

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

MicroRNAs, καρκίνος και καρκινικά βλαστοκύτταρα Από την έρευνα στη θεραπεία

Τα microRNAs (miRNAs) έχουν μήκος 21–23 νουκλεοτίδια και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω πρόσδεσης σε μια μη κωδική περιοχή των mRNA-στόχων που ονομάζεται 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR). Με αυτόν το μηχανισμό, τα miRNAs ρυθμίζουν την αυτο-ανανέωση, τη διαφοροποίηση και τη διαίρεση των κυττάρων, μέσω της μετα-μεταγραφικής σίγησης των γονιδίων. Διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των βλαστοκυττάρων, καθώς και σε διάφορες νόσους (με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον καρκίνο). Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση, είτε προωθώντας την αποδόμηση συγκεκριμένων μεταγράφων RNAs (mRNAs). Παρά το γεγονός ότι ποσοστό 3% των γονιδίων του ανθρώπου κωδικοποιεί miRNAs, τα εν λόγω miRNAs ρυθμίζουν περίπου το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αυτό υποδεικνύει όχι μόνο τη σημασία τους σε ποικίλα ρυθμιστικά μονοπάτια, αλλά και το δυναμικό τους για χειρισμό των λειτουργιών του κυττάρου. Επιπρόσθετα, όσον αφορά στον καρκίνο, τα miRNAs έχει παρατηρηθεί να δρουν τόσο ως ογκοκατασταλτικά μόρια όσο και ως ογκογονίδια, τα οποία αναστέλλουν και επάγουν-προάγουν την ανάπτυξη όγκου, αντίστοιχα. Επί πλέον, μια συνολική υποέκφραση των miRNAs παρατηρείται σε πολλούς καρκινικούς ιστούς, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς. Επομένως, μια δυναμική θεραπευτική χρήση των miRNAs αφορά στη διόρθωση των απορρυθμισμένων επιπέδων μετάφρασης γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα, και ιδιαίτερα στα καρκινικά βλαστοκύτταρα που πρωτίστως ευθύνονται για την καρκινογένεση και τις μεταστάσεις. Σκοπός του συγκεκριμένου άρθρου είναι η επισήμανση του κομβικού ρόλου των miRNAs κατά τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων και την πιθανή μελλοντική συμβολή των συγκεκριμένων μορίων σε θεραπευτικές προσεγγίσεις σχετικά με τον καρκίνο.

1. ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ miRNAs

Τα microRNAs (miRNAs) lin-4 και let-7 ήταν τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν και βρέθηκαν να ενεργοποιούν έναν καταρράκτη γονιδιακής έκφρασης που ρυθμίζει αναπτυξιακά γεγονότα μέσω μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων στον *Caenorabditis elegans*. Αν και αρχικά πιστευόταν ότι διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο μόνο στο σκώληκα, η σημασία τους έγινε εμφανής όταν, το 2001, αναγνωρίστηκαν και κλωνοποιήθηκαν μόρια miRNA από αρκετούς οργανισμούς, περιλαμβανομένου του ανθρώπου και οι νουκλεοτιδικές τους αλληλουχίες βρέθηκαν φυλογενετικά συντηρημένες.

Στον άνθρωπο, γονίδια των miRNAs έχουν βρεθεί σε

όλα τα χρωμοσώματα, με εξαίρεση το Y. Περίπου τα μισά των γνωστών miRNAs είναι ομαδοποιημένα και φαίνεται να μεταγράφονται ως πολυσιστρονικά μετάγραφα. Η πλειοψηφία των γονιδίων των miRNAs των θηλαστικών συναντώνται σε εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή σε μεταγραφικές μονάδες που εντοπίζονται μεταξύ γονιδίων και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Πιο σπάνια βρίσκονται σε εξώνια, εμφανίζοντας αντινοσηματικό προσανατολισμό σε σχέση με το γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη. Τα miRNAs σε περιοχές μεταξύ γονιδίων και, μερικές φορές, τα miRNAs των εσώνων μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II ως ανεξάρτητες μονάδες. Το πρόδρομο μετάγραφο (pri-miRNA) καλύπτεται με μια μεθυλιωμένη γουανίνη και πολυαδενυλιώνεται.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2013, 30(4):391–405
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2013, 30(4):391–405

Ε. Σκούρτη,
Ι. Χριστοδούλου,
Σ. Λογοθέτη,
Β. Ζουμπουρλής

Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών,
Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής
Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό
Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα

MicroRNAs, cancer and cancer
stem cells: From research
to therapy

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Βλαστοκύτταρα
Θεραπεία του καρκίνου
Καρκινικά βλαστοκύτταρα
MiRNAs

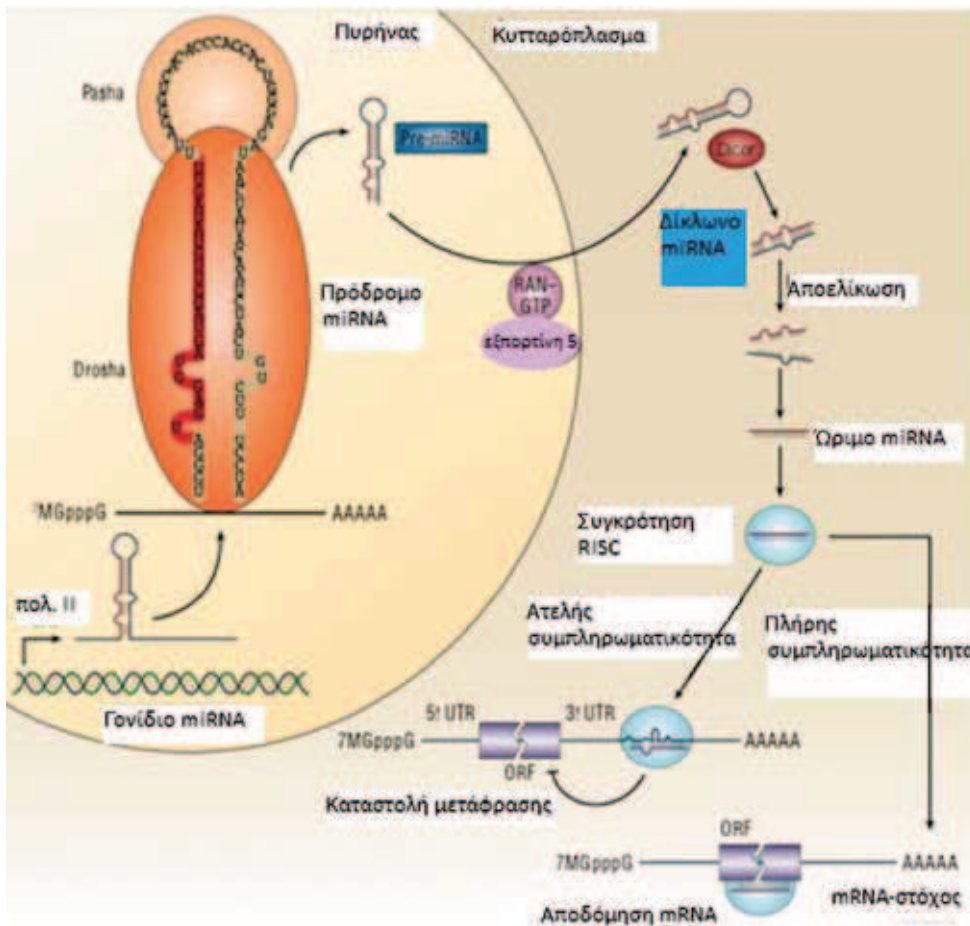
Υποβλήθηκε 5.2.2013
Εγκρίθηκε 25.2.2013

Επιπρόσθετα σε αυτό το μονοπάτι, το οποίο απεικονίζεται στην εικόνα 1, η ωρίμανση των miRNAs περιλαμβάνει πολύ πιο περίπλοκες ρυθμίσεις. Το μεταγραφόμενο και αποκοπτόμενο pri-miRNA έχει τα εξής χαρακτηριστικά: Μια δομή μίσχου φουρκέτας (hairpin structure, HPS) με μέσο μήκος 33 ζεύγη βάσεων, μια ακραία θηλιά (T-loop) και δύο μονόκλωνες περιοχές (single stranded regions, SSR) εκατέρωθεν του μίσχου. Το pri-miRNA κατόπιν πέπτεται, σχηματίζοντας το pre-miRNA. Η πέψη γίνεται από ένα σύμπλοκο που αποτελείται από την RNάση Droscha και την πρωτεΐνη 8 της κρίσιμης περιοχής του γονιδίου του συνδρόμου DiGeorge (DiGeorge syndrome crucial region of gene 8, DGCR8). Η DGCR8 δρα ως ένας μοριακός κανόνας για την ακριβή θέση πέψης του miRNA, όπου λαμβάνουν χώρα 11 ζεύγη βάσεων μακριά από τη σύνδεση μονόκλωνου και δίκλωνου RNA. Έπειτα, οι δύο δομικές αυτοτελείς περιοχές (domains) της Droscha πέπτουν τα 5' και τα 3' άκρα του μίσχου. Ο σχηματισμός του pre-miRNA από την Droscha συμβαίνει συν-μεταγραφικά και πριν από το μάτισμα (splicing), ανεξάρτητα από το γεγονός αν το αρχικό μετάγραφο κωδικοποιεί ή όχι πρωτεΐνη. Ενώ τα

εσώνια που κωδικοποιούν miRNA υφίστανται μάτισμα βραδύτερα από τα γειτονικά εσώνια, η πέψη από την Droscha δεν παρεμποδίζει το μάτισμα επειδή αυτό δεν απαιτεί ένα συνεχές εσώνιο.

