

ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ

B. Ζουμπουρλής¹

1. Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα.

Η Μοριακή Βιολογία και κατ' επέκταση η Μοριακή Ογκολογία, περιλαμβάνει σήμερα ένα ευρύ φάσμα κλασσικών, αλλά και σύγχρονων τεχνικών, που της παρέχουν την δυνατότητα να ανιχνεύει τις γενετικές αλλοιώσεις των ογκογονιδίων. Πριν αναφερθούν μερικές από αυτές τις τεχνικές, θα γίνει μικρή εισαγωγή για τον ρόλο των ογκογονιδίων στην καρκινογένεση.

Τα πρωτο-ογκογονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική αύξηση και διαφοροποίηση του κυττάρου. Η μετατροπή ενός πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο, δύναται να επέλθει από την επίδραση χημικών ουσιών, υπεριώδους ακτινοβολίας και από την ενσωμάτωση μη ογκογόνων ιών, στο γονιδίωμα του κυττάρου. Επίσης, χρωμοσωμικές μετατοπίσεις ή η επέκταση του πρωτο-ογκογονιδίου, δύναται να το ενεργοποιήσουν. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων, σε συνδιασμό με την απώλεια της λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αποτελούν αιτίες της μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό.

Ο καρκίνος θεωρείται γενετική νόσος και είναι αποτέλεσμα μίας πολυσταδιακής διαδικασίας. Η πολυσταδιακή διαδικασία του καρκίνου γίνεται πλήρως κατανοητή στο πρότυπο μοντέλο καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Ένα σύνολο γενετικών αλλοιώσεων, όπως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο FAP, επιγενετικά φαινόμενα μεθυλίωσης του DNA, μεταλλάξεις στο γονίδιο K-ras καθώς και οι απώλειες των ογκοκατασταλτικών γονιδίων DCC και p53, δρουν συνεργιστικά στην κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων και την μετάσταση του καρκίνου.

Αφετηρία των γνώσεών μας όσον αφορά τα ογκογονίδια, αποτελούν τα πειραματικά αποτελέσματα, τα οποία διευκρίνησαν την καταγωγή των ογκογονιδίων των ρετροϊών το 1976 στα εργαστήρια των Varmus και Bishop (1). Τα πειράματα αυτά αποτέλεσαν την βάση για την ταυτοποίηση βιολογικά ενεργών κυτταρικών ογκογονιδίων.

Ο κ. Σπαντίδος στο εργαστήριο του Siminovitch στο Τορόντο το 1977, ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε χρωμοσώματα κατ' αρχάς και στη συνέχεια DNA από καρκινικά κύτταρα και με μεθόδους γονιδιακής μεταφοράς, μετέφερε σε

φυσιολογικά κύτταρα δέκτες, τους καρκινικούς φαινότυπους (2,3). Τα πειράματα αυτά έδειξαν για πρώτη φορά ότι, στο γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων υπήρχαν "γονίδια του καρκίνου", που σήμερα ονομάζονται ογκογονίδια. Τα αποτελέσματα από την έρευνα αυτή άνοιξαν τον δρόμο για την πρώτη κλωνοποίηση του ογκογονιδίου *H-ras*, από καρκίνο της ουροδόχου κύστεως το 1982 (4).

Σήμερα είναι γνωστός ένας μεγάλος (και συνεχώς αυξανόμενος αριθμός ογκογονιδίων που έχουν ταυτοποιηθεί, ενώ αυξάνεται και ο αριθμός των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων που κλωνοποιούνται.

Τα προϊόντα των ογκογονιδίων εντοπίζονται σε διαφορετικά σημεία του κυττάρου εξ' αιτίας της διαφορετικής λειτουργίας που επιτελούν. Η πρωτεΐνη SIS εντοπίζεται εκτός του κυττάρου. Μερικές ογκοπρωτεΐνες, όπως η *erbB* είναι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων. Άλλες ογκοπρωτεΐνες όπως η RAS, εντοπίζονται στο εσωτερικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης και εμπλέκονται στην μετάδοση σημάτων που δέχεται το κύτταρο μέσω των υποδοχέων του. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στον πυρήνα σχετίζονται με την αντιγραφή και μεταγραφή του DNA (5).

Οι κλασικές μέθοδοι αποτυπώματος (blotting) του Southern", "Northern" και "Western", επιτρέπουν την μελέτη των μεταβολών σε ένα ογκογονίδιο στο επίπεδο του DNA, RNA και της πρωτεΐνης αντιστοίχως.

