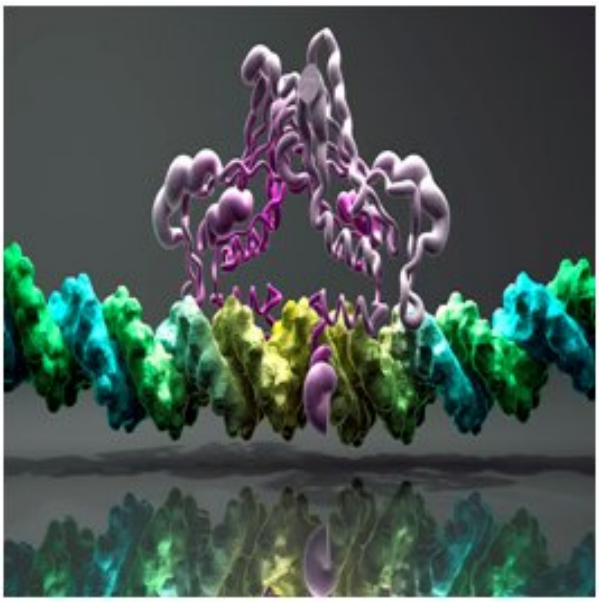
Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Udział czynnika transkrypcyjnego gli 1 w powstawaniu chorób nowotworowych



Wstęp

Promotory genów eukariotycznych są krótkimi odcinkami DNA, zwykle położonymi powyżej sekwencji kodującej gen, rozpoznawanymi przez czynniki transkrypcyjne. Czynniki te wiążą się z nicią DNA i umożliwiają przyłączenie się do niej polimerazy RNA. Skutkuje to rozpoczęciem procesu transkrypcji, który polega na przepisaniu informacji genetycznej z DNA na RNA. Promotory genów eukariotycznych są rozpoznawane przez różne białka, które regulują intensywność transkrypcji. Geny, których promotory mają kilka sekwencji przyłączających są transkrybowane najszybciej [1].

Czynniki transkrypcyjne są białkami wiążącymi się z DNA w obrębie promotora lub sekwencji wzmacniającej. Posiadają one domenę wiążącą DNA (ang. DNA-binding domain - DBD) i domenę efektorową (ang. Effector domain - ED), która pośredniczy w aktywacji bądź represji ekspresji docelowych genów. Czynniki transkrypcyjne występują w komórce w niewielkiej liczbie (103-105 cząsteczek/komórkę), mogą być selektywnie aktywowane lub dezaktywowane przez inne białka, najczęściej na ostatnim etapie przekazywania sygnału w komórce [1].

Zdecydowaną większość onkogenów (geny nowotworów) zidentyfikowano jako promotorowo-specyficzne czynniki transkrypcyjne. Podniesienie ich aktywności do nadmiernie wysokiego poziomu może prowadzić do nowotworzenia. Onkogeny regulują działanie kompleksu transkrypcyjnego, obejmującego polimerazę RNA II i czynniki inicjacji transkrypcji TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIH, TFIIE, TFIIF. Ponadto kontrolują one przejście pomiędzy nieaktywną/aktywną chromatyną, stabilizują kompleks transkrypcyjny połączony z promotorem, przyłączają inne czynniki do kompleksu oraz pośredniczą w przejściu od inicjacji do elongacji transkrypcji. Zaburzenia ekspresji wielu genów kodujących czynniki transkrypcyjne oraz aktywności ich produktów mogą prowadzić do nieprawidłowej aktywacji szlaków biochemicznych oraz rozwoju nowotworu. Jednymi z takich czynników są geny Gli (ang. glioma-associated oncogenes). Wzrost ekspresji Gli1 prowadzi do zmiany ekspresji określonych genów w procesie nowotworzenia [1].

Czynniki transkrypcyjne z motywem palców cynkowych

Czynniki transkrypcyjne można zaliczyć do dwóch kategorii: czynników inicjujących i efektorowych. Czynniki inicjujące mogą wiązać się z sekwencjami docelowymi w obrębie nukleosomów i rozpoczynać procesy zmiany struktury chromatyny oraz transaktywacji. Natomiast czynniki

efektorowe posiadają dostęp do sekwencji docelowej w chromatynie zależny od czynników inicjujących i struktury nukleosomalnej. Czynniki transkrypcyjne mogą zawierać różne motywy białkowe takie jak: helisa-skręt-helisa (HTH), helisa-pętla-helisa (HLH), zamek leucynowy czy palce cynkowe. Motyw białkowy HTH wiąże się do głównego rowka DNA, HLH odpowiada za dimeryzację, zamek leucynowy wiąże między sobą czynniki transkrypcyjne, natomiast palce cynkowe stanowią strukturalną płaszczyznę dla procesów wiązania DNA. Na podstawie klasyfikacji motywów strukturalnych stanowiących domeny wiążące DNA wyodrębnia się podtypy czynników transkrypcyjnych. GLI1 (ang. glioma-associated oncogene 1) należy do czynników transkrypcyjnych z motywem palców cynkowych [1]. Domeny palców cynkowych po raz pierwszy zidentyfikowano w genie TFIIIA (ang. transcription factor IIIA), kodującym czynnik transkrypcyjny żaby szponiastej (Xenopus laevis). TFIIIA reguluje ekspresję genów rybosomalnych RNA. Dotychczas odkryto istnienie dziesięciu różnych klas motywów palców cynkowych. Najlepiej poznaną klasą jest C2H2 (TFIIIA/Kruppel). Ludzki genom posiada ponad 900 genów kodujących czynniki z motywem palców cynkowych [1].

