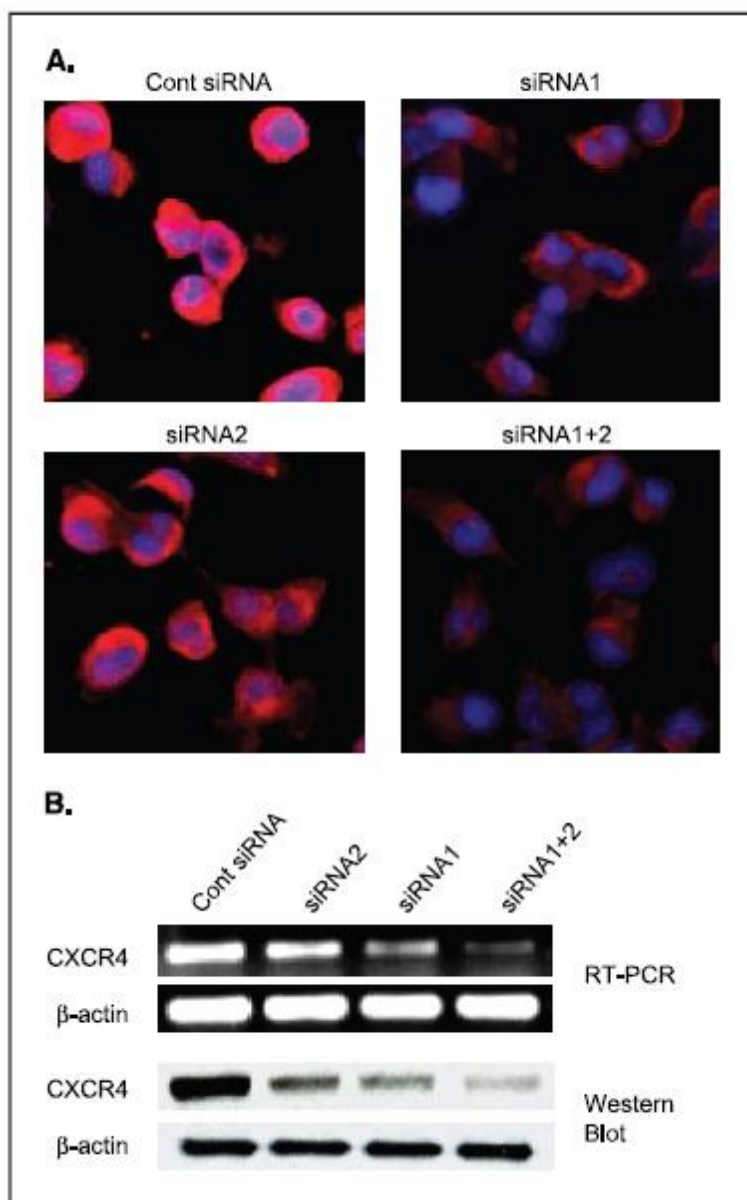
Πίνακας 4.1: Λίστα των ομάδων των ποντικιών. [21]

Η αναστολή της αλληλεπίδρασης του ζεύγους CXCR4/SDF1 με επιλεκτικούς ανταγωνιστές ή αντισώματα anti-CXCR4 παρεμποδίζει τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού. [22, 23] Στη μελέτη [21] έγινε προσπάθεια να διαπιστωθεί αν η μείωση των επιπέδων mRNA του CXCR4 χρησιμοποιώντας siRNA μπορεί να εμποδίσει τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού. Πρόληψη της έκφρασης του υποδοχέα CXCR4 με παρεμβατικό RNA ενδέχεται να είναι πιο αποτελεσματική στη πρόληψη της μετάστασης του καρκίνου του μαστού που διαμεσολαβείται από την αλληλεπίδραση CXCR4/SDF-1. Δύο siRNA αναπτύχθηκαν ειδικά για το mRNA του CXCR4. Το siRNA1 ήταν πιο αποτελεσματική στη μείωση της έκφρασης του υποδοχέα CXCR4 από το siRNA2 (Εικόνα 4.1). Ο συνδυασμός των siRNA1 και siRNA2 (siRNA1+2) πέτυχε ακόμα καλύτερη καταστολή της έκφρασης του CXCR4 σε mRNA και στο επίπεδο πρωτεΐνης (Εικόνα 4.1). [21]

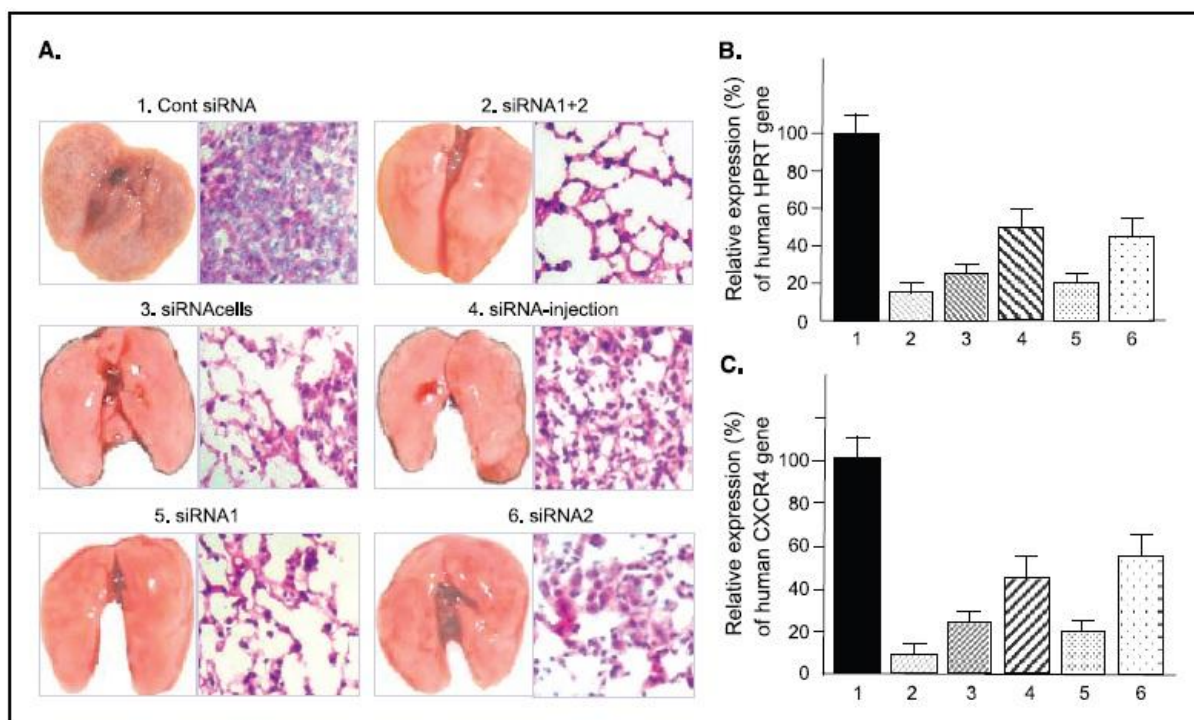
Τα MDA-MB-231 κύτταρα επιμολυσμένα με τα CXCR4-siRNA1+2 χορηγήθηκαν με ενδοφλέβια ένεση στη φλέβα της ουράς θηλυκών SCID ποντικιών. Οι 6 ομάδες ζώων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 4.1. Σαράντα πέντε ημέρες μετά την έγχυση των καρκινικών κυττάρων, όλα τα ζώα στην ομάδα ελέγχου (ομάδα 1) ανέπτυξαν μεταστάσεις στους πνεύμονες. Αντίθετα μόνο ένα ζώο στην ομάδα 2 ανέπτυξε μεταστάσεις και αυτές ήταν ελάχιστα ορατές. Μια αντιπροσωπευτική εικόνα των πνευμόνων στην εικόνα 4.2A δείχνει κυστικές μικρομεταστάσεις στην ομάδα ελέγχου (ομάδα 1). Από την άλλη πλευρά τρεις αντιπροσωπευτικές εικόνες των πνευμόνων από τις πέντε ομάδες που έλαβαν θεραπεία παρουσιάζουν σημαντικά λιγότερες ορατές μεταστάσεις στους πνεύμονες, και κυρίως στις ομάδες 2 και 5 είναι μειωμένες (Εικόνα 4.2A). Η χρώση H-E (hematoxylin and eosin stain) των ιστών του πνεύμονα από την ομάδα 2 παρουσιάζει τη μορφολογία του φυσιολογικού πνεύμονα ενώ από την ομάδα ελέγχου παρουσιάζει την εισβολή των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 4.2A). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν περισσότερο με τη μέθοδο semiquantitative real-time PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές από το ανθρώπινο housekeeping γονίδιο hHPRT (Human hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase) το οποίο δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με το ομόλογο του ποντικίου (εικόνα

4.2B). Το housekeeping γονίδιο είναι συνήθως ένα συστατικό γονίδιο που απαιτείται για τη διατήρηση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών και εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού). Το γονίδιο hHPRT διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη παραγωγή νουκλεοτιδίων πουρίνης μέσω του μονοπατιού διάσωσης της πουρίνης. Τα MDA-MB-231 κύτταρα στον πνεύμονα ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο real-time PCR χρησιμοποιώντας hHPRT αντί για CXCR4 επειδή τα επίπεδα CXCR4 στα κύτταρα αυτά θα πρέπει να αναμένονται χαμηλή από τα siRNA και δεν θα μπορούσαν να υποδηλώσουν την παρουσία των μεταστάσεων στους πνεύμονες. Η ανάλυση Real-time PCR έδειξε υψηλή έκφραση του hHPRT mRNA στη μετάσταση στους πνεύμονες των SCID ποντικών στην ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, υπάρχουν σημαντικά λιγότερες μεταστάσεις στους πνεύμονες στα ποντίκια των ομάδων 2,3 και 5, με βάση τα επίπεδα έκφρασης του hHPRT στους πνεύμονες (Εικόνα 4.2B). Όπως αναμενόταν, η ανάλυση real-time PCR για το ανθρώπινο συγκεκριμένο γονίδιο CXCR4 σε αυτούς τους ιστούς πνευμόνων έδειξαν υψηλή έκφραση του CXCR4 τους πνεύμονες ποντικών της ομάδας ελέγχου και πολύ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης CXCR4 στους πνεύμονες των ομάδων που χορηγήθηκε θεραπεία (Εικόνα 4.2C). [21]