Η βιογένεση των miRNAs είναι επίσης πολύ εξειδικευμένη διαδικασία, αφού εξαρτάται από το εκάστοτε miRNA που εκφράζεται. Αποκλίσεις στο επίπεδο της μεταγραφής περιλαμβάνουν τα εξής: Πρώτον, τα γονίδια των miRNAs μπορεί να μεταγράφονται είτε από την RNA πολυμεράση II ή την RNA πολυμεράση III, αφού κάθε μια αναγνωρίζει ειδικούς υποκινητές και περιοχές λήξης και υφίσταται ειδική ρύθμιση. Δεύτερον, η έκφραση μπορεί επιπρόσθετα να ρυθμιστεί από μεταγραφικούς παράγοντες όπως το *c-Myc* ή το *p53*. Τέλος, υπάρχουν αποκλίσεις και στη διαδικασία πέψης.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η πέψη από την Droscha αντικαθίσταται από μάτισμα, αν το εσώνιο έχει κατάλληλο μήκος για σχηματισμό ενός pre-miRNA. Σε άλλες περιπτώσεις, τα pri-miRNAs επιστρατεύουν ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες για να



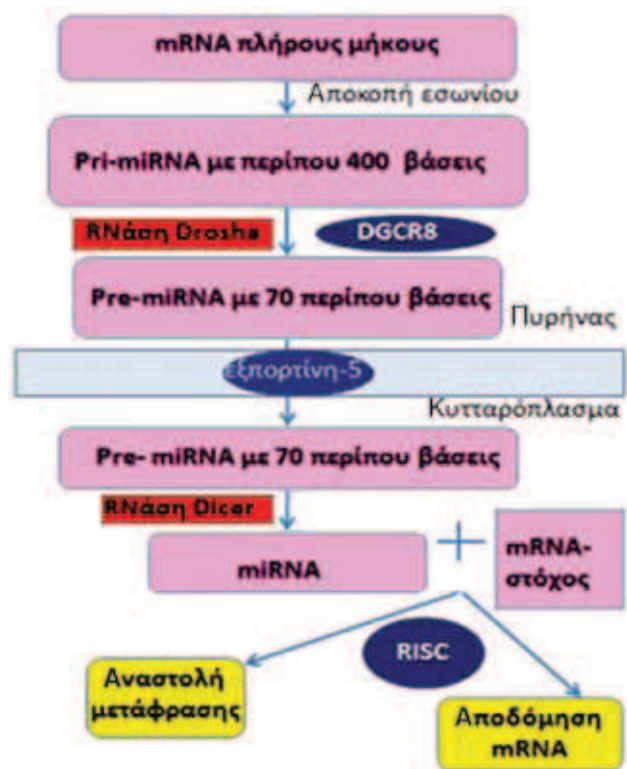
Εικόνα 1. Βιογένεση miRNAs. Ένα κανονικό μονοπάτι βιογένεσης miRNA αρχίζει με τη μεταγραφή των γονιδίων των miRNAs από την RNA πολυμεράση II. Η πλειονότητα των miRNAs στον άνθρωπο εκφράζεται από εσώνια, που συγκαταλέγονται στις μη κωδικουσες περιοχές του γονιδιώματος. Ένα εσώνιο με μήκος περίπου 400 νουκλεοτίδια αποκόπτεται από το πρωτογενές μετάγραφο και γίνεται το πρόδρομο miRNA (primary miRNA, pri-miRNA). Το pri-miRNA στη συνέχεια υφίσταται πέψη από την RNάση Droscha (η οποία για να δράσει απαιτεί την παρουσία του DGCR8 στον άνθρωπο και την Pasha στη *Drosophila melanogaster*) και καταλήγει στη μορφή βρόχου-φουρκέτας με μήκος περίπου 70 νουκλεοτίδια, σχηματίζοντας το pre-miRNA. Το pre-miRNA τότε εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα από μια πρωτεΐνη της πυρηνικής μεμβράνης, την εξπορτίνη 5 (exportin-5). Αφού μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα η RNάση Dicer ολοκληρώνει την επεξεργασία του μορίου, έτσι ώστε να προκύψει το ώριμο miRNA.

μεσολαβήσουν και να ενισχύσουν τη δράση της Droscha. Άλλες πρωτεΐνες, όπως οι RNA ελικάσες, οι πρωτεΐνες που προσδένονται σε δίκλωνο RNA και οι πρωτεΐνες του σαρκόματος Ewing, επίσης μπορεί να εμπλακούν, ανάλογα με το εκάστοτε miRNA.

Η δράση του συμπλόκου των Droscha-DGCR8 (αντίστοιχος της Pasha στην *Drosophila melanogaster*) δίνει γένεση στο pre-miRNA, ένα μόριο μήκους 60–70 νουκλεοτιδίων με δομή μίσχου-θηλιάς που εξάγεται ταχύτατα στο κυτταρόπλασμα από την εξπορτίνη-5 με μια εξαρτώμενη από GTP διαδικασία. Το ώριμο miRNA βρίσκεται στην 5' ή στην 3' πλευρά του μίσχου του pre-miRNA. Κάποιες φορές και τα δύο τμήματα παράγουν ώριμα miRNAs. Αφού το pre-miRNA βρεθεί στο κυτταρόπλασμα, μια δεύτερη RNάση III, η Dicer, δρα στο pre-miRNA για την απελευθέρωση ενός δίκλωνου miRNA 22 νουκλεοτιδίων, στο οποίο το ώριμο miRNA είναι εν μέρει συνδεδεμένο με το συμπληρωματικό του κλώνο (miRNA*) μαζί με τον οποίο συνιστά το μίσχο. Συνήθως, μόνο ο κλώνος miRNA (ώριμο miRNA) του δίκλωνου μορίου miRNA-miRNA* είναι ενεργός και εισέρχεται σε ένα εξειδικευμένο πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το RISC, για να καταστείλει τη γονιδιακή έκφραση. Η διαδικασία παρουσιάζεται διαγραμματικά στην εικόνα 2.

Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε μέσω παρεμπόδισης της μετάφρασης, είτε μέσω προώθησης της αποδόμησης των mRNA-στόχων. Η μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση αρχίζει όταν ένα miRNA επιστρατεύει το σύμπλεγμα RISC (RNA-induced silencing complex, επαγόμενο από το RNA σύμπλοκο σίγησης), το οποίο συμβάλλει στην τοποθέτηση του miRNA επάνω στη συμπληρωματική αλληλουχία του mRNA-στόχου. Παρά την ύπαρξη εξαιρέσεων, η ειδικότητα της τοπικής στόχευσης εμπλέκει αλληλουχίες τόσο του miRNA όσο και του mRNA. Τα νουκλεοτίδια 2–8 του miRNA, που ονομάζονται περιοχή εκβλάστησης (seed region, SR), πρέπει να υβριδοποιούνται συνεχώς σε ένα τέλει συμπληρωματικό τμήμα του mRNA-στόχου. Οι θέσεις σύνδεσης για την περιοχή SR του miRNA βρίσκονται στην 3'-UTR του mRNA, και η συμπληρωματική αλληλουχία συνήθως επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέσα σε αυτή την περιοχή. Το εάν ένα miRNA προωθεί την αποδόμηση ή καταστέλλει τη μετάφραση του mRNA-στόχου του εξαρτάται από το βαθμό συμπληρωματικότητας που εμφανίζει το miRNA προς το 3' άκρο του mRNA. Ειδικότερα, ο μηχανισμός σίγησης πιθανόν υπαγορεύεται από τον αριθμό, τον τύπο και τη θέση των αταίριαστων ζευγών βάσεων μεταξύ miRNA και mRNA.

Τα miRNAs καταστέλλουν τη μετάφραση μέσω διαφόρων μηχανισμών είτε στο στάδιο της έναρξης, είτε στο στάδιο της επιμήκυνσης της μετάφρασης, ανάλογα



Εικόνα 2. Βιογένεση και λειτουργία των miRNAs. Εδώ παρουσιάζεται διαγραμματικά η αλληλουχία των γεγονότων που συμβαίνουν κατά την έκφραση ενός miRNA.

με το πώς μετριάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του 5' καλύμματος και της 3' πολυαδενυλιωμένης ουράς του mRNA. Παρά το γεγονός ότι ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμη καλά κατανοητός, η καταστολή της μετάφρασης περιλαμβάνει κυτταροπλασματικούς σχηματισμούς επεξεργασίας των mRNA, τα σωματίδια P (P-bodies). Αυτά πιστεύεται ότι διαδραματίζουν ένα ρόλο στη σίγηση των mRNA επειδή τα mRNA-στόχοι και τα συστατικά του RISC συν-εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές του κυττάρου. Τα P-bodies «φιλοξενούν» πολλές πρωτεΐνες που ελέγχουν τα σύμπλοκα των αγγελιαφόρων ριβονουκλεοπρωτεϊνών (messenger ribonucleoprotein, mRNP-complexes). Τα εν λόγω σύμπλοκα αποτελούνται από mRNA και πρωτεΐνες-καταστολείς αλλά όχι από παράγοντες έναρξης της μετάφρασης. Έτσι, η τοπολογία των mRNA-στόχων και επάνω στα P-bodies, και επομένως ο σχηματισμός των συμπλόκων mRNPs, παρεμποδίζουν τη μετάφραση. Παρά το γεγονός ότι η καταστολή της μετάφρασης φαίνεται να είναι η κύρια δράση κατά τη σίγηση, η αποδόμηση του mRNA είναι επίσης σημαντική και συμβαίνει όταν η αλληλουχία του miRNA πέρα από την περιοχή SR παρουσιάζει τέλεια συμπληρωματικότητα με την υπόλοιπη 3'UTR του mRNA. Η αποδόμηση αυτή περιλαμβάνει αποαδενυλίωση,

αφαίρεση του καλύμματος και εξωνουκλεολυτική πέψη του mRNA-στόχου. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι άγνωστος.