Domena palca cynkowego występuje w białkach wiążących DNA i bierze bezpośredni udział w wiązaniu cząsteczki kwasu nukleinowego przez białko. Domena ta jest zachowawczym regionem białka, posiadającym zwięzłą strukturę globularną, w której dwie cysteiny i dwie histydyny wiążą jon cynku (Zn+2) tetraedrycznym wiązaniem koordynacyjnym. Obecność jonu cynku (Zn+2) jest kluczowa dla stabilności domeny. W przypadku jego braku nie dochodzi do powstania wystarczająco dużej domeny posiadającej hydrofobowy rdzeń oraz utraty funkcjonalności. Dwudodatni jon cynku łatwo oddziałuje z DNA ze względu na ujemny ładunek reszt fosforanowych kwasów nukleinowych. W domenie palca cynkowego możemy wyróżnić helisę α, która przechodzi w helisę 310 oraz dwa antyrównoległe fragmenty posiadające strukturę łańcucha β, które tworzą strukturę typu „spinka do włosów”. Prawdopodobnie do wiązania DNA konieczna jest duża liczba zasadowych oraz polarnych aminokwasów, natomiast dla stabilności cząsteczki istotna jest obecność aminokwasów aromatycznych [2].

Aminokwasy w motywie palca cynkowego występują w charakterystycznej sekwencji. Palce cynkowe są połączone łącznikiem, który jest niezbędny do właściwego oddziaływania z DNA. Sekwencja łącznika ulega fosforylacji i doprowadza do inaktywacji białka. Taki motyw dość często występuje w zgrupowaniu palców cynkowych położonych jeden za drugim tak, że helisa α każdego motywu ma styczność z dużą bruzdą DNA. Układ złożony z wielu palców cynkowych łatwo rozpoznaje odpowiednie sekwencje DNA [2].

Motywy palców cynkowych oddziałują także z innymi białkami wpływającymi na zmianę specyficzności wiązania do DNA. Motywy C2H2mają możliwość oddziaływania z RNA, hybrydami DNA-RNA i innymi makrocząsteczkami. Niektóre białka z domeną palca cynkowego oddziałują z hybrydami DNA-RNA, gdy powinowactwo wiązania jest porównywalne bądź większe aniżeli w przypadku wiązania z DNA [2].

Charakterystyka molekularna genu Gli1

Po raz pierwszy gen Gli1 (ang. glioma-associated oncogene 1 - LOC2735) scharakteryzowano w 1987 roku. Wzrost liczby kopii tego genu zaobserwowano w wielopostaciowym glejaku zarodkowym (ang. glioblastoma multiforme - GBM) [3].

Gli1 położony jest na chromosomie 12 (12ql3.2-ql3.3) i ma długość 12,12 kpz. Wskutek alternatywnego splicingu RNA powstają trzy transkrypty, które kodują białkowe izoformy. Produktem genu Gli1 jest białko o długości 1106 aminokwasów i masie 117,9 kDa. Białko to zawiera pięć motywów palców cynkowych między aminokwasami 235-393, które są kodowane przez egzony 7-10 (fragmenty kodujące DNA), a także domenę efektorową składającą się z aminokwasów

1020-1091, kodowaną przez egzon 12. Białko rozmieszczone jest w jądrze komórkowym i w cytoplazmie [3].

Wykazano, że w glejaku zarodkowym, kostniakomięsaku, tłuszczakomięsaku oraz potworniakoraku występuje wzrost liczby kopii genu Gli1. Locus Gli1 (obszar chromosomu zajmowany przez gen) ulega translokacji w przypadku perycytomy, macicznego mięśniaka gładkiego, wielopostaciowego gruczolaka gruczołu ślinowego, tłuszczaka a także śluzopodobnego tłuszczakomięsaka. Natomiast w przypadku mięśniaka, raka piersi, cewiaka nerwowego, raka podstawnokomórkowego Gli1 ulega wysokiej ekspresji [4].

Funkcje GLI1

Dotychczas poznano niewielką ilość genów, których transkrypcja zależy od GLI. W badaniach wykorzystujących mikromacierze wykazano, że GLI1 przyczynia się do występowania zaburzeń ekspresji 30 genów, około 11 z nich ulega wysokiej ekspresji. Należą do nich geny cyklu komórkowego, adhezji komórkowej, transdukcji sygnału a także regulujące apoptozę. Wpływ na ekspresję genów kontrolowanych przez czynniki transkrypcyjne GLI w ludzkich keratynocytach posiada receptor czynnika wzrostu epidermy (ang. epidermal growth factor receptor - EGFR). Poznano 19 genów, których transkrypcja jest indukowana GLI1, czynnikiem EGF i 11 innymi genami, gdzie tylko od GLI1 zależeć będzie ich transkrypcja. Wykazano, że GLI1 i EGF wspólnie regulują ekspresje 200 do 300 genów [5].