Η τεχνική του "Southern" είναι από τις πιο γνωστές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας. Τα βασικά στάδια αυτής της τεχνικής, είναι:

1. Διαχωρισμός των θραυσμάτων DNA (μετά από επώαση του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.
2. Επεξεργασία της πηκτής αγαρόζης με στόχο την αποδιάταξη του DNA.
3. Μεταφορά του DNA σε αδρανές υπόστρωμα (μεμβράνη νιτροκυτταρίνης) με την βοήθεια τριχοειδών φαινομένων.
4. Επεξεργασία της μεμβράνης σε υψηλή θερμοκρασία με στόχο την μονιμοποίηση του DNA επάνω στην μεμβράνη.
5. Υβριδισμός του DNA με τον κατάλληλο σημασμένο ιχνηθέτη.
6. Έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ αυτοραδιογραφίας

Το αποτύπωμα που λαμβάνεται επάνω στο φιλμ, προέρχεται από τις συμπληρωματικές αλληλουχίες που αναγνώρισε ο ιχνηθέτης. Οι ίδιες αρχές διέπουν και την τεχνική του Northern, με την διαφορά ότι, στην πηκτή αγαρόζης γίνεται διαχωρισμός μορίων RNA και το πήκτωμα επεξεργάζεται με φορμαλδεΰδη, η οποία εμποδίζει τον σχηματισμό δίκλωνων περιοχών στα μόρια RNA.

Μερικές εφαρμογές της ανάλυσης κατά "Southern" αφορούν την μελέτη των μεταθέσεων ορισμένων ογκογονιδίων. Το ογκογονίδιο *c-myc* βρίσκεται στο

μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 8 και μετατίθεται στο χρωμόσωμα 14 στο σημείο που βρίσκεται το γονίδιο για τις μακρές αλυσούς των ανοσοσφαιρινών, ταυτόχρονα γίνεται μετάθεση ενός μικρού τμήματος του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης στο χρωμόσωμα 8. Η μετάθεση αυτή του ογκογονιδίου *c-myc*, το φέρει κάτω από τον έλεγχο ρυθμιστικών αλληλουχιών των ανοσοσφαιρινών, που μαζί με την απώλεια των δικών του ρυθμιστικών αλληλουχιών συμβάλλουν στην υπερέκφρασή του και την εμφάνιση του λεμφώματος του Burkitt. Ένας άλλος μηχανισμός της αντιμετάθεσης, είναι αυτός της γονιδιακής "σύντηξης" η οποία έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση χιμαιρικής πρωτεΐνης, οι χαρακτήρες της οποίας καθορίζονται και από τα δύο συμμετέχοντα γονιδιακά τμήματα. Η αντιμετάθεση t(9;22) στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, δημιουργεί το σύμπλεγμα των γονιδίων BCR-ABL. Στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, η σύντηξη BCR-ABL οδηγεί συνήθως στην έκκριση πρωτεΐνης MB 210 KD. Εν τούτοις, έχουν αναφερθεί συχνά περιπτώσεις οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας με θετικό χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας, όπου παρατηρείται έκκριση πρωτεΐνης μικρότερου MB (185 KD). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, η συνένωση του ABL γίνεται με διαφορετικού μήκους BCR. Αυτές οι διαφορές ανιχνεύονται εύκολα με τις τεχνικές του Southern και του Western.

Οι αρχές του Western είναι παρόμοιες μ' αυτές του Southern και του Northern, με τις εξής διαφορές:

1. Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, κάθετα αντί οριζόντια.
2. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης γίνεται με ανοσοϊστοχημική μεθοδολογία. Στο αδρανές υπόστρωμα όπου μεταφέρθηκαν οι πρωτεΐνες με την βοήθεια του βιτυνιλιωμένου αντισώματος, της αβιδίνης και της υπεροξειδάσης και παρουσία του χρωμογόνου υποστρώματος, γίνεται η ανίχνευση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης.