Οι ομάδες 1 έως 4 συγκρίθηκαν για να προσδιοριστεί κατά πόσο η μείωση των επιπέδων του CXCR4 μπορεί να εμποδίσει τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού στους πνεύμονες και ποια είναι η αποτελεσματικότητα της προ-θεραπείας και της μετα-θεραπείας με siRNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πιο αποτελεσματική θεραπεία ήταν η ένεση με τα CXCR4 siRNA1+2 επιμολυσμένα κύτταρα και δύο φορές την εβδομάδα ενδοφλέβια ένεση με siRNA1+2. Οι ομάδες 1,2,5 και 6 συγκρίνονται για να καθοριστεί ποιος από τους διαφορετικούς συνδυασμούς των siRNA θα φέρει αποτέλεσμα στην πρόσληψη των μεταστάσεων. Το siRNA1 ήταν πιο αποτελεσματικό στη μείωση της έκφρασης του υποδοχέα CXCR4 από το siRNA2 in vitro και in vivo (ομάδα 5 σε σύγκριση με την ομάδα 6). Ο συνδυασμός των siRNA1 και siRNA2 (siRNA1+2) πέτυχε ακόμη περισσότερο την αναστολή της έκφρασης του CXCR4 in vitro σε σχέση με κάθε ένα ξεχωριστά. Ομοίως, ο συνδυασμός των siRNA1+2 in vivo εμπόδισε τη μετάσταση στους πνεύμονες ελαφρώς περισσότερο από ό, τι siRNA1 μόνο (ομάδα 2 σε σύγκριση με ομάδα 5). Η θεραπεία με CXCR4 siRNA μείωσε μόνο τα επίπεδα CXCR4 στα MDA-MB-231 κύτταρα χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα hHPRT in vitro. Η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει την αναγκαιότητα του CXCR4 στη μετάσταση του καρκίνου του μαστού και ανοίγει ένα νέο δρόμο για τη πρόληψη της μετάστασης του καρκίνου του μαστού. [21]



Εικόνα 4.1: Α. Τα επίπεδα έκφρασης των MDA-MB-231 κυττάρων σε 48 ώρες από την επιμόλυνση με τα CXCR4 siRNA-επιμολυσμένα κύτταρα MDA-MB-231 χρωματίζονται με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας βιοτινυλιώμενο CXCR4 ανταγωνιστικό πεπτίδιο και στρεπταβιδίνη συζευγμένης με φυκοερυθρίνη. Κόκκινο: φυκοερυθρίνη χρώση του υποδοχέα CXCR4, Μπλε: αντιχρωματισμός των πυρήνων. Β. Η ανάλυση real-time PCR του CXCR4 από τα siRNA-επιμολυσμένα MDA-MB-231 κύτταρα έδειξαν ότι τα siRNA1+2 αποτελεσματικά παρεμποδίζουν την έκφραση του mRNA του CXCR4. Τα αποτελέσματα από τη Western blot (ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στο συγκεκριμένο δείγμα του ιστού) για τα siRNA-επιμολυσμένα MDA-MB-231 κύτταρα με τη χρήση αντι-CXCR4 αντισώματος Ab-2 (1:1,000) έδειξε ότι το siRNA1+2 μπλοκάρει την έκφραση της πρωτεΐνης του CXCR4 σχεδόν εντελώς. Β-Actin (Sigma, 1:2,500) χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. [21]



Εικόνα 4.2: Επίδραση των CXCR4 siRNA για την αναστολή των μεταστάσεων του καρκίνου του μαστού in vivo. Α. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των πνευμόνων και με χρώση Η-Ε (αρχική μεγέθυνση 100) της κάθε ομάδας από δύο ανεξάρτητα πειράματα. Β. Ο μέσος όρος στα επίπεδα έκφρασης του hPRT στις ομάδες 2, 3, 4, 5 και 6 ήταν 12,5% ($P < 0,0040$), 21,5% ($P < 0,0064$), 47% ($P < 0,0447$), 25,3% ($P < 0,0063$), και 42,1% ($P < 0,031$), αντίστοιχα, σε σύγκριση με εκείνα της ομάδας ελέγχου (ομάδα 1). Γ. Τα μέσα επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου γονιδίου CXCR4 στις ομάδες 2, 3, 4, 5, και 6 ήταν 8,1% ($P < 0,0006$), κατά 22,9% ($P < 0,0022$), 40,1% ($P < 0,0157$), το 23,8% ($P < 0,0074$), και 59,1% ($P < 0,152$), αντίστοιχα, σε σύγκριση με εκείνα της ομάδας ελέγχου. [21]

4.3.2 Η σίγηση του CXCR4 στην οξεία μυελογενή λευχαιμία

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν τον ρόλο του υποδοχέα CXCR4 και του συνδέτη του, SDF-1a, στην ρύθμιση των κανονικών και λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων in vivo [24, 25], στην επιβίωση και στη διαφοροποίηση των λευχαιμικών κυττάρων, και στην ανάπτυξη των ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). [26, 27] Τα υψηλά επίπεδα της έκφρασης CXCR4 στην επιφάνεια των βλαστών της Οξείας μυελογενούς λευχαιμίας συνδέεται με την overall survival [29] και μπορεί να ευθύνεται για την ανθεκτικότητα στα αντιλευχαιμικά φάρμακα. [25, 28] Η παρεμπόδιση του υποδοχέα από το μικρό μοριακό αναστολέα AMD3100 επιτυγχάνει την κινητοποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων από το μυελό των οστών στο περιφερικό αίμα και την αναστολή την ανάπτυξης και μετάστασης των πειραματικών όγκων σε ζωικά μοντέλα. Ο AMD3100 είναι ένας μη πεπτιδικός ανταγωνιστής του υποδοχέα CXCR4 που χρησιμοποιείται σήμερα για να αναστέλλει τη λειτουργία του υποδοχέα CXCR4 και να κινητοποιεί τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. [28, 29] Μια άλλη στρατηγική για τη ρύθμιση και τη μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης του CXCR4 στα κύτταρα στόχου βασίζεται σε συγκεκριμένη παρεμπόδιση της έκφρασης του CXCR4/SDF-1 σε επίπεδο mRNA με τη χρησιμοποίηση siRNA ή με αντιαγγελιοφόρα ολιγονουκλεοτίδια (oligonucleotide antisense). [21, 30]

Τα MicroRNA (miRs) είναι μικρά μη-κωδικοποιημένα RNA που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση μέσω της μεταγραφικής καταστολής. Πρόσφατα εντοπίστηκε ο υποδοχέας CXCR4 ως στόχος του miR-146a που μπορεί να αποτελεί ένα νέο εργαλείο για την μείωση της έκφρασης του CXCR4 σε επίπεδο πρωτεϊνών στα κύτταρα-στόχους. [31]

Στη μελέτη [32] ερευνάται η χρήση των Mir-146a και AMD3100 στην διαμόρφωση και μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης του CXCR4 και στη τόνωση της ευαισθησίας των λευχαιμικών κυττάρων σε φάρμακα. Στη μελέτη διερευνάται η επίδραση του AMD3100 για 24 ώρες, μόνο του αλλά και σε συνδυασμό με ένα αντι-λευχαιμικό φάρμακο, όπως το Ara-C21 (Σχήμα 4.2a) ή το Doxorubicin21 σε λευχαιμικά κύτταρα διάδοσης. Τα στοιχεία δείχνουν ότι, όπως αναμενόταν, το Ara-C επηρεάζει μια ανεξάρτητη-δόση αναστολή της ανάπτυξης του τόσο των U937-miR146a όσο και των U937-E κυττάρων ελέγχου (Ara-C 1–3 μM), ενώ το AMD3100 μόνο του έχει μία ήπια ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη αυτών των κυττάρων (Σχήμα 4.2a AMD). Τα κύτταρα U937 είναι ανθρώπινες μονοκυτταρικές λευχαιμικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στη βιοϊατρική έρευνα. Ωστόσο, η επίδραση του AMD3100 σε συνδυασμό με το Ara-C για την αναστολή της ανάπτυξης των λευχαιμικών κυττάρων είναι μεγαλύτερη από ότι στο παρελθόν παρατηρήθηκε με μόνο του το Ara-C στα U937-miR146a κύτταρα και στα U937-E κύτταρα ελέγχου (Σχήμα 4.2a, AMD+Ara-C). Η υπερέκφραση miR-146a ενισχύει, σε ένα ήπιο αλλά σημαντικό επίπεδο, την επίδραση του AMD3100 που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το Ara-C, ως μια σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των U937-miR146a κυττάρων που παρατηρείται στη θεραπεία συνδυασμού, σε σύγκριση με τα U937-E κύτταρα ελέγχου (Σχήμα 4.2a, U937-miR146a). Η επίδραση του AMD3100 σε συνδυασμό με την Ara-C δεν φαίνεται να σχετίζεται με επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης, όπως υποδεικνύεται από την ανάλυση της μορφολογίας του κυττάρου και τα αντιγόνα διαφοροποίησης της μεμβράνης (τα δεδομένα δεν εμφανίζονται). [32]

Από τα παραπάνω δεδομένα, αποδεικνύεται ότι η AMD3100 θεραπεία αυξάνει την ευαισθησία των φαρμάκων των λευχαιμικών κυττάρων και τα miR-146a, μέτρια, αλλά σημαντικά ενισχύουν το αποτέλεσμα αυτό. [32]

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών είναι σε θέση να διαμορφώνουν τη χημειοευαισθησία (chemosensitivity) των λευχαιμικών βλαστών μέσω μηχανισμών που αφορούν το CXCR4/SDF-1a, το VLA-4/φιμπρονεκτίνη και άλλους μεσολαβητές/υποδοχείς. Η ανάπτυξη *in vitro* των λευχαιμικών κυττάρων σε στρωματικά κύτταρα MS5, όπου εν μέρει μιμούνται το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, επηρεάζουν την ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στα αντινεοπλασματικά φάρμακα. [26] Αναπτύχθηκαν, επομένως, U937-E και U937-miR146a κύτταρα με την παρουσία ενός στρώματος κυττάρων MS5 (Σχήμα 4.2b, δεξιός πίνακας), σε σύγκριση με υγρές καλλιέργειες (Σχήμα 4.2b, αριστερός πίνακας), και αξιολογείται η ευαισθησία τους στο φάρμακο Ara-C, αναλύοντας την επαγωγή της απόπτωσης στα U937-E και U937-miR146a κύτταρα (Σχήμα 4.2b). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι (i) η ευαισθησία των U937-E και των U937-miR146a κυττάρων στο φάρμακο Ara-C, ιδιαίτερα όταν προστίθεται 1 μM φαρμάκου, μειώνεται σημαντικά όταν καλλιεργούνται σε κύτταρα MS5. Ωστόσο, η μείωση αυτή είναι πιο έντονη στα U937-E σε σχέση με τα U937-miR146a κύτταρα. (ii) Το AMD3100 εν μέρει διασώζει αυτή τη μείωση της ευαισθησίας για τα ναρκωτικά: αυτή η διάσωση είναι πιο έντονη U937-miR146a σε σχέση με τα U937-E