2. ΤΑ miRNAs ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Δεδομένης της σημασίας των miRNAs στην ανάπτυξη των κατώτερων φυλογενετικά οργανισμών και του ρόλου τους στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, ήταν αναμενόμενη η ανακάλυψη της εμπλοκής τους στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση, καθώς και στους ανώτερους οργανισμούς.

Το γεγονός ότι τα miRNAs συναντώνται μόνο σε πολυκύτταρους και όχι σε μονοκύτταρους οργανισμούς οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είναι απαραίτητα για τη διαφοροποίηση των τύπων των ιστών και τη διατήρηση μιας συγκεκριμένης κατάστασης διαφοροποίησης. Κύτταρα αδιαφοροποίητα ή χαμηλής διαφοροποίησης δεν απαιτούν miRNAs για να επιβιώσουν. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα miRNAs είναι σημαντικά για τα αρχικά και τα τελικά στάδια ανάπτυξης των κυττάρων των σπονδυλοζώων. Για παράδειγμα, εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (EBK) ποντικού που δεν εκφράζουν το ένζυμο *dicer*, και επομένως δεν μπορούν να αναπτύξουν ώριμα miRNAs, είναι βιώσιμα. Ωστόσο, αδυνατούν να διαφοροποιηθούν.² Τα EBK τόσο του ποντικού όσο και του ανθρώπου εκφράζουν μια συγκεκριμένη ομάδα miRNAs που υποεκφράζονται κατά τη διαφοροποίηση προς εμβρυοειδή σωματίδια. Το miR-196 και πιθανόν το miR-10 εμπλέκονται στη ρύθμιση των γονιδίων *hox* που κωδικοποιούν αναπτυξιακούς μεταγραφικούς παράγοντες. Και τα δύο γονίδια βρίσκονται σε παράλογες ομάδες των γονιδίων *hox*, εμφανίζουν πρότυπα έκφρασης που είναι παρόμοια αυτών των γονιδίων *hox*, ενώ το miR-196a ρυθμίζει αρνητικά το *hoxb8*.

Μερικά miRNAs φαίνεται να διακατέχουν ρόλο-κλειδί στη διατήρηση της κατάστασης διαφοροποίησης. Το miR-181 εκφράζεται στα Β-λεμφοκύτταρα και η έκτοπη έκφρασή του αυξάνει το κλάσμα των Β-λεμφοκυττάρων και ελαττώνει το κλάσμα των Τ-λεμφοκυττάρων στα ποντίκια. Το miR-181 μπορεί επίσης να ρυθμίσει την έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των μυελοβλαστών. Επιμόλυνση ανθρώπινων κυττάρων HeLa με το μυοειδικό miR-1 ή το εγκεφαλοειδικό miR-124 αλλάζει το προφίλ έκφρασης των miRNAs προς εκείνο των μυϊκών ή των εγκεφαλικών κυττάρων, αντίστοιχα. Το miR-1 μεταγράφεται μαζί με το miR-133 κατά τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών προς μυϊκά κύτταρα, ενώ τα δύο τους διαδραματίζουν διακριτούς ρόλους κατά τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των μυοβλαστών. Υπερέκφραση

του miR-1 στην καρδιά διαγονιδιακών ποντικών οδηγεί σε ελαττωματικό πολλαπλασιασμό και αποτυχία επέκτασης των καρδιομυοκυττάρων της κοιλίας, στοιχείο που είναι χαρακτηριστικό της πρόωρης διαφοροποίησης των καρδιομυοκυττάρων. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη MyoD ενεργοποιεί τη μεταγραφή των miR-1 και miR-133. Φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα miRNAs επιδρούν στη δραστηριότητα αυτού του ειδικού μεταγραφικού παράγοντα των μυϊκών κυττάρων.

Το miR-122a εμφανίζει υψηλή έκφραση στο ήπαρ των ενθλίκων και τα επίπεδά του αυξάνονται, γενικά, κατά την ανάπτυξη του ήπατος των θηλαστικών. Το miR-143 εκφράζεται έντονα στο λιπώδη ιστό και υπερεκφράζεται κατά τη διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων προς λιποκύτταρα στον άνθρωπο. Τα miRNAs επίσης εμπλέκονται στη μορφογένεση του δέρματος και το miR-134 λειτουργεί επάγοντας την ανάπτυξη των δενδριτικών απολήξεων.

Παρά το μικρό τους μέγεθος, τα miRNAs τελικά διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο ως διακόπτες ελέγχου κατά την ανάπτυξη και την κυτταρική διαφοροποίηση. Λόγω αυτών των λειτουργιών τους, που είναι απαραίτητες σε κάθε εξειδικευμένο ιστό, η απορρύθμιση των miRNAs μπορεί να επηρεάσει τη διαφοροποίηση, που συχνά αποδιοργανώνεται ως βιολογική διαδικασία σε καρκινικά κύτταρα.

3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

Ο κακοήθης μετασχηματισμός είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, οι οποίες επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και το θάνατο των κυττάρων. Σε μεταγενέστερα στάδια της ογκογένεσης, επιπρόσθετες μεταβολές ενδέχεται να επάγουν την αγγειογένεση, τη διήθηση σε γειτονικούς ιστούς και τη μετάσταση σε απομακρυσμένα σημεία. Με λίγες εξαιρέσεις, αυτή η πολυπαραγοντική και πολυσταδιακή διαδικασία εξελίσσεται για πολλά χρόνια. Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στον καρκίνο είναι συνήθως μεταλλαγμένες μορφές φυσιολογικών γονιδίων που έχουν ενεργοποιηθεί ή απενεργοποιηθεί και είναι γνωστά ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια, αντίστοιχα. Η κατανόηση των βιολογικών λειτουργιών των σχετικών γονιδίων έχει οδηγήσει στην αναγνώριση μοριακών μονοπατιών και δικτύων, η απορρύθμιση των οποίων είναι υπεύθυνη για την έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου.

Τα πιο γνωστά γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Η ικανότητά μας να αναγνωρίζουμε τη συσχέτισή τους με τον καρκίνο έγινε δυνατή με την ταυτοποίηση των γενετικών και των επιγενετικών αλλαγών που επηρεάζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνικών προϊόντων

τους. Γενικά, ένας όγκος αποτελείται από έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων που διαφέρουν ως προς το σχετικό στάδιο διαφοροποίησής τους. Το εξωτερικό ενός όγκου περιλαμβάνει πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα που είναι ευαίσθητα στην ακτινοβολία και τη χημειοθεραπεία. Αυτό συμβαίνει λόγω της θέσης τους κοντά στο μη ογκογόνο μικροπεριβάλλον και την επαρκή ροή αίματος που οφείλεται στην επαγόμενη αγγειογένεση ή στην ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων. Η επόμενη προς το κέντρο του όγκου περιοχή περιλαμβάνει προγονικά κύτταρα (progenitor cells) που μπορούν να υποστούν έναν περιορισμένο αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων για να σχηματίσουν αρκετά θυγατρικά κύτταρα. Αυτά τα θυγατρικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν στη συνέχεια σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων βάσει των μικροπεριβαλλόντων τους. Στο κέντρο του όγκου βρίσκονται τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs), που είναι τόσο δομικά όσο και λειτουργικά διακριτά από τα υπόλοιπα κύτταρα μέσα στον όγκο.

Κάθε CSCs έχει την ικανότητα να υφίσταται αυτο-ανανεωτική μίτωση, όπου το ένα ή και τα δύο από τα θυγατρικά κύτταρα διατηρούν την ταυτότητα του βλαστοκυττάρου. Το άλλο θυγατρικό κύτταρο μπορεί να γίνει προγονικό κύτταρο που υφίσταται ορισμένους μιτωτικούς κύκλους, μέχρι να καταστεί διαφοροποιημένο καρκινικό κύτταρο. Τα CSCs εμφανίζουν ταχύτατους ρυθμούς διαφοροποίησης όταν καλλιεργούνται. Έτσι, είναι δύσκολη η διατήρηση ενός πληθυσμού *in vitro* που να είναι εμπλουτισμένος σε CSCs. Τέτοιοι πληθυσμοί εμφανίζουν τρία χαρακτηριστικά *in vitro*: (α) Μπορούν να απομονωθούν με τη χρήση των προφίλ των δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας, (β) σχηματίζουν σφαιρικές αποικίες σε υγρές καλλιέργειες (tumorspheres, ογκοσφαίρια) και (γ) έχουν αυξημένη αντίσταση τόσο σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όσο και σε ιονίζουσα ακτινοβολία.