Οι γενετικές αλλοιώσεις των ογκογονιδίων και των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων μπορούν να μελετηθούν σε επίπεδο πρωτεΐνης με απλές ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Η μέθοδος ABC χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των ογκο-πρωτεϊνών των γονιδίων *H-ras*, *c-myc*, *erbB-2*, *p53* καθώς και άλλων. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την πρόσδεση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης, το οποίο αποτελεί και το πρωτεύον αντίσωμα. Στη συνέχεια, το αντι-αντίσωμα το οποίο είναι βιτυνιλιωμένο προσδένεται στο πρωτεύον αντίσωμα. Για να γίνει ορατή η πρωτεΐνη, χρησιμοποιείται το σύστημα αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης. Η αβιδίνη είναι μία βασική γλυκοπρωτεΐνη, ένα τετραμερές, το οποίο σε κάθε

υπομονάδα του φέρει μία θέση πρόσδεσης της βιοτίνης. Η τεχνική ABC έχει μεγάλη ευαισθησία που οφείλεται στις συνδέσεις μεταξύ δευτερογενούς αντισώματος-βιοτίνης-αβιδίνης και υπεροξειδάσης, που συμβάλλουν στην δημιουργία ενός πολυμοριακού δικτύου με μεγάλο αριθμό μορίων υπεροξειδάσης. Το ένζυμο υπεροξειδάση, όπως και στην περίπτωση του Western, ανιχνεύεται με υπόστρωμα χρωμογόνου και συγκεκριμένα της DAP ή της τετραϋδροχλωρικής - 3,3' -διαμινοβενζιδίνης.

Το ογκο-κατασταλτικό γονίδιο p53, είναι το περισσότερο συχνά επιρρεαζόμενο γονίδιο στον καρκίνο του ανθρώπου. Ενέχεται σε περισσότερους από 50 διαφορετικούς τύπους καρκίνων. Η σημαντικότερη λειτουργία αυτού του γονιδίου, είναι της ρύθμισης της κυτταρικής αύξησης. Το γονίδιο ελέγχει μία πρωτεΐνη 393 αμινοξέων. Στις συντηρητικές περιοχές της πρωτεΐνης παρουσιάζεται ένα ευρύ φάσμα μεταλλάξεων με μεγαλύτερη συχνότητα στα κωδικόνια 175, 245, 248, 249, 273, 282. Η ανάπτυξη της SSCP ανάλυσης τα τελευταία 4 χρόνια, δηλ. της μελέτης της πολυμορφικής διαμόρφωσης της μονόκλωνης αλυσίδας του DNA επιτρέπει την μελέτη μεταλλάξεων ευρέος φάσματος όπως είναι του γονιδίου p53. Η τεχνική διακρίνεται στα εξής στάδια:

1. Ενίσχυση της εξεταζόμενης περιοχής του DNA με την βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR).
2. Αποδιάταξη του προϊόντος με την βοήθεια υψηλής θερμοκρασίας (95° C) και φορμαμυδίου.
3. Απότομη ψύξη του DNA προϊόντος (-20° C), και διαμόρφωση της στερεοδομής της μονόκλωνης αλυσίδας του DNA.
4. Ηλεκτροφόρηση των μονόκλωνων αλύσεων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Το διαφορετικό προφίλ κινητικότητας στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταξύ ενός φυσιολογικού DNA σε σχέση με ένα καρκινικό μας πληροφορεί για την ύπαρξη μεταλλάξεων .

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι: α) Σε ελάχιστο χρόνο μπορεί να μελετηθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων, β) επιτρέπει την μελέτη γονιδίων με ευρύ φάσμα μεταλλάξεων, όπως του p53 (6).

Οι δυνατότητες κλωνοποίησης των ογκογονιδίων καθώς και των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων, η διερεύνηση των γνώσεων όσον αφορά την λειτουργία τους, μαζί με την ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού μεθόδων γονιδιακής μεταφοράς, πυροδότησαν την ταχεία εξέλιξη κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο του ανθρώπου.

Το 1990 έγινε η πρώτη προσπάθεια γονιδιακής θεραπείας στον άνθρωπο. Στα τέλη του 1993, περίπου 30 κλινικές δοκιμές εφαρμόζονται για τον καρκίνο του ανθρώπου, πολύ περισσότερες σε σχέση με άλλες γενετικές νόσους.

Αυτό είναι επόμενο καθώς ο *ex vivo* χειρισμός των καρκινικών κυττάρων είναι πολύ εύκολος σε σχέση με τα κύτταρα άλλων γενετικών νοσημάτων (7).

Οι ρετροϊοί αποτελούν σήμερα τα καλύτερα οχήματα μεταφοράς γονιδίων για την επιμόλυνση των καρκινικών κυττάρων στόχων. Ο ρετροϊός, μετά την σύντηξη του με την κυτταρική μεμβράνη και την απελευθέρωση της γενετικής του πληροφορίας στο κυτταρόπλασμα, αντιγράφει το RNA σε DNA, το οποίο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου. Από αυτή την θέση, ένα ιϊκό όχημα το οποίο φέρει το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης θα βοηθήσει στην έκφρασή του. Το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει το φάρμακο γουανικλοβίρ (GCV) σε τριφωσφορική μορφή, υπό την οποία αναστέλλει την δράση της DNA πολυμεράσης, με άμεση συνέπεια τον θάνατο του καρκινικού κυττάρου (7).