Aktualnie poznano siedem miejsc wiązania się GLI z promotorem genu bcl-2 (ang. B-cell leukemia / lymphoma-2), jedno z nich (pozycje -428 do -420) jest istotne dla regulacji transkrypcji. W epidermalnych keratynocytach zrównoważenie między funkcją aktywatora GLI1 oraz represora GLI3 kontroluje poziom ekspresji bcl-2 [6]. Pośród genów docelowych dla GLI1 znajduje się HIP (ang. hedgehog interacting protein), którego produkt ma możliwość wiązania wszystkich trzech białek hedgehog (SHH, DHH, IHH). GLI1 doprowadza do wzrostu ekspresji genu Foxm1 (ang. forkheadbox), którego produkt spełnia ważną rolę w regulacji ekspresji genów biorących udział we wzroście komórki, proliferacji, różnicowaniu, długowieczności komórek, a także transformacji [7].

Analiza nowotworów kości i tkanek miękkich wykazała ścisły związek pomiędzy poziomem ekspresji GLI1, a stopniem złośliwości nowotworu. Zwiększenie liczby kopi genu Gli1 w niektórych nowotworach i specyficzny obraz ekspresji sugerują, że GLI1 bierze udział w powstawaniu, jak i w normalnym rozwoju nowotworów [4].

Czynniki transkrypcyjne GLI (GLI1, GLI2, GLI3) pełnią istotną rolę w szlaku sygnalizacyjnym hedgehog-GLI (HH-GLI), ważnym w początkowych etapach organogenezy w centralnym systemie nerwowym, płucach, kościach, prostacie, kończynach, mięśniach, zębach oraz włosach. Przede wszystkim kontrolują one proliferację prekursorów komórek nerwowych w strukturach grzbietowych mózgu oraz regulują liczbę neuronalnych komórek pnia w embrionalnych, okołonarodzeniowych i dojrzałych segmentach mózgu [8].

Po raz pierwszy geny hedgehog (Hh) zostały odkryte u Drosophila melanogaster. Pełnią one istotną rolę w rozwoju embrionalnym. Do rodziny genów Hh u ssaków należą: indian hedgehog (Ihh), desert hedgehog (Dhh) oraz sonic hedgehog (Shh). Biorą one udział w tym samym szlaku sygnalizacyjnym, lecz w różnych narządach. Ihh działa jako mitogen w chondrocytach, Dhh jest niezbędny do prawidłowego rozwoju obwodowego systemu nerwowego. Natomiast Shh uczestniczy w rozwoju endodermy, ektodermy i mezodermy. Ulega on ekspresji w wielu organach, takich jak mózg, skóra, prostata, płuca, szkielet, przewód pokarmowy, w których odpowiada za ich kształtowanie oraz wzrost [9].

Model sygnalizacji szlaku SHH u ssaków jest oparty na wynikach badań genetycznych i biochemicznych nad Drosophila. Zmodyfikowany HH może zostać związany przez receptor PTCH1 bądź PTCH2, który położony jest na powierzchni komórki docelowej albo uwalniającej sygnał. Związanie liganda prowadzi do endocytozy oraz transdukcji sygnału do wnętrza komórki, co skutkuje aktywacją czynników transkrypcyjnych GLI. PTCH1 reguluje własną ekspresję na zasadzie sprzężenia zwrotnego, co umożliwia zachowanie prawidłowego rozwoju równowagi między aktywnością SHH oraz PTCH1 [10].

W przypadku braku SHH, PTCH1 blokuje aktywność cząsteczki efektorowej SMO i uniemożliwia transdukcję sygnału. SMO jest białkiem transbłonowym, strukturalnie podobnym do receptorów łączących się z białkiem G. Prawdopodobnie w przypadku braku liganda, PTCH1 przemieszcza przez błonę małe cząsteczki, które przypominają cholesterol i działają jak antagoniści SMO. Natomiast w przypadku obecności SHH, PTCH1 działa przez zwolnienie inhibicji SMO oraz poprzez zmniejszenie zasięgu sygnalizacji liganda. Regulowanie wiązania SHH z PTCH następuje w docelowej komórce przez co najmniej trzy odmienne, negatywne regulatory: proteoglikan HSPG (ang. heparyn sulphateproteoglican), białko HIP (ang. hedgehoginteracting protein) i megalinę (gp300). Wolny ligand może być wiązany przez wszystkie regulatory, co nie daje możliwość oddziaływania z receptorami PTCH [11].

Cytoplazmatyczne formy GLI (GLI2 bądź GLI3) przy braku SHH, ulegają fosforylacji katalizowanej przez PKA (ang. protein kinase A), kinazę kazeinową 1 (ang. casein kinase 1 – CK1), a także GSK3 (ang. glycogen synthase kinase 3). Umożliwia to angażowanie dodatkowych czynników, które prowadzą do ubikwitynacji oraz proteolizy GLI do form represorowych. Represor ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie hamuje ekspresję genów [11].

W obecności białka DISP (dispatched) następuje uwolnienie SHH z powierzchni błony komórki sygnalizacyjnej. Struktura DISP jest podobna do PTCH i może działać w podobny sposób jak przenośnik małych cząsteczek. Związanie SHH przez PTCH1 powoduje aktywacje SMO i transdukcje sygnału. PTCH1 ulega internalizacji do komórki i jest degradowany [11].