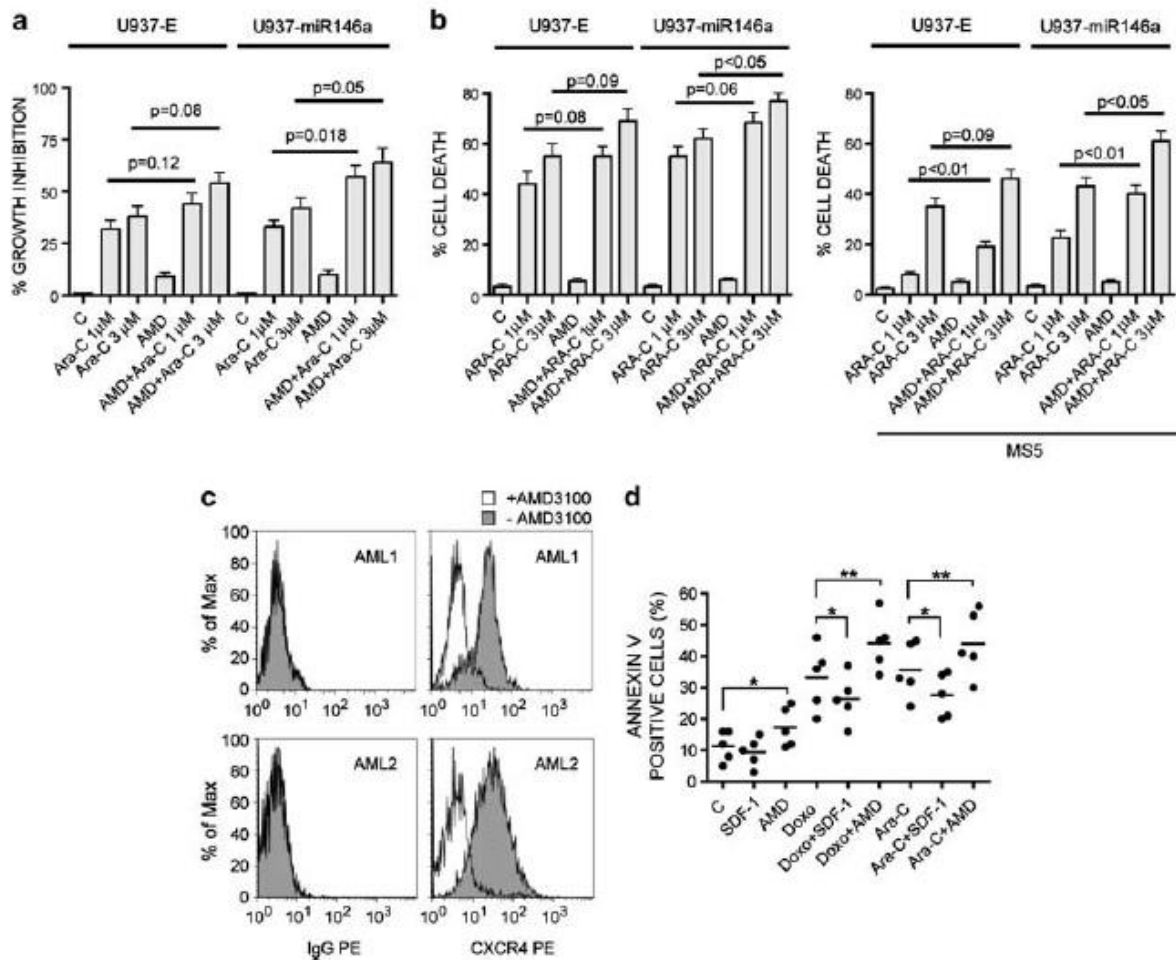
κύτταρα (Σχήμα 4.2b). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συνδυασμένη διαμόρφωση και μείωση της έκφρασης του CXCR4 με τη μεσολάβηση της υπερέκφρασης του MiR-146a και της θεραπείας AMD3100 είναι πιο αποτελεσματική από τη θεραπεία AMD3100 μόνο για την αποκατάσταση της χημειοευαισθησίας των λευχαιμικών κυττάρων όταν αυτά τα κύτταρα καλλιεργούνται με παρουσία στρωματικών κυττάρων. [32]

Τα στοιχεία, επομένως, δείχνουν ότι η αναστολή της έκφρασης του CXCR4 με την υπερέκφραση του miR-146a και με το AMD3100 αντιπροσωπεύει μια στρατηγική για τη βελτίωση της ευαισθησίας των λευχαιμικών κυττάρων στα φάρμακα. [32]

Ερευνήθηκε ακόμη ο λειτουργικός ρόλος του αποκλεισμού του υποδοχέα CXCR4 από το AMD3100 στο αρχικό στάδιο της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Επιλέχθηκαν πέντε περιπτώσεις που βρίσκονται στο αρχικό στάδιο της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης του CXCR4 και χαμηλά ποσοστά αυθόρμητης απόπτωσης, για να αναλυθεί η ικανότητα του AMD3100 να ανταγωνιστεί με το μονόκλωνο αντι-CXCR4 αντίσωμα 12G5 για τη δέσμευση του CXCR4. [33, 34] Τα δεδομένα δείχνουν, όπως επισημάνθηκε προηγουμένως σε λευχαιμικά κύτταρα με υψηλή συγκέντρωση (10 μM) AMD3100 (Σχήμα 4.2a), ότι η AMD3100 θεραπεία σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, όπως σε 1 μM, προκαλεί σημαντική μείωση της επιφάνειας χρώσης της πρωτεΐνης του CXCR4, στις επιλεγμένες περιπτώσεις πρωτογενούς οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (Σχήμα 4.2c). Στη συνέχεια αναλύθηκε το κατά πόσον η αναστολή του CXCR4 από οξεία AMD3100 θεραπεία (24 ώρες) ρυθμίζει την ευαισθησία των βλαστικών κυττάρων της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, θεραπεύοντας δειγμάτων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας θετικών στον υποδοχέα CXCR4 με AMD3100 σε συνδυασμό, είτε όχι, με χημειοθεραπεία (Ara-C ή δοξορουβικίνη, Doxo) για 24 ώρες (Σχήμα 4.2d). Τα στοιχεία δείχνουν ότι η SDF-1α θεραπεία δεν τροποποιεί σημαντικά το ποσοστό της αυθόρμητης απόπτωσης των βλαστικών κυττάρων της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Σε αντίθεση, το AMD3100 προκαλεί μια μικρή αλλά σημαντική αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων σε σύγκριση με τα κύτταρα χωρίς θεραπεία (Σχήμα 4.2d). Ωστόσο, η θεραπεία με AMD3100 ενισχύει σημαντικά τη θεραπεία με Ara-C ή με δοξορουβικίνη των λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων, σε σύγκριση με τη περίπτωση χωρίς θεραπεία, ενώ ο SDF-1α τη μειώνει. (Σχήμα 4.2d). [32]

Επομένως, τα δεδομένα δείχνουν ότι η οξεία θεραπεία με AMD3100 των πρωτογενών βλαστικών κυττάρων της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας ρυθμίζει και μειώνει την επιφάνεια της έκφρασης της πρωτεΐνης του CXCR4 και ενισχύει την ευαισθησία τα βλαστικά κύτταρα της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας στη χημειοθεραπεία και την απόπτωση. [32]

Συνολικά, η μελέτη έδειξε ότι η χαμηλή έκφραση του miR-146a μπορεί να συμβάλει στην αυξημένη έκφραση του CXCR4 σε ορισμένες οξείες μυελογενείς λευχαιμίες. Επιπλέον, ρυθμίζοντας τα επίπεδα του miR-146a, όπως έχει πρόσφατα δειχθεί για ορισμένους συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού [35] και του καρκίνου του παγκρέατος [36], θα μπορούσαν να έχουν θεραπευτική δυναμική, σε συνδυασμό με αναστολείς του υποδοχέα CXCR4, για να βελτιωθεί η ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στα φάρμακα. [32]



Σχήμα 4.2: Η θεραπεία με miR-146a και AMD3100 διαμορφώνει και μειώνει την έκφραση του υποδοχέα CXCR4, ενισχύει την ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στα φάρμακα και μειώνει την προστασία στη χημειοθεραπεία στα στρωματικά κύτταρα. (a) Η αναστολή της ανάπτυξης των U937-E και U937-miR146a κυττάρων μετά τη θεραπεία (0-2 ημέρες) με AMD3100 (AMD) (10 µM) σε συνδυασμό, είτε όχι, με το Ara-C (1 ή 3 µM), σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς θεραπεία (C). (b) Επαγωγή της απόπτωσης στα U937-E και U937-miR146a κύτταρα που καλλιεργούνται σε υγρές καλλιέργειες και, είτε σε περίπτωση απουσίας (αριστερή πλευρά) ή με την παρουσία (δεξιά πάλιν) σε ένα στρώμα των στρωματικών MS5 κυττάρων. (c) Η FACS (Fluorescence-activated cell sorting) της έκφρασης της πρωτεΐνης του CXCR4 στην επιφάνεια δυο αντιπροσωπευτικών δειγμάτων πρωτογενούς οξείας μυελογενούς λευχαιμίας που χορηγείται 24ωρη θεραπεία AMD3100 (1µM) (λευκή σκιά) ή χωρίς θεραπεία (γκρι σκιά). Ιστογράμματα φθορισμού ανοσοσφαιρίνης G-φυκοερυθρίνη (IgG-PE) και CXCR4-PE αναφέρουν, αντίστοιχα, επισήμανση των PE-συζευγμένων IgG ποντικού ελέγχου και επισήμανση της επιφάνειας με PE-συζευγμένων CXCR4 των δύο δειγμάτων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. (d) Ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, που υποδεικνύουν ως ανεξίτηνη-V-θετικά κύτταρα, ανιχνεύθηκαν με FACS που διεξήχθη σε πέντε βασικά δείγματα οξείας μυελογενούς που καλλιεργήθηκαν σε 24 ώρες: (i) χωρίς θεραπεία ως έλεγχος (C), ή με (ii) 100 ng/ml από το συνδέτη του CXCR4 (SDF-1), ή (iii) 1 µM AMD3100 (AMD) ή (iv) 1 µM Ara-C, ή (v) 1 µM δοξορουβικίνη (Doxo), (iv και v), μόνα ή σε συνδυασμό με το AMD. Οι ράβδοι που αναφέρθηκαν στα διαγράμματα διασποράς αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές. *P<0.05, **P<0.01. [32]

4.3.3 Η σίγηση του CXCR4 στη μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου

Σε αρκετές μελέτες έχει αναφερθεί ότι ο υποδοχέας CXCR4 εκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου και σχετίζεται σημαντικά με την επιβίωση, την υποτροπή και τη μετάσταση στο ήπαρ. [37, 38] Επιπλέον, φαίνεται ότι η ταυτόχρονη υψηλή έκφραση του υποδοχέα CXCR4 και του VEGF είναι ένας ισχυρός και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας των πρόωρων μακρινών υποτροπών του καρκίνου του παχέος εντέρου [39] και πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι ο CXCR4 μπορεί επίσης να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση των όγκων του καρκίνου του παχέος εντέρου.[40] Ο VEGF (Vascular endothelial growth factor) είναι μία σηματοδοτική πρωτεΐνη που παράγεται από τα κύτταρα και διεγείρει την αγγειοποίηση και την αγγειογένεση.