Μία πρακτική εφαρμογή των δεδομένων αυτών υπάρχει στην γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου του εγκεφάλου. Τα καρκινικά κύτταρα του εγκεφάλου μετά τον εντοπισμό του όγκου με μαγνητική τομογραφία, αφαιρούνται και επιμολύνονται με το ιϊκό όχημα που φέρει το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης. Ταυτόχρονα, στον ασθενή χορηγείται για δύο εβδομάδες και δύο φορές ημερησίως, ενδοφλέβια το φάρμακο GCV. Στην συνέχεια, τα καρκινικά κύτταρα επανεμφυτεύονται στον εγκέφαλο και το εκφρασμένο γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης μετατρέπει το GCV στην τριφωσφορική του μορφή με αποτέλεσμα την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι, η τριφωσφορική μορφή του GCV μπορεί να συμβάλλει λόγω διάχυσης και στην καταστροφή των κυττάρων τα οποία, είτε δεν επιμολύνθηκαν από το ιϊκό όχημα, είτε δεν εκφράζουν το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης. Παρόμοιες τεχνικές εφαρμόζονται για την θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, του μελανώματος κ.λ.π. (7).

Οι δυνητικές στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο του ανθρώπου είναι:

1. Ενίσχυση της ανοσογονικότητας των καρκινικών κυττάρων, με την εισαγωγή γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για ξένα αντιγόνα.
2. Ενίσχυση της δράσης των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος με την εισαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν κυτοκίνες και αυξάνουν την αντικαρκινική ενεργότητά τους.
3. Ενσωμάτωση ενός γονιδίου "ευπάθειας" ή "αυτοκτονίας" στα καρκινικά κύτταρα, π.χ με την εισαγωγή του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης.
4. Παρεμπόδιση της έκφρασης ενός ογκογονιδίου όπως για παράδειγμα του *K-ras* με την εισαγωγή αντιθέτου πολικότητας *K-ras* μηνύματος.

5. Ενσωμάτωση του φυσιολογικού ογκο-κατασταλτικού γονιδίου p53 στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα και στον καρκίνο του Wilm's.
6. Προστασία των βλαστικών κυττάρων από τα τοξικά αποτελέσματα της χημειοθεραπείας με την εισαγωγή του γονιδίου MDR-1, το οποίο καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά έναντι των χημειοθεραπευτικών.
7. Θανάτωση των καρκινικών κυττάρων με την εισαγωγή των γονιδίων των τοξινών κάτω από τον έλεγχο ειδικών υποκινητών. Τέτοιο γονίδιο είναι για παράδειγμα της διφθερίτιδας.

Η τεχνολογία του ανασυνδιασμένου DNA, η μοριακή κλωνοποίηση και οι τεχνικές υβριδισμού, επέτρεψαν την μελέτη της δομής και λειτουργίας πολλών γονιδίων. Η τεχνική επέκτασης του DNA, γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR), η ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων, η παραγωγή διαγονιδιακών ζώων, καθώς και η εξελισσόμενη τεχνογνωσία της γονιδιακής θεραπείας, είναι μηνύματα αισιοδοξίας για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Επιπλέον, η ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος θα είναι ένα σημαντικό επιστημονικό επίτευγμα και θα αποτελεί το θεμέλιο της παρεμβατικής εισαγωγής γονιδίων στην θεραπευτική αντιμετώπιση των παθήσεων που έχουν γενετική βάση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM and Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-173, 1976.
2. Spandidos DA and Siminovitch L. Transfer of anchorage independence by isolated metaphase chromosomes in hamster cells. *Cell* 12, 675-682, 1977.
3. Spandidos DA and Siminovitch L. Transfer of the marker for the morphologically transformed phenotype by isolated chromosomes in hamster cells. *Nature*, 271: 259-261, 1978.
4. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S and Barbacid M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298, 343-347, 1982.
5. Spandidos DA and Anderson MLM. Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer. *J.Pathol.* 157, 1-10, 1989.
6. Field JK, Zoumpourlis V, Spandidos DA and Johns AS. p53 expression and mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck: Correlates with the patients use of tobacco and alcohol. *Cancer Det. and Prev.*, 18, 197-208, 1994.
7. Kenneth W. Culver and Blaese R.M. Gene therapy for cancer. *TIG* 10, 174-178, 1994.