SMO oddziałuje z wielobiałkowym kompleksem związanym w cytoplazmie przez mikrotubule. W skład tego kompleksu wchodzi białko regulatorowe SUFU (ang. suppressor of fused), białko pokrewne dynaminie COS2 (ang. costal-2), serynowo - treoninowa kinaza białkowa FU (ang. fused) oraz cytoplazmatyczna forma członka rodziny GLI. Aktywność transkrypcji kierowanej przez GLI zwiększa się przez białko MIM (ang. missing in methastasis) oddziałujące z GLI oraz SUFU [11].

W obecności SHH kompleks zawierający GLI odłącza się od mikrotubul. Fosfataza PP2A katalizuje usunięcie reszty fosforanowej z białka. W efekcie zahamowana zostaje proteoliza GLI, a formy aktywatorowe indukują ekspresję genów w jądrze. Regulowanie aktywności GLI1 następuje przez ruch wahadłowy pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Negatywnym regulatorem GLI1 jest SUFU. Posiada on możliwość zatrzymania białka w cytoplazmie oraz bezpośredniego oddziaływania z GLI1 związanym z DNA [11].

W procesach nowotworzenia, gdzie podtrzymana sygnalizacja umożliwia wzrost i przeżycie guza, zasadniczą rolę odgrywają zaburzenia funkcjonowania szlaku HH-GLI. Dość duża grupa śmiertelnych nowotworów ma związek z nadmierną aktywacją szlaku HH-GLI. Spowodowane jest to mutacją jego komponentów sygnalizacyjnych bądź też zwiększoną odpowiedzią komórek na HH. Uwalniane w zwiększonej ilości z komórek rakowych ligandy HH, mogą bezpośrednio pobudzać wzrost innych nowotworów [12].

Utrata funkcji genu Ptch1 prowadzi do aktywacji GLI1. Zaobserwowano, że u rozwijających się kijanek GLI1 indukował nowotwory centralnego systemu nerwowego oraz skóry. Przypadek ten

świadczy o tym, że aktywacja szlaku HH-GLI jest niezbędna do inicjacji i rozwoju nowotworu. Szlak SHH-GLI prowadzi do wzmożenia proliferacji poprzez aktywację szlaku ERK (ang. extracellular regulated kinase) oraz do zwiększenia ekspresji cyklin fazy S. W przypadku cewiaka nerwowego, wykryto mutacje w innych komponentach szlaku. Dzieci chorujące na ten nowotwór posiadają mutację w genie SUFU. Produktem tego genu są zmutowane białka, nie mające zdolności do transportu GLI1 z jądra komórkowego do cytoplazmy, co przyczynia się do trwałej aktywacji szlaku SHH-GLI [8]. Na szlak HH-GLI mają wpływ szlaki sygnalizacyjne EGF (ang. epidermal growth factor) i IGF (ang. insuline-like growth factor). Białka RAS, AKT i MAP regulują aktywność GLI [7].

Inhibicję szlaku sygnałowego SHH-GLI mogą powodować antagoniści poprzez blokowanie szlaku na różnych etapach. Cyklopamina jest roślinnym alkaloidem (3β-hydroksysteroidem), specyficznie hamującym szlak SHH-GLI. Wykazano, że cyklopamina jak i inhibitor HhAntag hamują wzrost cewiaka nerwowego i glejaka. Zastosowanie inhibitora HhAntag prowadziło do zredukowania ekspresji kilku genów, zahamowania proliferacji, aktywacji procesów apoptotycznych, a w większych dawkach do zupełnego ustąpienia nowotworu [8]

Transkrypcji Gli1 i Ptch1 może zapobiegać podwyższony poziom PTCH1. PTCH 1 może bezpośrednio hamować działanie GLI bez udziału kaskady szlaku SHH-GLI. Znaleziono dwie sekwencje sygnalne niezbędne do destrukcji: GLI1 i DN (aminokwasy 51-116 przy końcu aminowym), a także Dc (aminokwasy DSGVEM przy końcu karboksylowym). Usunięcie tych sygnałów wpływa na stabilizację białka oraz przyspiesza rozwój nowotworu u transgenicznych myszy [10].

GLI2 wiąże się w obszarze promotora Gli1 i indukuje jego ekspresję w ludzkich keratynocytach. Estry forbolu przy udziale kinazy białkowej C-δ i białka MEK-1 stymulują aktywność białek GLI, jak również indukują ekspresję Gli1 orazPtch1 w linii komórkowej [12]. Na obraz ekspresji genów zależnych od białek GLI ma wpływ aktywność sygnalizacyjna EGFR (ang. epidermal growth factor receptor). Prawdopodobnie przyczynia się do tego bezpośrednia modyfikacja aktywatorów GLI czy regulacja aktywności innych czynników transkrypcyjnych bądź kofaktorów oddziałujących z GLI1 albo GLI2 [6].