Μία σημαντική έρευνα για την επίδραση της σίγησης του CXCR4 πραγματοποιήθηκε από το University of the Saarland. Στην έρευνα αυτή [41] Χειρουργικά δείγματα και αντίστοιχα δείγματα φυσιολογικού ιστού συλλέχθηκαν από ασθενείς συλλέχθηκαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εκτομή στο τμήμα της γενικής χειρουργικής, σπλαγγικής χειρουργικής, αγγειοχειρουργικής και παιδοχειρουργικής του Πανεπιστημίου του Saarland μεταξύ των ετών 2003 και 2006.Κανένας ασθενής δεν υποβλήθηκε σε καμία συγκεκριμένη θεραπεία καρκίνου πριν από την εκτομή. Οι ασθενείς αποτελούσαν ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου σε διαφορετικά στάδια του καρκίνου (n = 50). [41] Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών εμφανίζονται στον πίνακα 4.2.

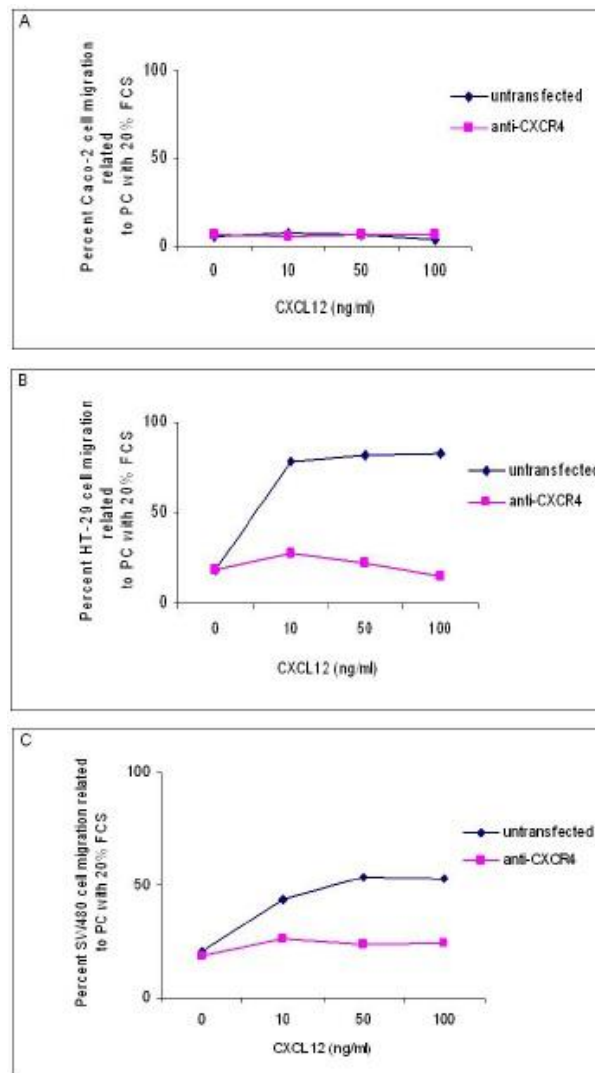
Factor	CRC ² n = 50
Localization of primary tumor	
Colon	23
Rectum	27
Gender	
Male	30
Female	20
Age, years ³	63.9 (47-78)
Hepatitis (A,B or C)	
Positive	6
Negative	44
Largest tumor diameter (cm) ³	4.7 (1.2-9.1)
TNM ¹ stage of primary tumor	
I	8
II	16
III	16
IV	10
Grading	
I	0
II	22
III	27
Lymphatic permeation	
Positive	28
Negative	22
Vascular invasion	
Positive	7
Negative	43

¹Tumor-node-metastasis; ²Colorectal carcinoma;

³Median with range in parentheses.

Πίνακας 4.2: Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκινώματα παχέος εντέρου [41]

Τρεις κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν, οι Caco-2, HT-29 and SW480. Η Caco-2 κυτταρική σειρά είναι μια συνεχής γραμμή ετερογενών ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, η HT-29 κυτταρική σειρά είναι ανθρώπινα κύτταρα του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου που είναι σε θέση να εκφράσουν τις δυνατότητες διαφοροποίησης, χαρακτηριστικό των ώριμων κυττάρων του εντέρου, όπως τα κυπελλοειδή κύτταρα και η τρίτη κυτταρική σειρά, SW480, είναι μία γραμμή επιθηλιακών κυττάρων του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου.

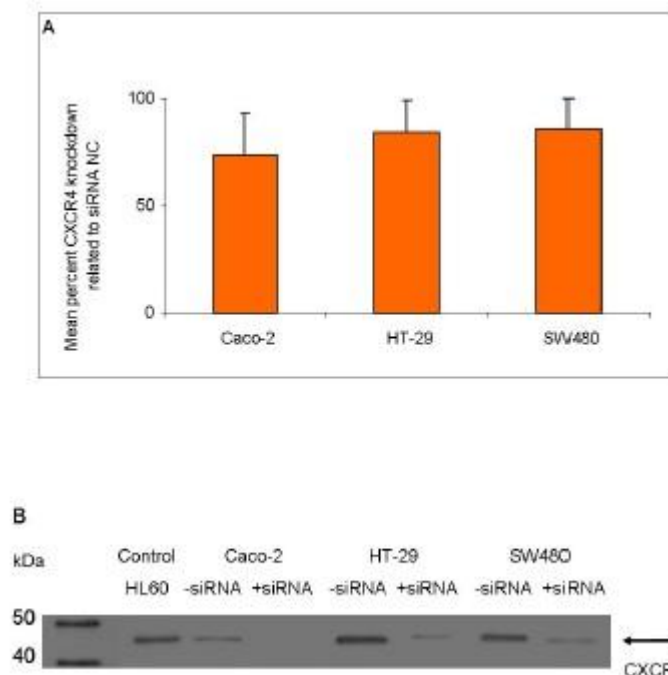


Σχήμα 4.3: Η αναστολή της πρωτεΐνης του CXCR4 σταματάει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. (A) Το ποσοστό μετανάστευσης κυττάρων Caco-2 που σχετίζονται με ένα θετικό έλεγχο (PC – Positive Control) που περιέχει 20% FCS - ορό εμβρύου μόσχου χωρίς αναστολή και μετά την αναστολή με αντι-CXCR4 αντισώματα. (B) Το ποσοστό μετανάστευσης HT-29 των κυττάρων που σχετίζονται με θετικό έλεγχο (PC) χωρίς αναστολή και μετά την αναστολή με αντι-CXCR4 αντισώματα. (C) Το ποσοστό μετανάστευσης κυττάρων SW480 που σχετίζονται με θετικό έλεγχο (PC) χωρίς αναστολή και μετά την αναστολή με αντι-CXCR4 αντισώματα. [41]

Οι τρεις κυτταρικές σειρές τονώθηκαν με 10, 50 και 100 ng/ml CXCL12, αντίστοιχα, και επώαστηκαν για 48 ώρες. Ενώ στα Caco-2 κύτταρα δεν διεγείρεται από καμία συγκέντρωση CXCL12 (Σχήμα 4.3A), παρατηρήσαμε μια σημαντική CXCL12 ανεξάρτητη

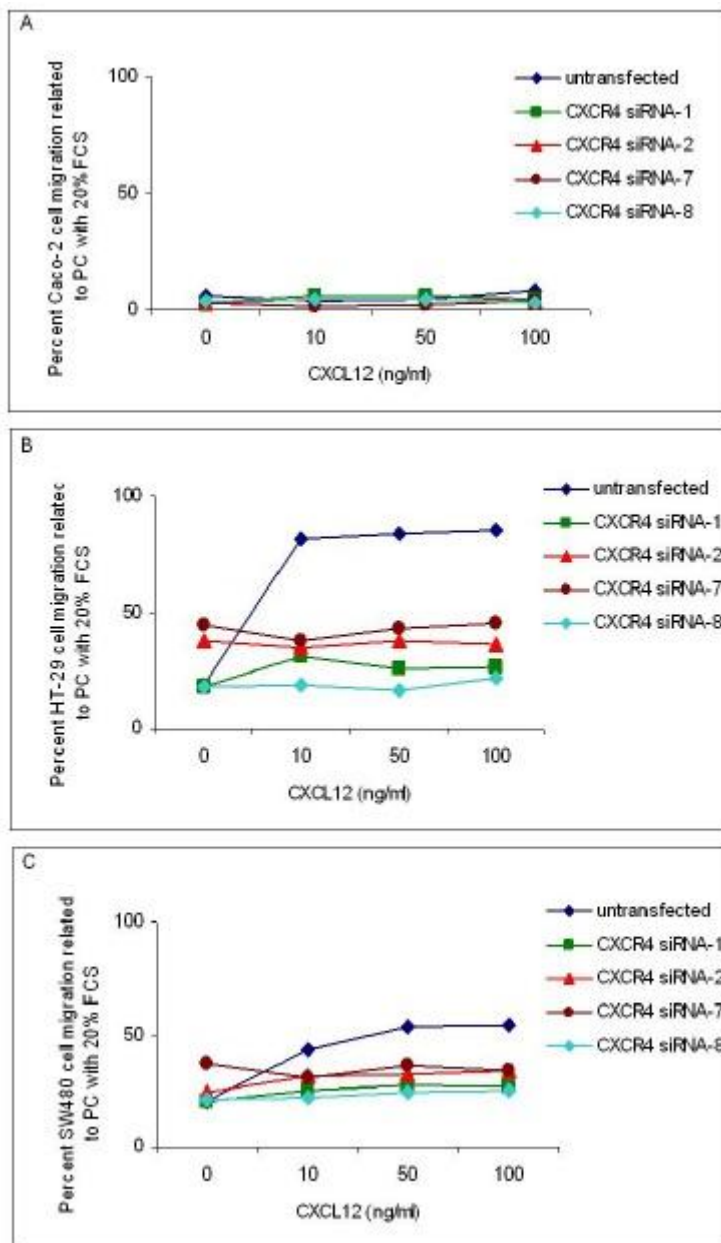
από τη δόση διέγερση της μετανάστευσης για τις HT-29 και SW480 κυτταρικές σειρές (Σχήμα 4.3B και 4.3C, αντίστοιχα) ($P < 0,05$). Όταν προστέθηκε αντι-CXCR4 αντίσωμα που εξουδετερώνει το CXCR4 πριν από την εκτέλεση των δοκιμασιών μετανάστευσης των κυττάρων, η διέγερση του CXCL12 για τη μετανάστευση των HT-29 και SW480 κυττάρων είχε σχεδόν σταματήσει σε όλες τις συγκεντρώσεις CXCL12 υπό διερεύνηση (Σχήμα 4.3B και 4.3C, αντίστοιχα) ($P < 0,05$). Η εφαρμογή των αντι-CXCR4 αντισωμάτων δεν είχε καμία επίπτωση στην ενδεχόμενη μετεγκατάσταση των Caco-2 κύτταρων (Σχήμα 4.3A). [41]