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο προς το παρόν συμβάλλουν στη μείωση του μεγέθους του όγκου. Όμως, είναι απίθανο να οδηγήσουν σε μακροπρόθεσμη υποχώρηση της νόσου, όσο δεν στοχεύονται τα CSCs. Ωστόσο, τα καρκινικά βλαστοκύτταρα είναι δύσκολο να στοχευτούν λόγω των ενδογενών τους ιδιοτήτων. Χαρακτηρίζονται από την ανθεκτικότητά τους σε αντι-καρκινικές θεραπείες και τη δυνατότητά τους να επαναδημιουργούν πληθυσμούς. Μπορούν να αναγεννήσουν έναν όγκο μετά από χημειοθεραπεία και ακτινοβολία. Το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητάς τους σε πολλαπλά φάρμακα συσχετίζεται με την υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες λειτουργούν ως αντλίες εκροής. Οι ίδιες οι πρωτεΐνες ρυθμίζονται από ενεργές ρίζες οξυγόνου μέσα στο κύτταρο, που μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο του ιστού και επίσης μεταξύ των

ιστών. Έτσι, οποιαδήποτε θεραπευτική προσέγγιση, προκειμένου να στοχεύει τα CSCs, θα πρέπει να παρουσιάζει εξαιρετική ειδικότητα. Ένας ταχύτατα αναπτυσσόμενος τομέας στη θεραπεία του καρκίνου είναι η στόχευση miRNA που εμφανίζουν απορρυθμισμένα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα. Μελέτες λειτουργικότητας συγκεκριμένων miRNAs σε διάφορα καρκινικά κύτταρα, ιδιαίτερα στα CSCs, είναι απαραίτητες για να βρεθεί ένας θεραπευτικός στόχος.

4. miRNAs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

4.1. Τα miRNAs ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και ως ογκογονίδια

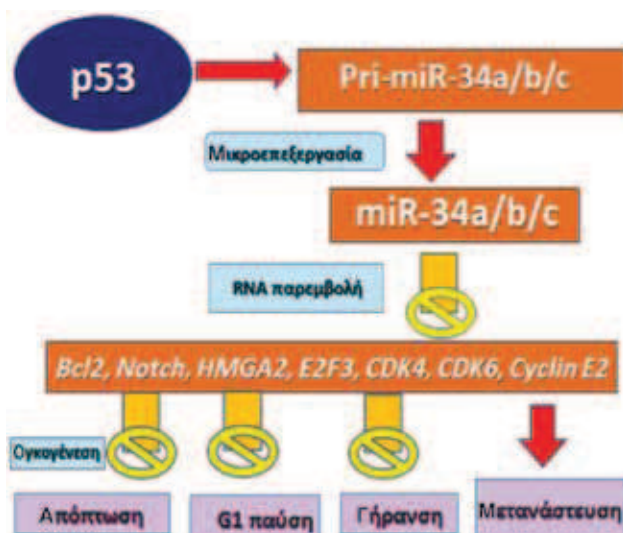
Τα miRNAs είναι πολύ σημαντικά τόσο για την ανάπτυξη των βλαστοκυττάρων, όσο και για την παθογένεση του καρκίνου. Έτσι, εντατικές έρευνες που λαμβάνουν χώρα τα τελευταία χρόνια αφορούν στο ρυθμιστικό ρόλο τους στην αυτο-ανανέωση, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων. Τα miRNAs δρουν τόσο ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, όσο και ως ογκογονίδια. Συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης miRNAs έχουν περιγραφεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Παρά το γεγονός ότι δεν είναι απολύτως σαφές αν η απορρυθμισμένη έκφραση των miRNAs είναι μια αιτία ή ένα αποτέλεσμα της καρκινικής κατάστασης, η σημασία των ρυθμιστικών αυτών μορίων στον καρκίνο είναι πλέον εμφανής.

Η πρώτη ένδειξη για εμπλοκή των miRNAs στον καρκίνο του ανθρώπου περιγράφεται στις μελέτες των Calin et al.^{3,4} Κατά την αναζήτηση κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (chronic lymphocytic leukemia, CLL) σε μια έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14, βρέθηκε ότι η μικρή περιοχή της έλλειψης κωδικοποιεί δύο miRNAs, το miR-15a και το miR-16-1. Ανάλυση της έκφρασής τους σε δείγματα CLL και φυσιολογικά CD5+ λεμφοκύτταρα αποκάλυψε ότι η υποέκφραση των δύο miRNAs που μοιράζονται ένα πρόδρομο μετάγραφο συνδυάζεται διαρκώς με την έλλειψη στην περιοχή 13q14. Αυτό υποδεικνύει τον ογκοκατασταλτικό ρόλο των miR-15a και miR-16-1. Μεταγενέστερες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την εμπλοκή των miRNAs στην παθολογία του καρκίνου του ανθρώπου.

Για τα miRNAs που δρουν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, ελαττωμένη έκφρασή τους στα καρκινικά βλαστοκύτταρα οδηγεί σε ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτά τα miRNAs φυσιολογικά ρυθμίζουν την απόπτωση, τη διαφοροποίηση και την αυτο-ανανέωση. Ένα παράδειγμα τέτοιων μορίων είναι η οικογένεια miRNA-34 (miR-34), που αποτελείται από τα miR-34-a, b και c, με υποέκφραση σε πολλούς καρκίνους. Η εμπλοκή των συγκεκριμένων μορίων

στην καρκινογένεση φαίνεται στην εικόνα 3. Αποκατάσταση της έκφρασης των miRNAs αυτής της οικογένειας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου ή παγκρέατος που έχουν απαλοιφή του *p53* οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση και σε απόπτωση. Τα εν λόγω αποτελέσματα δείχνουν την πιθανή σχέση του miRNA-34 με τη λειτουργία του *p53*. Πράγματι, σε κυτταρικές σειρές και ιστούς ποντικού, το *p53* ρυθμίζει την έκφραση και των τριών miRNAs της οικογένειας miRNA-34 και αυτό οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης μιας ομάδας γονιδίων-στόχων που φυσιολογικά υποστηρίζουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω αναστολής της απόπτωσης, της προόδου του κυτταρικού κύκλου, της αναστολής της κυτταρικής γήρανσης και της προώθησης της μετανάστευσης κυττάρων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι φυσιολογικά το *p53* επάγει την είσοδο του κυττάρου σε κατάσταση ηρεμίας μέσω της ενεργοποίησης του γονιδίου-αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, *p21*. Παρ' όλα αυτά, το miR-34 μπορεί να επάγει παύση του κύκλου στην G1 φάση ανεξάρτητα από το *p21* σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους. Λόγω της ρύθμισης και της λειτουργίας τους, τα μέλη της οικογένειας miR-34 έχουν πιθανόν μια σημαντική επίδραση στην ογκοκατασταλτική λειτουργία του *p53*.

Λόγω του γεγονότος ότι το *p53* βρίσκεται μεταλλαγμένο σε ποσοστό >50% των καρκίνων του ανθρώπου, τα miRNAs της οικογένειας miR-34 συχνά υποεκφράζονται στους όγκους. Ωστόσο, ανεξάρτητα από αυτό το γεγονός, η αφθονία τους μπορεί επίσης να επηρεαστεί στο επίπε-



Εικόνα 3. Τα μέλη της οικογένειας miR-34 λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Το *p53* προωθεί την έκφρασή τους και αυτά αναστέλλουν την έκφραση των γονιδίων *notch*, *hmg2*, *cdk4*, *cdk6*, *cyclin E2*, *bcl-2* και *E2F3* και με αυτόν τον τρόπο αποτρέπουν την ογκογόνο δράση των εν λόγω γονιδίων.

δο του γονιδιώματος. Στα γονιδιώματα σπονδυλοζώων, ένας γενετικός τόπος κωδικοποιεί το miR-34a και ένας δεύτερος τα miR-34b και miR-34c. Ακόμη και μεταξύ των πιο συγγενικών ειδών υπάρχει χαμηλή συντηρητικότητα των συγκεκριμένων γονιδίων, με εξαίρεση τις περιοχές που κωδικοποιούν τα miRNAs και τις πλησιέστερες στον υποκινητή μικρού μήκους περιοχές, αυτές δηλαδή όπου προσδένεται το *p53*. Το γονίδιο του miR-34a χάνεται στο νευροβλάστωμα και στους όγκους του παγκρέατος. Παρόμοια, απορρυθμισμένη έκφραση των miR-34b και miR-34c έχει παρατηρηθεί σε ένα υποσύνολο περιπτώσεων μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Το miR-34a στοχεύει το mRNA ενός πολύ σημαντικού μεταγραφικού παράγοντα, του E2F3, ο οποίος προσδένεται ειδικά στην πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, *pRb*. Αυτή η πρόσδεση εξαρτάται από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου και προκαλεί την παραγωγή πρωτεϊνών που διαδραματίζουν ρόλο στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση του DNA και στην αντιγραφή. Μείωση των επιπέδων του E2F3 με τεχνητή αύξηση των επιπέδων του miR-34 σε πρωτογενή νευροβλαστώματα παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ενεργοποιεί τα μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου. Όλα αυτά τα πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που κατέχει το miR-34 ως ογκοκατασταλτικό μόριο.

Η οικογένεια miR-34 αναστέλλει επίσης την έκφραση των γονιδίων *notch*, *hmg2*, *cdk4*, *cdk6*, *cyclin E2* και *bcl-2*, τα οποία εμπλέκονται στην αυτο-ανανέωση και την επιβίωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων αφού επιδρούν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση και στην επιδιόρθωση του DNA. Το *bcl-2* βρίσκεται υπερεκφρασμένο στην πλειονότητα των καρκίνων του ανθρώπου και αυτή η υπερέκφρασή του συσχετίζεται με ανθεκτικότητα των καρκινικών βλαστοκυττάρων στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοβολία. Το *bcl-2* προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες μέσω παρεμπόδισης της απόπτωσης.