Wzrost ekspresji Gli1 może prowadzić do rozwoju nowotworów o różnorodnym fenotypie, jednak przyczyny tego zjawiska nie są do końca poznane. Poziom ekspresji Gli1 wpływa na różnicowanie komórek w cyklu komórkowym jak i podczas tworzenia mieszków włosowych. Niskie stężenie GLI1 prowadzi do wzmożenia proliferacji oraz rozwoju trichoblastomy (rak podstawnokomórkowy). Większa ilość białka przyczynia się do różnicowania mieszka włosowego i rozwoju raka podstawnokomórkowego, trichoepiteliomy oraz oblaka. Czynniki transkrypcyjne GLI funkcjonują zależnie od otoczenia, w jakim działają [5]. Z kolei do powstania specyficznego wzorca - kodu GLI w komórce, mającego wpływ na udział form aktywatorowych oraz represorowych, prowadzi ekspresja jak i potranslacyjna stabilizacja członków rodziny GLI [7].

Brak jest danych na temat wpływu wzrostu ekspresji Gli1 w nowotworach na zwiększenie liczby kopii genu, aktywacji szlaku SHH-GLI, bądź też współdziałania obu tych czynników. Nie wyjaśniono też, w jaki sposób stan komórki i status szlaku SHH-GLI oddziałuje na aktywność białek GLI w nowotworach, w których zaburzona jest regulacja ekspresji genów GLI. Rozstrzygnięcie wątpliwości ułatwi zrozumienie roli tych czynników w kancerogenezie i doprowadzi do odkrycia strategii leczniczych [1].

Wielopostaciowy glejak zarodkowy

Wielopostaciowy glejak zarodkowy (ang. glioblastoma multiforme - GBM) jest bardzo złośliwym nowotworem, charakteryzującym się szybkim rozrostem, rozwijającym się w mózgu. Pacjenci z rozpoznanym GBM sporadycznie przeżywają 12 miesięcy. Jednym z wielu genów związanych

z występowaniem wielopostaciowego glejaka zarodkowego jest Gli1. Zwiększenie liczby kopii genu Gli1, a także jego nadmierna ekspresja współuczestniczą w powstawaniu glejaków. Ze względu na różnorodne zachowanie biologiczne, histopatologię i stopień złośliwości, glejaki są podzielone na cztery stopnie (Tab. 1) [13].

Tabela 1. Klasyfikacja glejaków ze względu na stopień złośliwości nowotworu.

Glejak (stopień złośliwości)	Nazwa nowotworu
I	Gwiaździak włosokomórkowy
II	Gwiaździak
III	Gwiaździak plastyczny
IV	Wielopostaciowy glejak zarodkowy

Charakterystyczną cechą glejaków wszystkich stopni jest specyficzna prognoza, ukierunkowująca dalsze leczenie. Przykład mogą stanowić pacjenci z diagnozą skąpodrzewiaka, nowotworu pochodzącego ze specyficznych komórek glejowych tzw. skąpogleju, którym po jego całkowitym usunięciu prognozuje długość życia na około 10 do 15 lat. Natomiast chorzy na wielopostaciowego glejaka zarodkowego po zdiagnozowaniu choroby umierają w ciągu roku. Nawroty GBM nawet po chirurgicznym usunięciu występują bardzo często, a mutacje drugorzędowe są inne od pierwotnych. Glejak wielopostaciowy jest najbardziej złośliwą odmianą glejaka. Do glejaków zalicza się także prymitywne guzy neuroektodermalne, których przedstawicielem jest rdzeniak zarodkowy występujący u dzieci [13].

Strategie terapeutyczne

Konwencjonalne metody leczenia glejaka obejmują chirurgiczne usunięcie, radioterapię oraz chemioterapię. Metody te posiadają działanie łagodzące chorobę, a jej nawroty są nieuniknione. Całkowite usunięcie guza jest w zasadzie niemożliwe, a pozostałości chorej tkanki przyczyniają się do wznowienia choroby. Wynika to ze specyfiki lokalizacji i dużej inwazyjności nowotworu (Tab. 2). Postęp medycyny, nie daje możliwości długiego przeżycia, po diagnostyce i operacji okres przeżycia wynosi około 6 miesięcy, jedynie 7-8% pacjentów żyje do dwóch lat po diagnozie. Radioterapia i chemioterapia wydłużają ten czas do około 9-12 miesięcy [14].

Tabela 2. Cechy charakterystyczne glejaków i ośrodkowego układu nerwowego (OUN) oraz ich znaczenie dla skuteczności terapii.

Wybrane cechy glejaków oraz ośrodkowego układu nerwowego	Konsekwencje
Proliferacja komórek guza w środowisku nie dzielących się komórek gospodarza (możliwość zastosowania wektorów wirusowych namnażających się w komórkach proliferujących)	pozytywne
Miejscowa złośliwość (rzadko występują odległe przerzuty)	pozytywne
Heterogenność składu komórkowego	negatywne
Ochrona przed układem immunologicznym (immunouprzywilejowanie)	negatywne
Rozproszenie komórek guza na dużym obszarze (inwazyjność)	negatywne
Bariera krew-mózg i/lub krew-mózg-guz (trudność dostarczenia terapeutyku)	negatywne
Zróżnicowanie genetyczne i cytogenetyczne	negatywne