Για να εξετασθεί εάν η χημειοτακτική επίδραση του CXCL12 σχετικά με τη μετανάστευση των HT-29 και SW480 κυττάρων θα μπορούσαν να εξουδετερωθούν από την ρύθμιση και μείωση του mRNA του αντίστοιχου υποδοχέα CXCR4, εφαρμόστηκαν τέσσερα διαφορετικά CXCR4 siRNA. Ο μέσος όρος επί τοις εκατό της σίγησης του CXCR4 που σχετίζεται με τον αρνητικό έλεγχο των siRNA ήταν 78% για τα Caco-2 κύτταρα, 80% για HT-29 κύτταρα και 84% για τα κύτταρα SW480 όπως προσδιορίζεται με τη μέθοδο Real-Time PCR, 48 ώρες μετά την επιμόλυνση σε επίπεδο mRNA (Σχήμα 4.4A). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η αδρανοποίηση των γονιδίων παρακολούθηθηκε για 72 ώρες μετά την επιμόλυνση με τη τεχνική Western blot (Σχήμα 4.4B). Η εφαρμογή των CXCR4 siRNA δεν είχε καμία επίπτωση στις δυνατότητες της μετανάστευσης των Caco-2 κυττάρων (Σχήμα 4.5A). Σε αντίθεση, η διέγερση της μετανάστευσης από τον CXCL12 των HT-29 και SW480 κυττάρων σημαντικά σταμάτησε και από τα τέσσερα διαφορετικά CXCR4 siRNA σε όλες τις CXCL12 συγκεντρώσεων βάση της έρευνας (Σχήμα 4.5B και 4.5C, αντίστοιχα) ($P < 0,05$). [41]



Σχήμα 4.4: Επίδειξη της σίγησης του CXCR4 όπως καθορίζεται από την ανάλυση του mRNA και των πρωτεϊνών. (A) Ο μέσος όρος επί τοις εκατό της σίγησης του CXCR4 που σχετίζεται με siRNA αρνητικό έλεγχο (NC), όπως καθορίζεται από την ανάλυση του mRNA στα Caco-2,

HT-29 και SW480 κύτταρα. Η έκφραση της πρωτεΐνης του CXCR4 μετά τη σίγηση με το CXCR4 siRNA, όπως καθορίζεται από ανάλυση Western Blot στα Caco-2, HT-29 και SW480 κύτταρα που σχετίζονται με τα μη-επιμολυσμένα συνολικά lysate κύτταρα. Η κυτταρική σειρά HL60 της οξείας λευχαιμίας υπηρέτησε ως θετικό έλεγχο για την ανίχνευση του CXCR4. [41]



Σχήμα 4.5: Η σίγηση του mRNA του υποδοχέα CXCR4 σταματάει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. (A) Το ποσοστό μετανάστευσης κυττάρων Caco-2 που σχετίζονται με ένα θετικό έλεγχο (PC – Positive Control) που περιέχει 20% FCS - ορό εμβρύου μόσχου χωρίς επιμόλυνση και μετά από επιμόλυνση με 4 διαφορετικά CXCR4 siRNA. (B) Το ποσοστό μετανάστευσης HT-29 των κυττάρων που σχετίζονται με θετικό έλεγχο (PC) χωρίς επιμόλυνση και μετά από επιμόλυνση με 4 διαφορετικά CXCR4 siRNA. (C) Το ποσοστό μετανάστευσης κυττάρων SW480 που σχετίζονται με θετικό έλεγχο (PC) χωρίς επιμόλυνση και μετά από επιμόλυνση με 4 διαφορετικά CXCR4 siRNA. [41]

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά αποδεικνύουν ότι ο υποδοχέας CXCR4 είναι ενεργοποιημένος στον καρκίνο του παχέος εντέρου και η διέγερση του CXCR4 φέρνει τα καρκινικά κύτταρα με τον συνδέτη CXCL12 να οδηγεί σε αύξηση της μετανάστευσης, ένα αποτέλεσμα που θα μπορούσε να ανασταλεί τόσο με τα CXCR4 siRNA όσο και με τα αντι-CXCR4 αντισώματα. Είναι ενδιαφέρον, ότι ο υποδοχέας CXCR4 κατά κύριο λόγο εκφράζεται σε κυτταρικές σειρές με μεταστατικό δυναμικό και ως εκ τούτου, αυτές οι κυτταρικές σειρές έδειξαν αυξημένη μετανάστευση μετά από εξωτερική διέγερση του

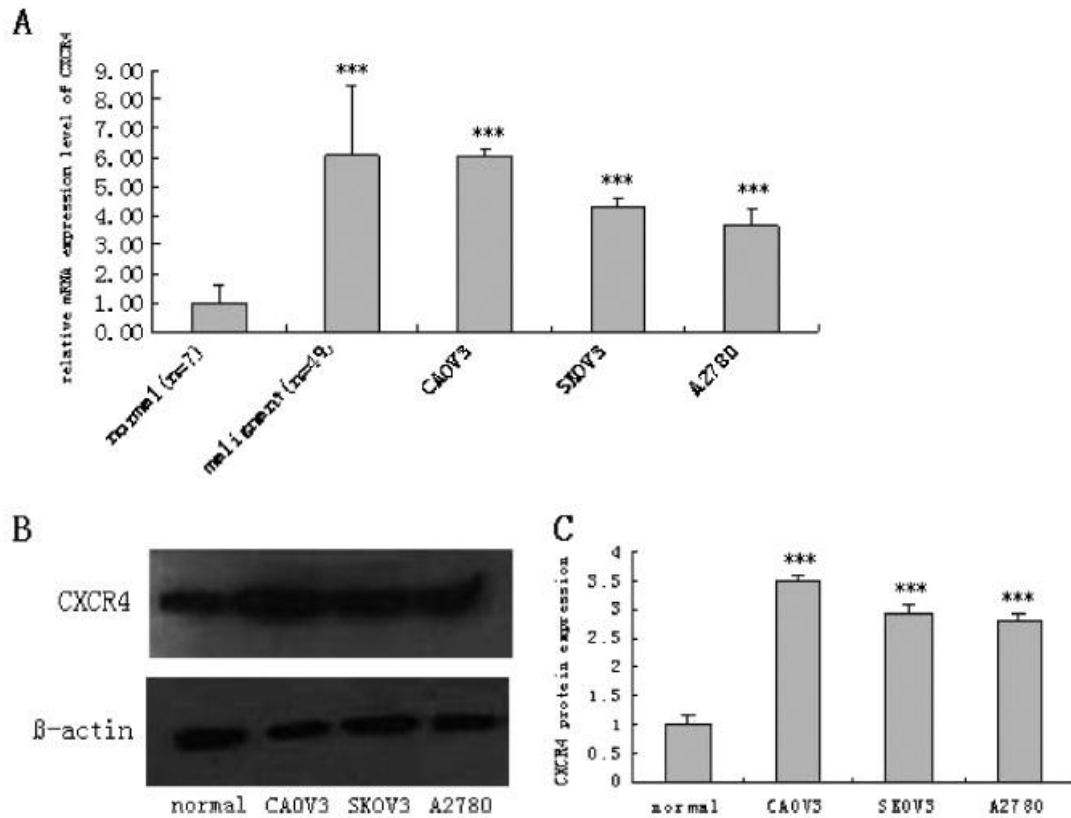
CXCL12. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το μεταναστευτικό δυναμικό των κυττάρων του καρκίνου του παχέος εντέρου μπορεί να σχετίζεται με την παρεκκλίνουσα έκφραση του υποδοχέα CXCR4 και στη συνέχεια η δυνατότητα των κύτταρα να αλληλεπιδράσουν με το CXCL12 μέσω αυτοκρινών ή/και παρακρινών μηχανισμών. [41]

4.3.4 Η σίγηση του CXCR4 στον καρκίνο των ωοθηκών

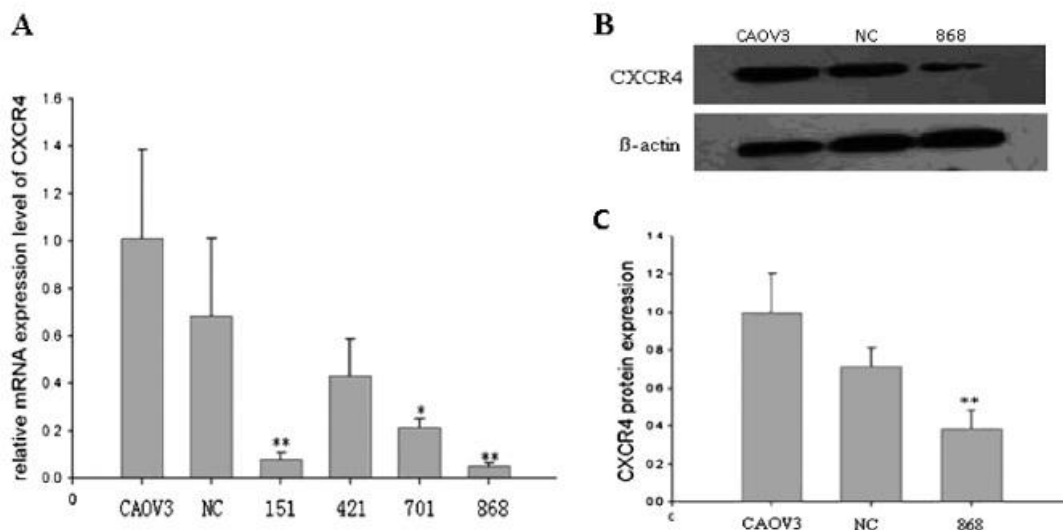
Ο υποδοχέας CXCR4 και ο συνδέτης του CXCL12 διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε μεταστατικές τοποθεσίες στον ανθρώπινο καρκίνο. Στην μελέτη [42] του τμήματος Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Union Hospital, ανιχνεύθηκε η έκφραση υποδοχέα CXCR4 στον καρκίνο των ωοθηκών και η σχέση της έκφρασης του CXCR4 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Επιπλέον, ερευνάται η επίδραση του CXCR4 στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών και παρουσιάζεται ο λειτουργικός ρόλος του CXCR4 στη ρύθμιση του Wnt/β-κατενίνης, με στόχο να προσδιοριστεί ο ρόλος του CXCR4 στην εξέλιξη του καρκίνου των ωοθηκών και να διασαφηνιστεί ο υποκείμενος μηχανισμός. [42]