Η αποκατάσταση των επιπέδων των miR-34 σε καρκίνους του παγκρέατος και του γαστρεντερικού σωλήνα καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στη χημειοθεραπεία, αναχαιτίζει την ανάπτυξη του όγκου και εμποδίζει το σχηματισμό ογκοσφαιρίων. Παρ' όλα αυτά, η λειτουργία της καταστολής του όγκου μέσω της τεχνητής αύξησης των επιπέδων των miR-34 φαίνεται να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Έτσι, ενώ η αποκατάσταση της έκφρασης των miR-34 έχει οδηγήσει σε παύση του κυτταρικού κύκλου ή σε γήρανση σε ορισμένες μελέτες, σε άλλες έχει προκαλέσει απόπτωση. Επίσης, μειωμένη απόπτωση έχει παρατηρηθεί με εξάλειψη ή αναστολή των miR-34. Συνεπώς, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για την πλήρη κατανόηση της επίδρασης των

miRNAs της οικογένειας miR-34 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους λόγω της τεράστιας πολυπλοκότητας των μονοπατιών που στοχεύονται.

Η απορρύθμιση των miRNAs μπορεί να λειτουργήσει και προς την αντίθετη κατεύθυνση στον καρκίνο. Η οικογένεια miR-17-92 είναι η πιο καλά μελετημένη σε αυτή την κατηγορία.⁵ Η οικογένεια περιλαμβάνει 14 ομόλογα miRNAs που κωδικοποιούνται από τρεις ομάδες γονιδίων στα χρωμοσώματα 7, 13 και X. Η ομάδα στο χρωμόσωμα 13 εμφανίζεται σε περισσότερα του ενός αντιγράφου στα λεμφώματα των Β-κυττάρων του ανθρώπου, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση πολλών miRNAs. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η υπερέκφραση της ομάδας miR-17-92 συνδυάζεται με το *myc* για επιτάχυνση της ανάπτυξης του όγκου σε ένα μοντέλο λεμφώματος των Β-κυττάρων στον ποντικό· επομένως, δρα ως ογκογονίδιο. Έχει αναφερθεί ότι η μεταγραφή της σχετικής ομάδας miRNAs επάγεται από το ίδιο το *myc*.

Ένα ακόμη σημαντικό παράδειγμα ογκογόνου miRNA είναι το miR-155. Άμεσες ενδείξεις της ογκογόνου δράσης του προέρχονται από μελέτες ενός μοντέλου διαγονιδιακών ποντικών με υπερέκφραση αυτού του miRNA στα Β-κύτταρα. Αντίστοιχα με αυτά που έχουν παρατηρηθεί στα λεμφώματα των Β-κυττάρων του ανθρώπου, τα ποντίκια εμφανίζουν προλευχαιμική πολυκλωνική επέκταση των πρόδρομων Β-κυττάρων που ακολουθείται από ανάπτυξη κακοήθειας. Από αυτά τα *in vivo* δεδομένα καθίσταται κατανοητή η άμεση εμπλοκή ενός miRNA στον κακοήγη μετασχηματισμό.

4.2. Μηχανισμοί απορρύθμισης των miRNAs στον καρκίνο

Τα απορρυθμισμένα επίπεδα έκφρασης των miRNAs είναι ο κύριος μηχανισμός που προκαλεί την απώλεια ή την αυξημένη λειτουργία τους στα καρκινικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι το *Myc*, αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό μηχανισμό για την αλλαγή της έκφρασης των miRNAs. Γονιδιακές ανωμαλίες μπορούν επίσης να τροποποιήσουν την έκφραση των miRNAs, καθώς η υπερέκφραση των miRNAs έχει συσχετιστεί με γονιδιακή ενίσχυση ενώ η υποέκφρασή τους με χρωμοσωμικές ελλείψεις, σημειακές μεταλλάξεις και απορρυθμισμένη μεθυλίωση υποκινητών.

Αρκετά παραδείγματα miRNAs, των οποίων η έκφραση έχει απορρυθμιστεί σε καρκίνο του ανθρώπου, έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα. Ανάμεσά τους συναντάται η περίπτωση της υποέκφρασης των miR-143, miR-145 και των μελών της οικογένειας let-7. Τα miR-143 και miR-145,

που βρίσκονται σε μια περιοχή του γονιδιώματος παρόμοια με αυτή που κωδικοποιεί τα miR-15a και miR-16-1, παρουσιάζουν σημαντική υποέκφραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε σύγκριση με το γειτονικό φυσιολογικό βλεννογόνο. Η οικογένεια let-7 υποεκφράζεται σε ποσοστό >50% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, καθώς και σε άλλες νεοπλασίες.

Αντίθετα, ένα παράδειγμα υπερέκφρασης miRNAs είναι το miR-155, το οποίο βρίσκεται στη μοναδική φυλογενετικά συντηρημένη αλληλουχία του *bic*, ενός γονιδίου που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη. Αυτό ανακαλύφθηκε ως θέση εισχώρησης του προϊού σε λεμφώματα επαγόμενα από τον ιό ALV (avian leucosis virus). Το miR-155 και το πρόδρομο μετάγραφο του *bic* υπερεκφράζονται στο λέμφωμα Hodgkin, στο λέμφωμα Burkitt και στο διάχυτο μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα των Β-κυττάρων. Ένα άλλο παράδειγμα υπερεκφραζόμενων miRNAs είναι το miR-21 που βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 17q23, μια περιοχή που συχνά είναι ενισχυμένη στον καρκίνο του μαστού και το γλοιοβλάστωμα.

Ένας ιδιαίτερος μηχανισμός που συνδέει τα miRNA με τον καρκίνο αποκαλύφθηκε από την ανάλυση της χρωμοσωμικής μετατόπισης t(8;17) στη λευχαιμία των Β-κυττάρων, στην οποία το ρυθμιστικό στοιχείο του miR-142 είναι δίπλα στο πρωτο-ογκογονίδιο *myc*. Εδώ, ένα ρυθμιστικό στοιχείο ενός miRNA λειτουργεί ως ενεργοποιητής του πρωτο-ογκογονιδίου. Αν και προς το παρόν ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να είναι μοναδικός, δεδομένων των υψηλών επιπέδων και της ειδικής ανά ιστό έκφρασης ορισμένων miRNAs, φαίνεται ωστόσο να είναι ένας μηχανισμός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης όσον αφορά στις γονιδιακές μετατοπίσεις σε καρκίνο του ανθρώπου που δεν έχουν συσχετιστεί ακόμη με τα υπεύθυνα γονίδια.

4.3. Μονοπάτια που επηρεάζονται από την απορρύθμιση των miRNAs στον καρκίνο

Αρκετές μελέτες έχουν αρχίσει να καθιερώνουν τις μοριακές συσχετίσεις μεταξύ της υποέκφρασης των miRNAs και του κακοήθους μετασχηματισμού. Όπως προαναφέρθηκε, τα miR-15a και miR-16-1 λειτουργούν ως ρυθμιστές της αντιαποπτωτικής ογκοπρωτεΐνης BCL2.⁶ Αυτά τα miRNAs κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία βρίσκονται σε χρωμοσωμικές περιοχές που παρουσιάζουν έλλειψη σε ποσοστό >50% των περιπτώσεων CLL. Στη λευχαιμική κυτταρική σειρά MEG-01, η έκφραση των δύο αυτών μορίων οδηγεί σε υποέκφραση του γονιδίου *bcl2* και αυξημένη απόπτωση. Επομένως, η απώλεια της έκφρασής τους οδηγεί σε απώλεια ελέγχου της έκφρασης του *bcl2* και άρα ενδεχομένως σχετίζεται με την παθολογία της CLL. Πράγματι,

το *bcl2* υπερεκφράζεται στη CLL. Παρ' όλα αυτά, αντίθετα από το οζώδες λέμφωμα, η ενεργοποίησή του συσχετίζεται με τη μετατόπιση στην περιοχή που κωδικοποιεί τα IgH. Η ενεργοποίηση του *bcl2* στη CLL φαίνεται να συνδέεται, τουλάχιστον εν μέρει, με τη μειωμένη έκφραση των miR-15a και miR-16-1.

Ένας μοριακός σύνδεσμος μεταξύ της απορρύθμισης των miRNAs και του καρκίνου έχει επίσης βρεθεί για μέλη της οικογένειας *let-7* που ρυθμίζουν τα ογκογονίδια *ras*. Η 3'UTR περιοχή του γονιδίου *ras* περιέχει πολλές θέσεις πρόσδεσης των μελών της οικογένειας *let-7*. Η ενισχυμένη έκφραση των *let-7* σε καρκινικά κύτταρα του ανθρώπου μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Ras. Καθώς το *let-7* υποεκφράζεται σε αρκετούς καρκίνους του ανθρώπου, ο εν λόγω μηχανισμός θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του Ras μονοπατιού. Η σημασία της υποέκφρασης του συγκεκριμένου miRNA στον καρκίνο υποστηρίζεται από αρκετές ερευνητικές μελέτες που έδειξαν ότι το *let-7* καταστέλλει την ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς A549 από καρκίνο του πνεύμονα και της κυτταρικής σειράς DLD-1 από καρκίνο του παχέος εντέρου *in vitro*.