Do zniszczenia guza prowadzi wprowadzanie do glejaka nieszkodliwych enzymów, w którym po ogólnoustrojowym wprowadzeniu nieaktywnego leku, dochodzi do jego konwersji do

cytotoksycznego produktu. W złośliwych glejakach zachodzi zwiększenie ekspresji genów kodujących powierzchniowe receptory komórkowe, które wiążą ligandy i wprowadzają do komórki, co umożliwia projektowanie specyficznych metod dostarczenia do komórek rakowych radioizotopów bądź toksyn. Pośród ligandów zastosowanie znalazła interleukina 4, interleukina 13, transformujący czynnik wzrostu α (TGF α) oraz transferryna. Natomiast czynnikiem przeciwnowotworowym jest egzotoksyna Pseudomonas oraz toksyna dyfterytu. Zastosowanie inhibitora FAS (ceruleniny) powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego i obniżenie żywotności komórek glejakowych. Zwiększenie ekspresji genu RFT, w niektórych liniach komórkowych, indukuje apoptozę komórek glejakowych [14].

Obiecującą metodę leczenia guzów mózgu stanowi immunoterapia. Prowadzone są liczne badania nad nowymi specyficznymi antygenami glejaków. Badania przedkliniczne z zastosowaniem znaczonych jodem 131I przeciwciał monoklonalnych przeciwko tenascynie wykazały opóźnienie wzrostu guza [14,15].

Po raz pierwszy badania kliniczne terapii genowej złośliwych glejaków zrealizowano w latach 90. XX wieku. Zastosowano wówczas strategie HSV-tk (ang. herpes-simplex-thymidine kinase gene therapy), interleukiny, interferony, antysensowne oligonukleotydy, a także wektory pochodzenia adenowirusowego i z wirusów herpes simplex. Zbyt mała efektywność włączania wprowadzonych genów do genomu gospodarza, stanowi zasadniczą przeszkodę w terapii genowej opierającej się na wektorach wirusowych. Terapeutykami będącymi w fazie badań klinicznych są: inhibitory PDGFR (ang. platelet-derived growth factor receptor), VEGF (ang. vascular endothelial growth factor), EGFR, inhibitory kinaz, farnezylotransferaz, Akt (ang. v-akt marine thymoma Vidal oncogene), mTOR (ang. mammalina target of rapamycin), Hsp-90 (ang. heatshock protein 90), PKC (ang. protein kinase C), HDAC (ang. histone deacetylase). Zaliczyć tu także należy czynniki mające wpływ na inwazyjność nowotworu, radioaktywnie znakowane przeciwciała monoklonalne, toksyny skoniugowane z cytokinami, jak również czynniki wpływające na odpowiedź apoptotyczną [14,16].

Metodami wprowadzania terapeutyku do guzów mózgu są systemy oparte na wektorach adenowirusowych: AAV (ang. adeno-associated virus), herpeswirusowych i lentiwirusowych. Istnieją także nowatorskie strategie, które wykorzystują komórki transportowe (ang. cerrier cell systems), w tym komórki neuronalne i śródbłonkowe komórki progenitorowe [14,16]

W celu hamowania lub modulacji ekspresji, a także aktywności biologicznej produktów wielu genów zostały wykorzystane syntetyczne oligodeoksynukleotydy. Genami docelowymi dla terapii guzów mózgu są: transformujący czynnik wzrostu α (TGFα), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growthfactor - bFGF), receptor czynnika wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor receptor – FGFR), czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF), podjednostka α topoizomerazy II, kinaza białkowa C α (ang. protein kinase C α - PKC α), telomeraza i związane z mikrotubulami białko 1A (ang. microtubule–associated protein 1A – MAP1A) [14,16].

Pokłada się duże nadzieje nad zastosowaniem transplantacji komórek pnia jako nośników cząsteczek toksycznych dla guza. Techniką wykorzystywaną w terapii genowej glejaków jest wszczepianie do guza komórek pakujących, nazywanych także komórkami produkującymi wektory (ang. vector-producing cells - VPCs). Wciąż prowadzone są badania nad stworzeniem VPCs, mających zdolność migracji w OUN oraz docierania do rozległych naciekających komórek guza [14,16].

Zastosowanie interferencji RNA w terapii nowotworów

Interferencja RNA (ang. RNA interference- RNAi) jest to naturalny mechanizm odpowiadający za ochronę genomu, a także kontrolę ekspresji genów. Uczestniczące w tym procesie niskocząsteczkowe RNA, prowadzą do degradacji komplementarnego RNA. RNAi może stanowić metodę terapeutyczną, gdyż nowotwory, zarówno genetyczne jak i wirusowe, mają związek

z nieprawidłową ekspresją określonych genów. Możliwość ich wyciszenia przeświadcza o skuteczności leczenia [14,17].