Στη μελέτη αυτή εντοπίστηκε η έκφραση mRNA του υποδοχέα CXCR4 σε φυσιολογικούς ιστούς των ωοθηκών (n=7), σε ιστούς των καρκίνων των ωοθηκών (n=49) και τρεις κυτταρικές σειρές του καρκίνου των ωοθηκών: A2780, SKOV3, and CAOV3. Η έκφραση mRNA του CXCR4 στους καρκινικούς ιστούς και τα κύτταρα του καρκίνου ήταν υψηλότερη από ότι σε φυσιολογικούς ιστούς των ωοθηκών με την ανάλυση real-time, αντίστροφη μεταγραφική-PCR (P<0,001). Επιπλέον, η έκφραση CXCR4 στα CAOV3 κύτταρα ήταν υψηλότερη μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών του καρκίνου των ωοθηκών που μελετήθηκαν (Σχήμα 4.6A). Ομοίως, η Western blot ανάλυση αποκάλυψε την υπερέκφραση CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών (P<0,001), κυρίως στα κύτταρα CAOV3 (Σχήμα 4.6B, C). Έτσι επιλέχθηκαν τα κύτταρα CAOV3 για περαιτέρω πειράματα. [42]

Χρησιμοποιήθηκαν 4 shRNA (shRNA-151, shRNA-421, shRNA-701, and shRNA-868) εναντίον του υποδοχέα CXCR4 και ένα κωδικοποιημένο (shNC - small hairpin Negative Control) επιμόλυνε τη κυτταρική σειρά CAOV3. Το small hairpin RNA (shRNA) είναι μια ακολουθία του RNA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σίγηση της έκφρασης του ενός γονιδίου μέσω της RNA παρεμβολής. Εξετάστηκε η έκφραση mRNA του CXCR4 48 ώρες μετά την επιμόλυνση. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι η έκφραση mRNA του CXCR4 μειώθηκε κατά 88% (P=0.005), 69% (P=0.019) και 91% (P=0.003) σε κύτταρα επιμολυσμένα με shRNA-151, shRNA-701, και shRNA-868, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα shNC-επιμολυσμένα κύτταρα (Σχήμα 4.7A). Για να αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα της σίγησης του CXCR4 σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε η Western blot ανάλυση για να ανιχνεύσει η έκφραση της πρωτεΐνης CXCR4 72 ώρες μετά την επιμόλυνση. Διαπιστώθηκε ότι το shRNA-868 μείωσε την έκφραση του υποδοχέα CXCR4 κατά 46% σε σύγκριση με το shNC (P = 0,008, Σχήμα 4.7B, C). [42]



Σχήμα 4.6: Έκφραση του CXCR4 σε δείγματα ιστού των ωθηκών και καρκινικών κυττάρων των ωθηκών. Α. Η έκφραση mRNA του CXCR4 σε φυσιολογικούς ιστούς των ωθηκών σε σύγκριση με την έκφραση στους ιστούς του καρκίνου των ωθηκών και των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιώντας real-time PCR ($P < 0,001$). Β. Η Western blot ανάλυση αποκάλυψε την έκφραση της πρωτεΐνης του CXCR4 στους φυσιολογικούς ιστούς των ωθηκών και στις 3 κυτταρικές σειρές του καρκίνου των ωθηκών. Η β -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά ελέγχου. C. Ποσοτική διάγραμμα των αποτελεσμάτων της ανάλυσης Western blot ($P < 0,001$). [42]

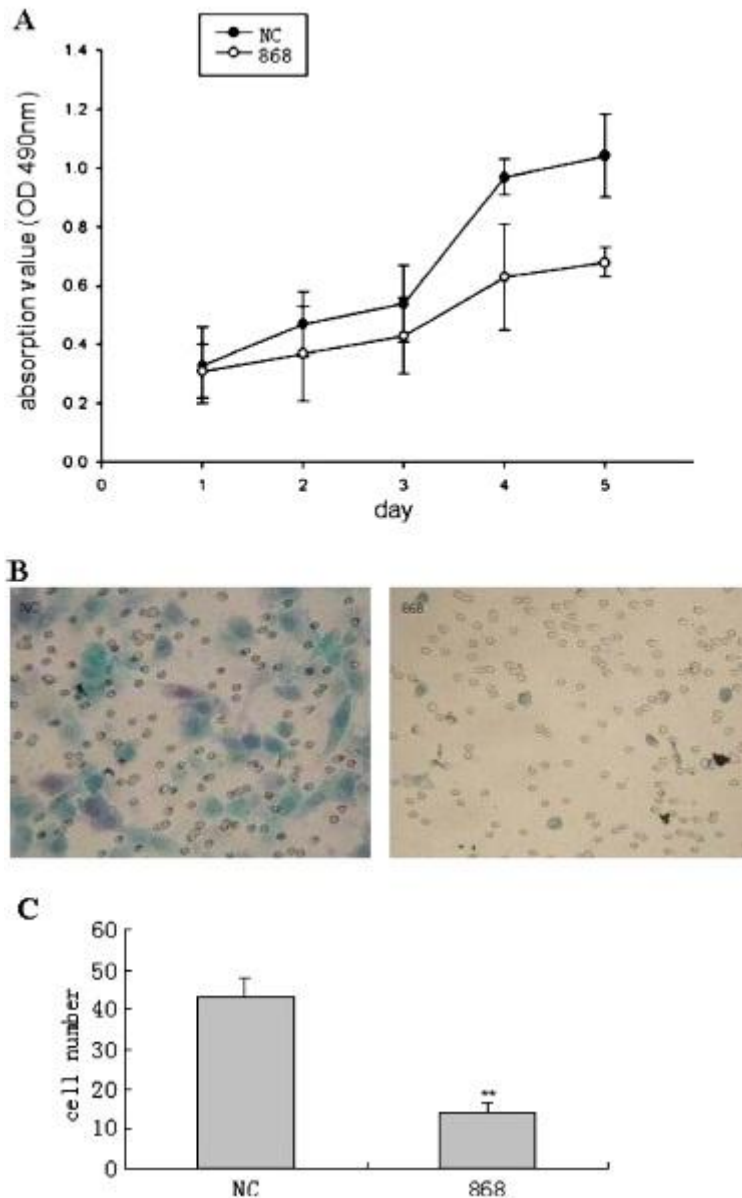


Σχήμα 4.7: έκφραση CXCR4 μετά από επιμόλυνση με shRNA. Α. Η Real-time PCR ανάλυση αποκάλυψε την έκφραση του CXCR4 αναστάλθηκε στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με shRNA-151, shRNA-421, and shRNA-868 ($*P < 0,05$, $**P < 0,01$), σε σύγκριση με τα κύτταρα shNC. Β. Η Western blot έδειξε ότι στο shRNA-868 αναστέλλεται η έκφραση του υποδοχέα CXCR4 σε σύγκριση με τα shNC κύτταρα. Η β -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά ελέγχου. C. Ποσοτική διάγραμμα των αποτελεσμάτων της ανάλυσης Western blot ($**P < 0,01$). [42]

Η επίδραση του CXCR4 στην ανάπτυξη των κυττάρων CAOV3 ελέγχθηκε από την μέθοδο MTT. Συγκεκριμένα η χημική δοκιμή MTT πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 1,2,3,4 και 5 μετά την επιμόλυνση. Η χημική δοκιμή MTT είναι χρωματομετρική δοκιμή για τη μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων που μειώνουν τα MTT σε βαφές φορμαζάνης, δίνοντας ένα πορφυρό χρώμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα shRNA-868-επιμολυσμένα κύτταρα αυξήθηκαν πιο αργά από ότι τα shNC επιμολυσμένα κύτταρα. Η διαφορά ανάπτυξης ήταν σημαντική την τέταρτη ημέρα ($P=0.037$) και τη πέμπτη ημέρα ($P=0.011$) μετά την επιμόλυνση (Σχήμα 4.8A). Η δοκιμή εισβολής σε υπόστρωμα Matrigel (Matrigel invasion assay) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων. Το Matrigel είναι η εμπορική ονομασία για ένα ζελατινώδη μίγμα πρωτεΐνης που εκκρίνεται από τα κύτταρα Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) του σαρκώματος του ποντικιού. Τα αποτελέσματα της χρώσης παρουσιάζονται στο σχήμα 4.8B. Τα κύτταρα shNC εναντίον του CXCR4 οδήγησαν σε μείωση 67,69% του αριθμού των κυττάρων εισβολής ($P=0.001$, Σχήμα 4.8C). [42]

Για να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ της σηματοδότησης του CXCR4 και του μονοπατιού Wnt/ β -κατενίνης, χρησιμοποιήθηκε η real-time PCR για την ανίχνευση της έκφρασης του mRNA του CTNNB1, ενός κρίσιμου γονιδίου του Wnt/ β -κατενίνης για το μονοπάτι κωδικοποίησης της β -κατενίνης: 3 Wnt γονίδια-στόχοι (C-MYC, MMP-9, και CD44) και 2 EMT-σχετιζόμενα γονίδια, (SLUG and vimentin), σε κύτταρα με σίγηση του και σε shNC κύτταρα. Τα δεδομένα έδειξαν ότι η έκφραση των CTNNB1, MMP-9, CD44, C-MYC, SLUG, και vimentin μειώθηκαν κατά 90,5%, 26,1%, 35,4%, 93,5%, 91,5% και 78,3% στα κύτταρα με σίγηση του CXCR4 σε σύγκριση με τα shNC κύτταρα, αντίστοιχα (για όλα $P<0,05$). [42]

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η σίγηση του CXCR4 θα μπορούσε να εμποδίσει το Wnt μονοπάτι του καρκίνου των ωοθηκών και ο υποδοχέας CXCR4 θα μπορούσε να επηρεάσει την εισβολή του καρκίνου. Τα ευρήματα τονίζουν το σημαντικό ρόλο του CXCR4 στην ανάπτυξη του καρκίνου των ωοθηκών και συνεπάγεται ότι ο υποδοχέας CXCR4 θα μπορεί να είναι ένας πιθανός δείκτης μετάστασης του καρκίνου των ωοθηκών και ένας ενδιαφέρον θεραπευτικός στόχος για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών.



Σχήμα 4.8: Η σίγηση του CXCR4 αναστέλλει την ικανότητα διάδοσης και εισβολής των καρκινικών κυττάρων CAOV3 των ωοθηκών. Α. Ο πολλαπλασιασμός κυττάρων μετρήθηκε από τη μέθοδο MTT μετά τη σίγηση του CXCR4. Τα ShRNA-868-επιμολυσμένα κύτταρα αυξήθηκαν σημαντικά πιο αργά από ότι τα shNC-επιμολυσμένα κύτταρα την τέταρτη ημέρα ($P=0.037$) και την πέμπτη ημέρα ($P=0,001$). Β. Η δοκιμή εισβολής σε υπόστρωμα matrigel εκτελέστηκε για να εξετασθή η επίδραση της μείωσης του CXCR4 στην κυτταρική εισβολή (20x): Τα κύτταρα υπέστησαν χρώση μπλε. Γ. Διάγραμμα της ανάλυσης των κυττάρων. Τα αποτελέσματα είναι από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Τα κύτταρα shNC εναντίον του CXCR4 οδήγησαν σε μείωση 67,69% του αριθμού των κυττάρων εισβολής (** $P<0.01$). [42]

4.3.5 Η σίγηση του CXCR4 στον καρκίνο του προστάτη

Η χημειοκίνη SDF-1 και ο υποδοχέας του, CXCR4, έχουν βρεθεί να συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη και εξέλιξη ποικιλίας καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη.