Τα miR-125a/b υποεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού. Αυτά τα δύο miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση των υποδοχέων των κινασών τυροσίνης *ErbB2* και *ErbB3*. Η έκτοπη υπερέκφραση των miR-125a ή miR-125b στα κύτταρα SK-BR-3 μειώνει την ανεξάρτητη από πρόσφυση σε υπόστρωμα ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς και την ικανότητα μετανάστευσης και διήθησής τους. Η καταστολή των συγκεκριμένων καρκινικών ιδιοτήτων είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται όταν υποστεί σίγηση η σηματοδότηση από την κινάση *ErbB*.

Η υπόθεση ότι τα υπερεκφραζόμενα miRNAs δρουν ως ογκογονίδια υποστηρίζεται και από τις μελέτες σε *in vivo* μοντέλα. Ανάμεσα σε αυτά, συναντάται το μοντέλο των διαγονιδιακών ποντικών (miR-155) που εμφανίζουν προλευχαιμική πολυκλωνική επέκταση των πρόδρομων B-κυττάρων, η οποία ακολουθείται από κακοήθεια των B-κυττάρων, και τα διαγονιδιακά (miR-17-92) με λέμφωμα επίσης των B-κυττάρων. Αυτά τα λεμφώματα χαρακτηρίζονται από την απουσία απόπτωσης, που δείχνει ότι πολλά μέλη της ομάδας miR-17-92 ρυθμίζουν κάποιο προαποπτωτικό γονίδιο. Δύο miRNAs που κωδικοποιούνται από την ομάδα, τα miR-17-5p και miR-20a,⁷ καταστέλλουν την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1. Ο παράγοντας αυτός προάγει τον κυτταρικό κύκλο αλλά επίσης αποτελεί και έναν ισχυρό επαγωγέα της απόπτωσης. Η απουσία απόπτωσης μπορεί να σχετίζεται με τον ισχυρό έλεγχο του E2F1 από την οικογένεια miR-17. Πιο πρόσφατες αναφορές αποκαλύπτουν ότι οι E2F1, E2F2 και E2F3 προσδένονται στον υποκινητή

της ομάδας miR17-92, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή της, ενώ το miR-20a, ένα μέλος της ομάδας, τροποποιεί τη μετάφραση των mRNAs των E2F2 και E2F3. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός βρόχου αρνητικής ανάδρασης, η οποία περιλαμβάνει τα miR-20a και E2F και προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από την υπερβολική έκφραση του E2F. Στους συμπαγείς όγκους του ανθρώπου έχει παρατηρηθεί έκτοπη έκφραση του miR-17 στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ σε πειράματα διαμόλυνσης *in vitro* η υπερέκφραση του miR-17 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από καρκίνο του πνεύμονα. Η υπερέκφραση του miR-17-92 οδηγεί σε αυξημένη αγγειογένεση στον όγκο,⁹ μια διαδικασία που συνοδεύεται από υποέκφραση των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων θρομβοσπονδίνη 1 (Tsp1) και του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού (CTGF) που έχουν προβλεφθεί ως στόχοι των miRNAs της ομάδας.⁹

Η επιμόλυνση καλλιεργημένων κυττάρων γλοιοβλαστώματος και καρκίνου του μαστού με αντι-miRNAs ολιγονουκλεοτίδια (anti-miRNA oligos, AMOs) που στοχεύουν το miR-21 καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη *in vitro* και αυτό φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα απόπτωσης. Το miR-21 υπερεκφράζεται στο χολαγγειοκαρκίνωμα,¹⁰ ενώ η καταστολή του από τα AMOs αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στο χημειοθεραπευτικό παράγοντα γεμισαταβίνη.

Τελευταία, δείχθηκε ότι τα miR-372 και miR-373 συνεργάζονται με τα ογκογονίδια *ras* για το μετασχηματισμό των κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες.¹¹ Τα πρωτογενή κύτταρα υφίστανται παύση ανάπτυξης και γήρανση ως απόκριση στα μιτογόνα ερεθίσματα από ογκογονίδια, όπως το *ras*, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού του *p53*. Αυτή η απόκριση αντιστρέφεται παρουσία μη λειτουργικού *p53*. Η υπερέκφραση των miR-372 και miR-373 είναι επαρκής για το μετασχηματισμό των κυττάρων ακόμη και παρουσία του φυσιολογικού *p53*. Τα δύο αυτά miRNAs διαφεύγουν του μονοπατιού του *p53* που ενεργοποιείται από τα ογκογονίδια αλλά όχι και της εξαρτώμενης από το *p53* απόκρισης σε βλάβες του DNA, ένα χαρακτηριστικό των όγκων των γεννητικών κυττάρων των όρχεων (TGCT). Η ομάδα miR-371/373 εκφράζεται στις περισσότερες περιπτώσεις των TGCT, σε αντίθεση με άλλους τύπους όγκων, όπου δεν παρατηρείται το φαινόμενο αυτό. Το εν λόγω γεγονός δείχνει ότι αυτή η ομάδα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου.

4.4. Πώς πολλά miRNAs εμπλέκονται στον καρκίνο;

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η εμπλοκή των miRNAs στον καρκίνο είναι πολύ πιο εκτενής απ' ό,τι αρχικά πιστευόταν.

Αρχικά στοιχεία προήλθαν από την παρατήρηση ότι περίπου το 50% των γνωστών miRNAs βρίσκονται σε περιοχές του DNA όπου παρατηρούνται συχνά ελλείψεις ή ενισχύσεις στον καρκίνο του ανθρώπου. Περισσότερες ενδείξεις γι' αυτό προέρχονται από μελέτες έκφρασης που αφορούν σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Μελέτες που αφορούν σε ολόκληρο το microRNAωμα σε συμπαγείς όγκους ή αιματολογικές κακοήθειες στον άνθρωπο έχουν αποκαλύψει διαφορές στην έκφραση των miRNAs μεταξύ νεοπλασματικών και φυσιολογικών ιστών. Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι κάθε νεοπλασία έχει ένα διακριτό προφίλ έκφρασης των miRNAs που διαφέρει από αυτό των άλλων νεοπλασιών και από τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Στον πίνακα 1 παρατίθεται ένας εκτενής κατάλογος από miRNAs, που απορρυθμίζονται σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, καθώς και το είδος της απορρύθμισης που υφίστανται, αντίστοιχα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η απορρύθμιση που επικρατεί στον καρκίνο λειτουργεί προς μία κατεύθυνση, δηλαδή είτε προς την υπερέκφραση είτε προς την υποέκφραση ενός miRNA, γεγονός που καθιστά πολύ πιθανή την ύπαρξη ενός πολύ σημαντικού ρόλου του εκάστοτε miRNA στην ογκογένεση. Υπάρχουν, ωστόσο, μερικές ασυνήθιστες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, μέλη της οικογένειας miR-181 υπερεκφράζονται σε ορισμένους καρκίνους, όπως τα καρκινώματα του θυρεοειδούς, του παγκρέατος και του προστάτη, και υποεκφράζονται σε άλλους, όπως τα γλοιοβλαστώματα και τα αδενώματα της υπόφυσης. Δεδομένου του ρόλου του miR-181 στη διαφοροποίηση, αυτές οι εμφανείς αποκλίσεις ίσως αντανακλούν την αρχική κατάσταση διαφοροποίησης των νεοπλασματικών ιστών.

Υπάρχουν ακόμη παραδείγματα miRNAs που απορρυθμίζονται σε συγκεκριμένες νεοπλασίες: π.χ. το miR-122a, ένα ηπατοειδικό miRNA, υποεκφράζεται στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα,¹² ενώ τα miR-204 και miR-211 υπερεκφράζονται ειδικά στα ινσουλινώματα.¹³ Και σε αυτή την περίπτωση, τα ιστοειδικά απορρυθμισμένα miRNAs μάλλον αντανακλούν την κατάσταση διαφοροποίησης του κυττάρου.

Παρόμοιες έρευνες δείχνουν ότι μέλη της οικογένειας let-7,¹⁴ το miR-145,¹⁵ το miR-221,¹⁶ το miR-21¹⁷ και το miR-155¹⁸ εμφανίζουν ανώμαλη έκφραση σε αρκετούς καρκίνους.

4.5. Η έκφραση πολλών miRNAs που συνδέεται με τον καρκίνο τροποποιείται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα

Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι ένα σύνολο miRNAs επάγει την απόκριση στην υποξία,¹⁹ δηλαδή τη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου. Η υποξία, ένα χαρακτηριστικό

του νεοπλασματικού μικροπεριβάλλοντος που οδηγεί σε οξέωση και τοξικά αποτελέσματα, επιπρόσθετα απαιτεί γενετικές ή προσαρμοστικές φαινοτυπικές αλλαγές από το κύτταρο. Είναι σημαντικό ότι αρκετά miRNAs που αποκρίνονται στην υποξία υπερεκφράζονται σε πολλούς καρκίνους. Είκοσι από τα 23 συχνά υπερεκφραζόμενα στον καρκίνο miRNAs επάγονται από την υποξία. Από αυτό φαίνεται ότι η απόκριση στο οξειδωτικό stress είναι ένας από τους βασικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν την έκφραση των miRNAs στα καρκινικά κύτταρα. Το miR-21, ένα από τα miRNAs που επάγονται από την υποξία και υπερεκφράζονται στον καρκίνο, έχει αντι-αποπτωτικές ιδιότητες.²⁰ Η έκφρασή του ίσως αντιπροσωπεύει μια προσαρμογή σε υποξικό περιβάλλον που οδηγεί στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