W celu wyciszenia ekspresji genu Gli1 jest stosowany siRNA (ang. short interfering RNA). W komórkach raka prostaty spowodował on redukcję proliferacji o 60%. Zastosowanie siRNA przeciw Gli1 w komórkach NT2 również przyczyniło się do obniżenia proliferacji. W celu wyciszenia ekspresji genu EGFR zastosowano RNAi oraz siRNA. RNAi spowodował inhibicję wzrostu ludzkich komórek glejaka zarodkowego in vitro. Natomiast siRNA nawet o 70-90% nie wystarczało do inhibicji proliferacji glejakowych linii komórkowych U373, LN18 i MG. Sugeruje to o konieczności stosowania w metodach leczenia kilku interferencyjnych RNA skierowanych przeciw różnorodnym genom docelowym. Wyciszanie ekspresji genu FAS prowadzi do obniżenia żywotności komórek glejakowych. Wykorzystanie wektora, który posiada hpRNA (ang. hairpin RNA) lub siRNA do indukcji procesu interferencji ukierunkowanej przeciw genom MMP-9 oraz katepsynie B w linii komórkowej SNB19, która została wyprowadzona z glejaka zarodkowego, doprowadziło do zredukowania inwazyjności komórek. Zastosowanie tego samego wektora in vivo wpłynęło na zahamowanie wzrostu glejaka i cofnięcie na około 4 miesiące rozwoju nieustabilizowanego guza. shRNA przyczynia się do zwiększenia wrażliwości na chemioterapię, poprzez obniżenie poziomu mRNA MDR1 (ang. multidrug resistance homolog 1) oraz białka glikoproteiny P (P-gp) w glejakowej linii komórkowej. Wyciszanie ekspresji genów uPAR (ang. urokinase-type plazminogen activator receptor), uPA (ang. urokinase-type plazminogen activator), a także katepsyny B przyczynia się do reaktywacji genów proapoptotycznych, zmniejszenia inwazyjności oraz rozwoju naczyń w ludzkiej glejakowej linii komórkowej SNB19 oraz in vivo. Wyciszanie ekspresji genu Bcl2L12 (ang. Bcl2-like-12) osłabia wzrost guza poprzez zwiększenie apoptozy in vitro i in vivo. RNAi zastosowano również do wyciszania ekspresji genu tenascyny C (TN-C). Zwiększona ekspresja TN-C w ranach i w stanach zapalnych tkanek oraz w tkankach łącznych otaczających guzy wpływa na możliwość regulowania morfologii, migracji oraz wzrostu komórek poprzez aktywację zróżnicowanych międzykomórkowych szlaków sygnalizacyjnych [14,17].

Bariera krew-mózg stanowi podstawowe ograniczenie chemioterapii, terapii genowej oraz wykorzystania interferencji RNA. Przeszkodą dla terapeutyków są ścisłe połączenia między komórkami śródbłonka wyścielającego kapilary mózgu. Dla siRNA o średniej masie cząsteczek około 14 kDa (ok. 40 nuklotydów) bariera krew-mózg jest nieprzepuszczalna. W celu zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg stosuje się czynniki osmotyczne, jak na przykład mannitol. Prowadzone są również próby zastosowania metod farmakologicznych za pomocą analogu bradykininy RMP-7. Glejak wielopostaciowy należy do najtrudniejszych do leczenia nowotworów z powodu niekontrolowanej proliferacji, inwazyjnego wzrostu powodującego naciekanie sąsiadujących tkanek mózgu, dynamicznej angiogenezy oraz braku apoptozy. W związku z tym, przeprowadzono badania porównawcze odnośnie skuteczności leczenia przy zastosowaniu brachyterapii i interferencji RNA u pacjentów po reoperacji wznowy złośliwego glejaka mózgu. Opracowano metodę bezpośredniego podania dwuniciowego RNA o sekwencji homologicznej do mRNA białka tenascyny C(ATN-RNA) do mózgu nacieczonego nowotworem, który nie mógł być usunięty operacyjnie. Po zastosowaniu metody interwencji z użyciem interferencyjnego RNA nie zaobserwowano powikłań związanych z podaniem ATN-RNA. Wykazano, że ponowna wznowa złośliwego glejaka po powtórnej operacji i podaniu ATN-RNA została zauważona poza miejscem podania ATN-RNA, a czas przeżycia w porównaniu z chorymi poddanymi tylko brachyterapii wydłużył się o 3,5 tygodnia. Zatem udowodniono, że interwencja interferencyjnym RNA (RNAi) stanowi uzupełnienie leczenia neurochirurgicznego we wznowach złośliwych glejaków mózgu [14,18].

Podsumowanie:

Etiologia chorób nowotworowych jest bardzo skomplikowana. Za nowotworzenie odpowiedzialność biorą zarówno czynniki fizyczne i genetyczne, jak również wirusy i substancje chemiczne. Dochodzi do zaburzeń funkcji komórkowych oraz niekontrolowanej proliferacji ze względu na nagromadzenie szkodliwych mutacji w genomie. Genetycznie zmieniona komórka zapoczątkowuje całą populację nieprawidłowych komórek. Terapia genowa jest nadzieją na wyleczenie wielu nowotworów, uważanych dziś za nieuleczalne. Całkowite wyeliminowanie efektów ubocznych wydaje się niemożliwe do zrealizowania, jednak celem badań naukowców jest udoskonalanie metod przekazania materiału genetycznego do komórek pacjentów w taki sposób, aby stały się bezpieczne w leczeniu. Rozwój inżynierii genetycznej, badania nad nowymi wektorami kwasów nukleinowych pozwalają sądzić, że w nadchodzących latach terapia genowa będzie szeroko dostępną, skuteczną i bezpieczną formą leczenia nowotworów jak i innych chorób. Czynnik transkrypcyjny Gli1 stanowi efektorowe ogniwo szlaku sygnalizacji SHH-GLI, wpływa na ekspresje wielu potencjalnych onkogenów, co powoduje, że jest on odpowiednim celem wielu strategii terapeutycznych.