Στη μελέτη [43] διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου OLFM4 μειώνεται σημαντικά στους ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς του προστάτη και στις κυτταρικές σειρές του καρκίνου του προστάτη. Η υπερέκφραση του OLFM4 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό

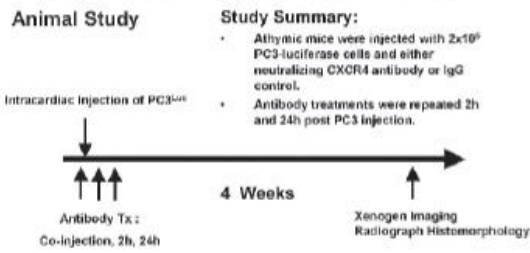
των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του προστάτη, την ανάπτυξη και την εισβολή και ανέστειλε τη μετάσταση του καρκίνου στα κύτταρα των οστών *in vivo*. Ακόμη, μια σειρά από μηχανιστικές μελέτες έδειξαν ότι τα ογκοκατασταλτικά αποτελέσματα των OLFM4 κυττάρων σχετίζονται με τη μείωση του SDF-1 μέσω μιας φυσικής δέσμησης του OLFM4. Έχει εντοπιστεί μια άμεση δέσμηση του OLFM4 και του SDF-1 και συνεντοπισμό τους στον καρκίνο του προστάτη. Διαπίστωσε επίσης ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ OLFM4 και SDF-1 επηρέασε τη SDF-1/CXCR4 σηματοδότηση, με επηρεασμό στην ανάπτυξη των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη και στις μεταστάσεις στα οστά. [43]

Η συμμετοχή του SDF-1/CXCR4 στην εισβολή του καρκίνου του προστάτη και στη μετάσταση στα οστά έχει πρόσφατα τεκμηριωθεί [44,45] και η εξουδετέρωση του CXCR4 με το αντι-CXCR4 αντίσωμα εμποδίζει τη μετάσταση και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων PC3 σε οστικές περιοχές. [46]

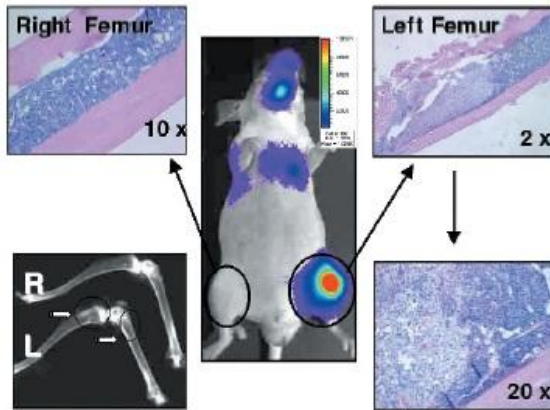
Στη μελέτη [46], για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι το μονοπάτι του SDF-1/CXCR4 είναι κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη οστικών μεταστάσεων, *in vivo*, θα χρησιμοποιηθούν δύο πειραματικές ομάδες (Εικόνα 4.3A). Σε κάθε περίπτωση τα κύτταρα PC3, επισημασμένα με λουσιφεράση, ήταν προ-επωασμένα με το αντίσωμα του CXCR4 ή μη ειδικά αντισώματα της ομάδας ελέγχου στον πάγο πριν από την ενδοκάρδια ένεση. Το αντίσωμα που επιλέχθηκε για τη σίγηση του CXCR4 (MBA171 μονοκλωνικό αντίσωμα, R&D Systems) χρησιμοποιήθηκε 5 $\mu\text{g}/1 \times 10^4$ κύτταρα που χορηγήθηκαν με ένεση. Στη συνέχεια τα ζώα έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά ένεση δύο φορές σε 2 και 24 ώρες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.3A, παρατηρήθηκε ότι όλα τα πειραματόζωα που έλαβαν το αντίσωμα IgG έλεγχο εμφανίστηκαν οστικές μεταστάσεις. Τα αντισώματα του CXCR4 μείωσαν σημαντικά το συνολικό μεταστατικό φορτίο των ζώων σε σύγκριση με τον έλεγχο IgG, ανεξάρτητα από το εάν το ζώο απεικονίζεται από την ραχιαία ή την κοιλιακή επιφάνεια (Εικόνα 4.3C). Η εξέταση των επιμέρους χώρων των οστικών μεταστάσεων έδειξε επίσης ότι η χορήγηση του αντισώματος του CXCR4 μειώνει σημαντικά το συνολικό φορτίο όγκου και περαιτέρω φαίνεται ότι το ζεύγος SDF-1/CXCR4 ρυθμίζει τις οστικές μεταστάσεις συμπεριλαμβανομένων περιοχών του μηριαίου οστού, της κνήμης, της σπονδυλικής στήλης, και της άνω/κάτω γνάθο (Εικόνα 4.3D). Η ακτινολογική ανάλυση επιβεβαίωσε τα συμπεράσματα αυτά, γεγονός που υποδηλώνει ότι το αντίσωμα του CXCR4 είχε σημαντική επίδραση στη μείωση στις οστικές μεταστάσεις. [46]

Τα παραπάνω συμπεράσματα πιθανόν να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη και την πρόληψη των μεταστάσεων.

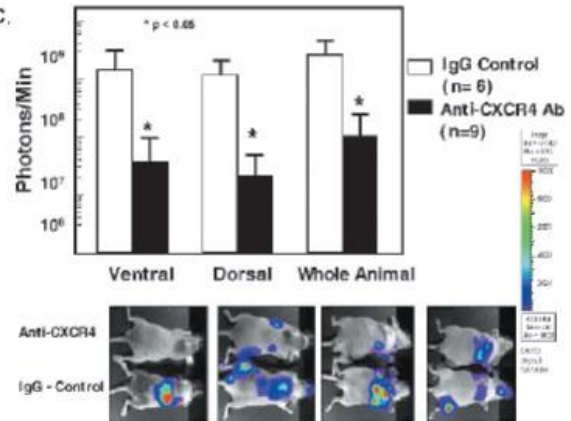
A. *In Vivo* Metastasis Study



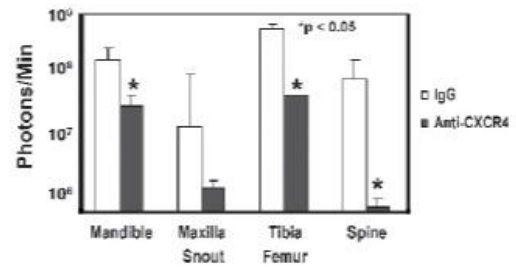
B.



C.



D.



Σίγηση του CXCR4 εμποδίζει τη μετανάστευση στα οστά in vivo. Ενδοκάρδια ένεση των κυττάρων PC3 έγινε στην παρουσία ή η απουσία αντισωμάτων για την εξουδετέρωση του υποδοχέα CXCR4 ή IgG έλεγχο. Θεραπεία με αντισώματα επαναλήφθηκαν 2 και 24 ώρες μετά την ένεση PC3. Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε σε 4 εβδομάδες. (A) Περίγραμμα της μελέτης. (B) Επίδειξη της εγκατάστασης των κυττάρων CaP των μεταστατικών όγκων από το Xenogen IVIS σύστημα με ακτινολογική και ιστολογική επιβεβαίωση του όγκου στον αριστερό μηρό (R: δεξιά, L: αριστερά). (C) Ραχιαία και κοιλιακή επιφάνεια και (D) Τήρηση ποσοτικού χώρου των οστικών όγκων σε βάρος της παρουσίας των αντισωμάτων σε CXCR4 ή τον έλεγχο.

*Σημαντικές διαφορές από τον έλεγχο στο $P < 0,05$. Τα στοιχεία δείχνουν ότι η σίγηση του CXCR4 έχει ως αποτέλεσμα λιγότερο συνολικό βάρος του όγκου και λιγότερες μεταστάσεις.

[46]

Βιβλιογραφία-Πηγές 4^ο Κεφαλαίου

- [1] Lawrence TS, Ten Haken RK, Giaccia A. Principles of Radiation Oncology. In: DeVita VT Jr., Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2008.
- [2] Takimoto CH, Calvo E. "Principles of Oncologic Pharmacotherapy" in Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins WJ (Eds) Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. 11 ed. 2008.
- [3] Amado and Chen, 1999, Lentiviral Vectors—the Promise of Gene Therapy Within Reach? Science. vol. 285 (5428): 674-676
- [4] Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. Nat Rev Genet 2000; 1: 91-99. Spangrude GJ, Smith L, Uchida N et al. Mouse hematopoietic stem cells. Blood 1991; 78: 1395-1402.
- [5] <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
- [6] Persons DA, Tisdale JF. Gene therapy for the hemoglobin disorders. Semin Hematol 2004;41: 279-286.
- [7] Moayeri M, Ramezani A, Morgan RA, Hawley TS, Hawley RG. Sustained phenotypic correction of hemophilia a mice following oncoretroviral-mediated expression of a bioengineered human factor VIII gene in long-term hematopoietic repopulating cells. Mol Ther 2004; 10: 892-902.
- [8] McCormick F. Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? Nat Rev Cancer 2001; 1: 130-141.
- [9] Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. Curr Gene Ther 2003; 3: 13-26.
- [10] Scherr M, Battmer K, Winkler T, Heidenreich O, Ganser A, Eder M. Specific inhibition of bcrabl expression by small interfering RNA. Blood 2003; 101: 1566-1569.
- [11] Ryther RC, Flynt AS, Phillips JA 3rd, Patton JG. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. Gene Therapy 2005; 12: 5-11.
- [12] Citti L, Rainaldi G. Synthetic hammerhead ribozymes as therapeutic tools to control disease genes. Curr Gene Ther 2005; 5: 11-24.
- [13] Lu PY, Xie F, Woodle MC. In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. Adv Genet 2005; 54: 117-42.
- [14] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. Science 2003; 300: 764.
- [15] Porteus MH, Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. Science 2003; 300: 763.
- [16] Urnov FD, Miller JC, Lee YL et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature 2005; 435: 646-651.
- [17] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998;391:806–11.
- [18] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 1999;286:950–2.