4.6. miRNAs, βλαστοκύτταρα και καρκινικά βλαστοκύτταρα

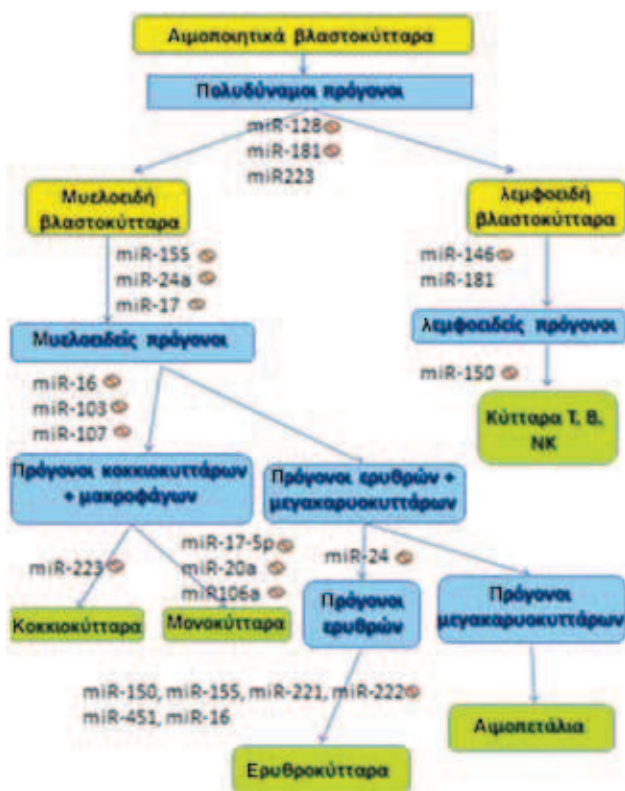
Τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα καρκινικά βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να διαιρούνται συμμετρικά, δίνοντας γένεση σε πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Μπορούν επίσης να διαιρούνται ασύμμετρα, δημιουργώντας ένα βλαστοκύτταρο και ένα προγονικό κύτταρο. Το τελευταίο υφίσταται διαφοροποίηση. Αυτή η ασύμμετρη διαίρεση διευκολύνει την υγιή ανάπτυξη στα φυσιολογικά κύτταρα, χάρη στην πολικότητα της κυτταρικής διαίρεσης. Όταν αυτή η πολικότητα χάνεται, τα βλαστοκύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και σχηματίζουν όγκο. Η αυτο-ανανέωση των βλαστοκυττάρων ελέγχεται από διακυτταρικούς μηχανισμούς, μέσω επικοινωνίας με τα γειτονικά κύτταρα (σηματοδότηση), και από ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς, μέσα από τη διαφορική γονιδιακή έκφραση που βρίσκεται κάτω από τον επιγενετικό, μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό έλεγχο. Για παράδειγμα, η πολικότητα της κυτταρικής διαίρεσης στα βλαστοκύτταρα των θηλαστικών ρυθμίζεται από πολλά γονίδια, περιλαμβανομένου του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Η απώλεια του γονιδίου p53 οδηγεί σε περισσότερες συμμετρικές διαιρέσεις,²¹ γεγονός που βοηθάει στην ανάπτυξη του όγκου. Σε μη ογκογονικά κύτταρα, τα επίπεδα των ρυθμιστικών miRNAs είναι γενικά χαμηλότερα στα λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα (π.χ. βλαστικά κύτταρα). Στα βλαστοκύτταρα των ενηλίκων, τα miRNAs ελέγχουν την αιμοποίηση, τη μυογένεση, την καρδιογένεση, τη διαφοροποίηση των αστροκυττάρων και των νευρώνων, τη διαφοροποίηση των οστεοκυττάρων και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του δέρματος. Καθώς τα miRNAs διαδραματίζουν σπουδαίο ρυθμιστικό ρόλο στη φυσιολογική διαφοροποίηση, η απορρύθμιση στην έκφρασή τους θα μπορούσε να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές μέσα στο κύτταρο, οι οποίες συμβάλλουν στο μετασχηματισμό τους.

Πίνακας 1. Στην πρώτη στήλη φαίνονται τα απορρυθμισμένα miRNAs, στη δεύτερη αν το εκάστοτε miRNA υπερ- ή υπο-εκφράζεται (↑ ή ↓, αντίστοιχα) και στην τρίτη ο τύπος του καρκίνου όπου συμβαίνει η απορρύθμιση.

miRNA	Καρκινικά έναντι φυσιολογικών	Τύπος νεοπλασματος
let-7-a-2	↓	Καρκίνος μαστού, πνεύμονα, ήπατος
let-7-a-3	↓	Καρκίνος μαστού, ήπατος
let-7d	↓	Καρκίνος μαστού, ήπατος
let-7f	↓	Καρκίνος μαστού, ήπατος, θυρεοειδούς
miR-101	↓	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού, αδένωμα υπόφυσης
miR-102	↑	Καρκίνος μαστού, θυρεοειδούς
miR-124a	↓	Καρκίνος πνεύμονα, ήπατος, αδένωμα υπόφυσης
miR-125a	↓	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού
miR-125b-1	↓	Καρκίνος μαστού
miR-125b-1	↑	Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-125b-2	↓	Καρκίνος μαστού
miR-125b-2	↑	Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-140	↓	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού, θυρεοειδούς αδένωμα υπόφυσης
miR-141	↓	Καρκίνος ήπατος, θυρεοειδούς
miR-142	↓	Καρκίνος ήπατος, αδένωμα υπόφυσης
miR-143	↓	Καρκίνος μαστού, πνεύμονα, ήπατος
miR-145	↓	Καρκίνος μαστού, πνεύμονα, ήπατος
miR-146	↑	Καρκίνος πνεύμονα, θυρεοειδούς
miR-150	↑	Καρκίνος πνεύμονα, αδένωμα υπόφυσης
miR-155	↑	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού, θυρεοειδούς, λέμφωμα
miR-15b	↓	Καρκίνος θυρεοειδούς, αδένωμα υπόφυσης
miR-181a	↓	Καρκίνος ήπατος
miR-181a	↑	Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-181b	↓	Γλοιοβλάστωμα, αδένωμα υπόφυσης
miR-181c	↓	Καρκίνος ήπατος, γλοιοβλάστωμα
miR-181c	↑	Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-191	↑	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού, αδένωμα υπόφυσης
miR-192	↑	Καρκίνος πνεύμονα, αδένωμα υπόφυσης
miR-198	↓	Καρκίνος πνεύμονα, γλοιοβλάστωμα
miR-199b	↓	Καρκίνος πνεύμονα, ήπατος
miR-202	↑	Καρκίνος μαστού, θυρεοειδούς
miR-203	↑	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού
miR-21	↑	Καρκίνος μαστού, πνεύμονα, θυρεοειδούς, γλοιοβλάστωμα
miR-210	↑	Καρκίνος πνεύμονα, μαστού
miR-212	↑	Καρκίνος πνεύμονα, αδένωμα υπόφυσης
miR-213	↑	Καρκίνος μαστού, θυρεοειδούς
miR-219-1	↓	Καρκίνος πνεύμονα, θυρεοειδούς
miR-220	↓	Καρκίνος πνεύμονα
miR-220	↑	Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-221	↑	Γλοιοβλάστωμα, καρκίνος ήπατος, θυρεοειδούς
miR-222	↑	Καρκίνος θυρεοειδούς
miR-24-2	↑	Καρκίνος πνεύμονα, θυρεοειδούς

Ένα εκτενώς μελετημένο μοντέλο για τη ρυθμιζόμενη από miRNAs διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων, το οποίο παρουσιάζεται στην εικόνα 4, είναι τα κύτταρα του αίματος. Τα φυσιολογικά αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε αρκετούς κυτταρικούς τύπους μέσω της μυελογενούς και της λεμφοειδούς σειράς και συγκεκριμένα τα miRNAs φαίνεται να ρυθμίζουν διάφορα στάδια της διαφοροποίησης.² Κατά τη φυσιολογική αιμοποίηση, τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα που έχουν υποστεί αυτο-ανανεωτικές διαιρέσεις για πολύ καιρό διαιρούνται στα βραχύβια αντίστοιχά τους κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια δίνουν γένεση στα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα. Αυτά διαφοροποιούνται σε λεμφικά ή σε μυελικά βλαστοκύτταρα. Το συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης αναστέλλεται από τα miR-128a και miR-181a, αλλά ενεργοποιείται από το miR-223. Επίσης, η διαφοροποίηση των λεμφικών βλαστοκυττάρων σε βλαστικά προγονικά κύτταρα αναστέλλεται από το miR-146 και ενεργοποιείται από το miR-181. Τα λεμφικά προγονικά κύτταρα στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε T-, B-λεμφοκύτταρα και σε φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer cells, NK).

Η διαφοροποίηση προς T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιείται



Εικόνα 4. Καθοδήγηση της διαφοροποίησης των κυττάρων του αίματος από τα miRNAs. Όπως είναι εμφανές, σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης εμπλέκονται πολλά miRNAs, όπου το καθένα προάγει ή αναστέλλει την πρόοδό της.

από το miR-150. Από την άλλη πλευρά, η διαφοροποίηση των μυελικών βλαστοκυττάρων προς μυελικά προγονικά κύτταρα αναστέλλεται από τα miR-155, miR-24a και miR-17. Τα μυελικά προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται είτε προς προγονικά κύτταρα κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων (μια διαδικασία που αναστέλλουν τα miR-16, miR-103 και miR-107), είτε προς προγονικά κύτταρα μεγακαρυοκυττάρων και ερυθροκυττάρων. Η διαφοροποίηση των προγόνων των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων σε κοκκιοκύτταρα αναστέλλεται από το miR-223, ενώ η διαφοροποίηση προς μονοκύτταρα εμποδίζεται από τα miR-17-5p, miR-20a και miR-106a.