Przypuszcza się, że w przyszłości od rozpoznania histopatologicznego i profilu zaburzeń ekspresji poszczególnych genów zależeć będzie wybór strategii leczenia glejaków. Współczesne techniki neurochirurgiczne w połączeniu z metodami biologii molekularnej, jak również współdziałanie lekarzy i naukowców przyczyniło się do powstania nowej dziedziny nauki zwanej neurochirurgią komórkową i molekularną.

Słowa kluczowe: czynniki transkrypcyjne, GLI1, onkogen, szlak SHH-GLI, wielopostaciowy glejak zarodkowy, glejaki, terapia genowa, interferencja RNA, choroby nowotworowe.

Literatura:

1. Blancafort P., Segal D.J., Barbas III C.F. Designing tranacription factor architectures for drug discovery. Mol. Pharmacol. 2004. 66, 1361-1371.
2. Ganss B., Jheon A. Zinc finger transcription factors in skeletal development. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 2004. 15, 282-297.
3. Kinzler K.W., Vogelstein B. The Gli gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. Mol. Cell Biol. 1990. 10, 634-642.
4. Yoon J.W., Kita Y., Frank D.J., Majewski R.R., Konicek B.A., Nobrega M.A. Jacob H., Walterhouse D., Iannaccone P. Gene expression profiling leads to identification of Gli1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in Gli1-induced cell transformation. J. Biol. Chem. 2002. 227, 5548-5555.
5. Kasper M., Schnidar H., Neill G.W., Hanneder M., KlinglerS., Blaas L., Schmid C., Hauser-Kronberger C., Regl G., Philpott M.P., Aberger F. Selective modulation of hedgehog/Gli target gene expression by epidermal growth factor signaling in human keratinocytes. Mol. Cell Biol. 2006. 26, 6283-6299.
6. Bigelow R.L.H., Chari N.S., Unden A.B., Spurgers K.B., Lee S., Roop D.R., Toftgard R., McDonnell T.J. Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through Gli1. J. Biol. Chem. 2004. 279, 1197-1205.
7. Robbins D.J., Hebrok M. Hedgehogs: la dolce vita. Workshop on hedgehog-Gli signaling in cancer and stem cells. EMBO Rep. 2007. 8, 451-455.
8. Stecca B., Ruiz I., Altaba A. Brain as a paradigm of organ growth: hedgehog-Gli signaling in neural stem cells and brain tumors. J. Neurobiol. 2005. 64, 476-490.
9. Dellovade T., Romer J.T., Curran T., Rubin L.L. The hegehog pathway and neurological disorders. Annu. Rev. Neurosci. 2006. 29, 539-563.
10. Rahnama F., Shimokawa T., Lauth M., Finta C., Kogerman P., Teglund S., Toftgard R., Zaphiropoulos P.G. Inhibition of Gli1 gene activation by patched1. Biochem. J. 2006. 394, 19-26.
11. Lewis M. A general model of hedgehog signaling. www.breastcenter.tmc.edu.

12. Riobo N.A., Haines G.M., Emerson J.C.P. Protein kinase C-δ and mitogen - activated protein/extarcellular signal-regulated kinase-1 control Gli activation in hedgehog signaling. Cancer Res. 2006. 66, 839-844.
13. Belda-Iniesta C., de Castro Carpeno J., Casado Saenz E., Cejas Guerrero P., Perona R., Gonzalez Baron M. Molecular biology of malignant glioma. Clin. Transl. oncol. 2006. 8, 635-641.
14. Gabryelska M., Wyszko E., Nowak S., Żukiel R., Barciszewski J. Rola czynnika transkrypcyjnego gli1 w ontogenezie i nowotworzeniu. Na pograniczu chemii i biologii. 2007. Tom XVII, 49-75.
15. Sathornsumetee S., Rich J.N. New approaches to primary brain tumor treatment. Anticancer Drugs. 2006.17. 1003—1016.
16. Słowiński J., Mrówka R. Terapia genowa w leczeniu chorych z glejakami mózgu. Neurol. Neurochir. Pol. 2004. 38, 45-50.
17. Lakka S.S., Gondi C.S., Dinh D.H., Olivero W.C., Gujrati M., Rao V.H., Sioka C., Rao J.S. Specific interference of urokinase-type plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 gene expression induced by double-stranded RNA results in decreased tumor growth and angiogenesis ingliomas. J. Biol. Chem. 2005. 280. 21882-21892.
18. Preusser M., Haberler C., Hainfellner J.A. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. Wien. Med. Wochenschr. 2006. 156, 332-337.
19. http://fineartamerica.com/featured/transcription-factor-and-dna-molecules-phantatomix.html

http://laboratoria.net/artykul/20821.html

Informacje dnia: Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Palacze mają w brzuchu więcej tłuszczu Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Palacze mają w brzuchu więcej tłuszczu Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Palacze mają w brzuchu więcej tłuszczu

Partnerzy