- [19] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002;26:199–213.
- [20] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494–8.
- [21] Zhongxing Liang, Younhyoun Yoon, John Votaw, et al. Silencing of CXCR4 Blocks Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res* 2005;65:967-971.
- [22] Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, et al. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett* 2003;550:79–83.
- [23] Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E, Schols D. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett* 2002;527:255–62.
- [24] Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 2006; 20: 1915–1924.
- [25] Tavor S, Eisenbach M, Jacob-Hirsch J, Golan T, Petit I, Benzion K et al. The CXCR4 antagonist AMD3100 impairs survival of human AML cells and induces their differentiation. *Leukemia* 2008; 22: 2151–2158.
- [26] Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, Uy GL, Holt MS, Ritchey JK et al. Chemosensitization of AML following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* 2009; 113: 6206–6214.
- [27] Monaco G, Belmont JW, Konopleva M, Andreeff M, Tavor S, Petit I et al. Correlation between CXCR4 and homing or engraftment of acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004; 64: 6832–6833.
- [28] Bonig H, Chudziak D, Priestley G, Papayannopoulou T. Insights into the biology of mobilized hematopoietic stem/progenitor cells through innovative treatment schedules of the CXCR4 antagonist AMD3100. *Exp Hematol* 2009; 37: 402–415.
- [29] Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006; 107: 1761–1767.
- [30] Chen Y, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. *Cancer Res* 2003; 63: 4801–4804.
- [31] Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, Pelosi E, Pasquini L, Petrucci E et al. A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 788–801.
- [32] I Spinello, MT Quaranta, R Riccioni, V Riti, L Pasquini, A Boe, E Pelosi, A Vitale, R Foa, U Testa and C Labbaye. MicroRNA-146a and AMD3100, two ways to control CXCR4 expression in acute myeloid leukemias. *Blood Cancer Journal* (2011) 1, e26; doi:10.1038/bcj.2011.24;
- [33] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146a, an inhibitor targeted to signalling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 12481–12486.
- [34] Wei L, Kong P-Y, Shi Z-Z, Zeng D-F, Chen X-H, Chang C et al. Effects of anti-CXCR4 monoclonal antibody 12G5 on proliferation and apoptosis of human acute myelocytic leukemia cell line HL-60. *J Med Colleges PLA* 2007; 22: 17–22.

- [35] Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2009; 69: 1279–1283.
- [36] Li Y, VandenBoom II TG, Wang Z, Kong D, Ali S, Philip PA et al. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70: 1486–1495.
- [37] Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, Foshag L, Bilchik AJ, Hoon DS: Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol* 2005, 23:2744-2753.
- [38] Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E: The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 2003, 63:3833-3839.
- [39] Ottaiano A, Franco R, Aiello Talamanca A, Liguori G, Tatangelo F, Delrio P, Nasti G, Barletta E, Facchini G, Daniele B, Di Blasi A, Napoletano M, Ieranó C, Calemma R, Leopardi E, Albino V, De Angelis V, Falanga M, Boccia V, Capuzzo M, Parisi V, Botti G, Castello G, Vincenzo Iaffaioli R, Scala S: Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006, 12:2795-2803.
- [40] Ingold B, Schulz S, Budczies J, Neumann U, Ebert MP, Weichert W, Röcken C: The role of vascular CXCR4 expression in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2009, 55:576-586.
- [41] Claudia Rubie, Vilma O Frick, Pirus Ghadjar, Mathias Wagner, Christoph Justinger, Sabrina K Faust, Benjamin Vicinus, Stefan Gräber, Otto Kollmar, Martin K Schilling. CXC receptor-4 mRNA silencing abrogates CXCL12-induced migration of colorectal cancer cells. *Journal of Translational Medicine* 2011, 9:22
- [42] Jia Wang, Jing Cai, Fang Han, Chun Yang, Qiaolin Tong, Ting Cao, Liying Wu, Zehua Wang. Silencing of CXCR4 Blocks Progression of Ovarian Cancer and Depresses Canonical Wnt Signaling Pathway. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21: 981Y987
- [43] Ling Chen, Hongzhen Li, Wenli Liu, Jianqiong Zhu, Xiongce Zhao, Elizabeth Wright, Liu Cao, Ivan Ding and Griffin P.Rodgers. Olfactomedin 4 suppresses prostate cancer cell growth and metastasis via negative interaction with cathepsin D and SDF-1. *Carcinogenesis* vol.32 no.7 pp.986–994, 2011
- [44] Sun,Y.X. et al. (2003) Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J. Cell. Biochem.*, 89, 462–473.
- [45] Cooper,C.R. et al. (2003) Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer*, 97, 739–747.
- [46] Sun,Y.X. et al. (2005) Skeletal localization and neutralization of the SDF-1 (CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J. Bone Miner. Res.*, 20, 318–329.

Κεφάλαιο 5^ο: Συμπεράσματα και Μελλοντικές Προοπτικές

5.1 Συμπεράσματα

Ο καρκίνος είναι μια από τις σοβαρότερες ασθένειες της εποχής μας, που οφείλεται σε αποτυχίες των μηχανισμών που συνήθως ελέγχουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και δεν προκαλείται από μία μετάλλαξη αλλά από τη συσσώρευση αρκετών γενετικών αλλαγών στα κύτταρα, με τη αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Λόγω των διαφορετικών τύπων καρκίνου, είναι δύσκολη η δημιουργία μίας και μόνο θεραπείας που θα αντιμετωπίζει όλα τα είδη.

Η επιστημονική κοινότητα προσπαθεί με την βοήθεια της βιοπληροφορικής και βιοτεχνολογίας να προσδιορίσει ποια γονίδια εκφράζονται ή έπαυσαν να εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα. Εάν και συγκεκριμένοι υποδοχείς CC και CXCR4 χημειοκινών έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται σε πολλά καρκινικά κύτταρα, ο υποδοχέας χημειοκινών που εντοπίζεται συχνότερα σε κύτταρα των όγκων, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματικούς καρκίνους ποντικών, είναι ο CXCR4, όπως είδαμε. Έτσι, γνωρίζοντας γονίδια που ενεργοποιούνται σε καρκινικά κύτταρα, σχεδιάζονται στοχευόμενες θεραπείες μέσα στο κύτταρο.

Για την αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα CXCR4 σε διάφορα είδη καρκινικών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν αντι-CXCR4 αντισώματα ή CXCR4 ανταγωνιστές, όπως είδαμε, αλλά σε πειραματικό επίπεδο. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι η σίγηση του CXCR4 περιορίζει την ανάπτυξη του όγκου και εμποδίζει τις μεταστάσεις. Γίνεται έτσι φανερό ότι το CXCR4/SDF-1, όπου εκφράζεται σε 23 διαφορετικούς τύπους καρκίνου, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου αλλά κυρίως στη μετάσταση του καρκίνου σε άλλη περιοχή του σώματος.

5.2 Μελλοντικές προοπτικές

Φυσικά, όλα τα παραπάνω είναι ακόμα σε πειραματικό στάδιο και θα χρειαστούν αρκετά χρόνια μέχρι να υπάρξει μια ολοκληρωμένη θεραπεία για κάθε είδος καρκίνου. Σήμερα η θεραπεία του καρκίνου βασίζεται κυρίως στη χημειοθεραπεία, στην ακτινοθεραπεία και στη χειρουργική. Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία επηρεάζουν όχι μόνο τα καρκινικά κύτταρα αλλά και άλλα υγιή κύτταρα του ανθρώπινου σώματος. Το γεγονός αυτό, περιορίζει τις δυνατότητες των εν λόγω θεραπειών που συνοδεύονται από σοβαρές και συχνά επικίνδυνες παρενέργειες.

Η γονιδιακή θεραπεία στοχεύει επιλεκτικά στο να επαναφέρει τη λειτουργία των γονιδίων που εμπλέκονται στην φυσιολογική τους κατάσταση. Φυσικά για να μπορεί να γίνει αυτό, θα πρέπει να αναγνωρισθεί με ακρίβεια το είδος της αλλοίωσης των εμπλεκόμενων γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα.

Αρχικά λοιπόν θα πρέπει να αναγνωρίσουμε τις μεταλλάξεις που έχουν λάβει χώρα στα καρκινικά κύτταρα ενός ασθενή. Σήμερα χάρις στη μοριακή βιολογία, έχουν αναγνωρισθεί σημαντικός αριθμός γονιδιακών μεταλλάξεων που προκαλούν διάφορες μορφές καρκίνων και λευχαιμιών.

Έτσι, λοιπόν, από αρκετές μελέτες έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του υποδοχέα CXCR4 και του συνδέτη του CXCL12/SDF-1 σε καρκινικά κύτταρα διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως παρουσιάστηκαν και στη παρούσα εργασία. Σύμφωνα με τις μελέτες, ο αυξητικός παράγοντας SDF-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην γρήγορη ανάπτυξη του καρκίνου αλλά και στην δημιουργία μεταστάσεων.

Η έρευνα για την θεραπευτική δράση της σίγησης του υποδοχέα CXCR4 για την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι σε πολύ αρχικό στάδιο, σε καθαρά πειραματικό επίπεδο. Όπως παρουσιάστηκε στην εν λόγω εργασία, είδη καρκίνων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα CXCR4, χορηγώντας κατάλληλα αντι-CXCR4 αντισώματα ή CXCR4 ανταγωνιστές, μπορεί να επιβραδυνθεί η ανάπτυξη του όγκου αλλά και να μειωθεί η ανάπτυξη μεταστατικών καρκίνων.

Στο μέλλον, θεωρούμε ότι σε ασθενείς με καρκίνο σε αρχικά στάδια που βρίσκονται θετικοί στην υπερέκφραση του CXCR4, θα χορηγείται κατάλληλη αγωγή για τη σίγηση του υποδοχέα CXCR4, ώστε να περιορίζεται η ανάπτυξη του όγκου αλλά και να καθυστερεί η δημιουργία μεταστάσεων. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούν να ελέγχονται αρκετά επιθετικοί καρκίνοι και θα μπορεί να ακολουθείται, έπειτα, κάποια από τις υπάρχουσες μορφές αντιμετώπισης του καρκίνου, ώστε να εξαλειφεται εντελώς ο καρκινικός όγκος.

Φυσικά, αν γνωρίζουμε τις μεταλλάξεις που οδηγούν στον κάθε καρκίνο, θα μπορούμε, με την βοήθεια της γονιδιακής θεραπείας να δημιουργούμε εξατομικευμένη θεραπεία για κάθε μορφή καρκίνου, προκαλώντας σίγηση ογκογονιδίων, επιδιορθώνοντας γονίδια με μεταλλάξεις ή ενεργοποιώντας ογκοκατασταλτικά γονίδια. Ακόμα, όμως, βρισκόμαστε σε πειραματικό στάδιο και θα χρειαστούν αρκετά χρόνια έρευνας για την υλοποίηση της γονιδιακής θεραπείας στο ευρύ κοινό που νοσεί.

Εν κατακλείδι, η γονιδιακή θεραπεία ίσως να είναι το κλειδί της αντιμετώπισης του καρκίνου και ο αυξητικός παράγοντας SDF-1 με τον υποδοχέα του CXCR4 θα μπορούσε σύντομα να γίνει ένας νέος στόχος για την εξατομικευμένη θεραπεία του καρκίνου.