Τα προγονικά κύτταρα των μεγακαρυοκυττάρων και των ερυθρών διαφοροποιούνται σε προγόνους των μεγακαρυοκυττάρων που αναπτύσσονται σε αιμοπετάλια, ή σε προγόνους των ερυθροκυττάρων, ο σχηματισμός των οποίων παρεμποδίζεται από το miR-24. Τα προγονικά κύτταρα των ερυθροκυττάρων διαφοροποιούνται και δίνουν ερυθροκύτταρα μέσω ενεργοποίησης από τα miR-451 και miR-16, ενώ η διαδικασία αναστέλλεται από τα miR-150, miR-155, miR-221 και miR-222.

Όπως και τα μη ογκογονικά βλαστοκύτταρα, τα καρκινικά βλαστοκύτταρα περιέχουν χαμηλά επίπεδα miRNAs, αλλά είναι ακόμη άγνωστο αν αυτό είναι αίτιο ή αποτέλεσμα της κατάστασης της διαφοροποίησης. Μερικά miRNAs καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό σε διαφοροποιημένα κύτταρα μέσω ογκοκατασταλτικών μονοπατιών, κάτι που υποδηλώνει ότι τα miRNAs είναι η αιτία για την κατάσταση της διαφοροποίησης. Από την άλλη πλευρά, ειδικά miRNAs που είναι χαρακτηριστικά των βλαστοκυττάρων των φυσιολογικών ιστών υπάρχουν στις ίδιες ποσότητες στα καρκινικά βλαστοκύτταρα. Παρ' όλα αυτά, τα απορρυθμισμένα επίπεδα έκφρασης των miRNAs, που περιλαμβάνει υπερέκφραση ορισμένων και υποέκφραση ή έλλειψη άλλων, έχουν εντοπιστεί στα καρκινικά βλαστοκύτταρα. Συγκεκριμένοι καρκίνοι έχουν ειδικά προφίλ έκφρασης των miRNA και ειδικές μεμβρανικές πρωτεΐνες ως επιφανειακούς δείκτες. Οι δείκτες της κυτταρικής επιφάνειας των καρκινικών βλαστοκυττάρων έχουν χαρακτηριστεί –σε σύγκριση με το προφίλ έκφρασης άλλων κυττάρων μέσα στον όγκο– για πολλούς καρκινικούς τύπους, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η οξεία μυελοειδής λευχαιμία, το πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα, οι εγκεφαλικοί όγκοι, ο καρκίνος του μαστού, το σάρκωμα των οστών, η χρόνια μυελοειδής λευχαιμία, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, το πλακώδες καρκίνωμα της κεφαλής και του τραχήλου, οι καρκίνοι του πνεύμονα, το μεταστατικό μελάνωμα, ο καρκίνος του παγκρέατος και ο καρκίνος του προστάτη. Με αυτή τη γνώση, οι θεραπείες πρέπει να στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα, ειδικά τα καρκινικά βλαστοκύτταρα

(cancer stem cells, CSCs). Προκειμένου να αναπτυχθούν θεραπευτικές εφαρμογές που στοχεύουν τα καρκινικά βλαστοκύτταρα (CSCs), ο λειτουργικός ρόλος των miRNAs σε κάθε τύπο καρκίνου πρέπει να αποσαφηνιστεί.

5. ΤΑ miRNAs ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ

Δεδομένων των ευρημάτων τα οποία έχουν προέλθει μέσα από την έρευνα που έχει διενεργηθεί, η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs μπορεί, προφανώς, να επηρεάσει τον καρκινικό φαινότυπο. Έτσι, συγκεκριμένα προφίλ έκφρασης των miRNAs μπορούν να αποκαλύψουν τις διακριτές υποκατηγορίες μορφών του καρκίνου. Πράγματι, αυτό συμβαίνει σε αρκετές περιπτώσεις.²² Για παράδειγμα, υψηλά επίπεδα miR-155 εμφανίζονται πιο συχνά στο διάχυτο λέμφωμα των μεγάλων Β-κυττάρων²³ με ενεργοποιημένο φαινότυπο των Β-κυττάρων παρά σε περιπτώσεις με φαινότυπο βλαστικού κέντρου. Επειδή οι ασθενείς με διάχυτο λέμφωμα των μεγάλων Β-κυττάρων με ενεργοποιημένο φαινότυπο των Β-κυττάρων έχουν κακή πρόγνωση, ίσως η ποσοτικοποίηση του miR-155 να φανεί κλινικά χρήσιμη. Παρόμοια, η υποέκφραση του let-7 στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα συσχετίζεται με κακή πρόγνωση και ελαττωμένη μετεγχειρητική επιβίωση.²⁴ Τέλος, έχει βρεθεί ότι το προφίλ έκφρασης 13 miRNAs σχετίζεται με την εξέλιξη της CLL στον άνθρωπο.

6. ΜΙΚΡΑ RNAs ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Τα θεραπευτικά miRNAs μπορούν να εισαχθούν στα καρκινικά κύτταρα με στόχο την επιδιόρθωση των επιπέδων των απορρυθμισμένων miRNAs, προκειμένου να επιτευχθεί η αναστροφή κάποιων από τις ιδιότητες των εν λόγω κυττάρων. Αυτές οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύουν στη σίγηση των ογκογονιδίων μετα-μεταγραφικά, μέσω του μονοπατιού της RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi).²⁵ Σε αυτή τη διαδικασία, ένα μικρό μόριο RNA προκαλεί αποδόμηση ενός συμπληρωματικού του mRNA. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν τα ενδογενή miRNAs για RNAi. Η θεραπευτική RNAi τεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με δύο τρόπους, κάνοντας χρήση (α) του συνθετικού μικρού RNA (small interfering RNA, siRNA) και (β) της δομής μίσχου-βρόχου μικρού μήκους επάνω σε φορέα (short hairpin RNA, shRNA).

Τα siRNAs, όπως και τα miRNAs, είναι δίκλινα μόρια μήκους 21–23 νουκλεοτιδίων, περιλαμβάνουν προεξοχές δύο νουκλεοτιδίων στα 3' άκρα και μπορούν να ενσωματωθούν άμεσα στο RISC. Τα shRNAs εισάγονται σε φορείς, επομένως συντίθενται στον πυρήνα όπως τα miRNAs. Πρόκειται για

δομές μίσχου-θηλιάς, που υφίστανται την ίδια επεξεργασία με τα miRNAs, περιλαμβανομένης της πέψης από την Dicer πριν από την ενσωμάτωση στο RISC. Οι θεραπείες με μικρά μόρια RNA εμφανίζουν πρακτικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Το siRNA υφίσταται εύκολα χημική τροποποίηση, όμως η μαζική παραγωγή αυτών των σύνθετων δομών είναι πολύ δαπανηρή. Αντίθετα, τα shRNAs είναι δύσκολο να τροποποιηθούν αλλά εύκολο να παραχθούν σε ποσότητες. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν μέθοδοι για τροποποιήσεις των shRNA που περιλαμβάνουν αλλαγή της ενσωματωμένης αλληλουχίας, μεταβολή της ρύθμισης του υποκινητή, χρήση διαφορετικών πλασμιδιακών και ιικών φορέων για την επιμόλυνση των κυττάρων και ρύθμιση ή επαγωγή της έκφρασης των shRNAs. Τόσο τα siRNAs όσο και τα shRNAs παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα *in vivo*.

Η τεχνολογία του RNAi έχει αυξήσει τη δυναμική των στοχευόμενων θεραπειών. Αρκετές μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα του RNAi και ορισμένες θεραπείες με βάση το RNAi περνούν τον έλεγχο των κλινικών δοκιμών για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η αποτελεσματικότητα των siRNAs και των shRNAs εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων, όπως (α) η παράκαμψη της ανοσιακής απόκρισης, (β) η αναποτελεσματικότητα της σίγησης των μορίων-στόχων και (γ) οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες, λόγω του περίπλοκου και όχι πλήρως αποσαφηνισμένου ρόλου που διαδραματίζουν τα εκάστοτε μετάγραφο-στόχοι στα βιοχημικά μονοπάτια. Τα siRNAs με μήκος μεγαλύτερο από 29–30 νουκλεοτιδία επάγουν μια ανοσιακή απόκριση με ιντερφερόνη ανάλογη με αυτή που προκαλεί το δίκλινο RNA (dsRNA). Το φαινόμενο περιορίζεται με μείωση του μήκους του siRNA ή με χημική τροποποίηση. Τόσο τα siRNAs όσο και τα shRNAs ενεργοποιούν τους υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) και την ανοσιακή απόκριση.²⁶ Αυτό μπορεί να εξαιρεθεί με τη χρήση μικρών πλασμιδιακών φορέων ή μη μεθυλιωμένων πλασμιδιακών φορέων χωρίς CpG. Το siRNA, ακόμη κι όταν προστατεύεται μέσω χημικών τροποποιήσεων, είναι ευάλωτο σε αποδόμηση και μεταβολικές διαδικασίες. Ενώ το shRNA παρουσιάζει τις επιθυμητές στοχευόμενες δράσεις, όταν είναι παρόν σε <5 αντίγραφα, το siRNA απαιτεί δόσεις σε κλίμακα nanomolar για τα ίδια αποτελέσματα. Αυτό είναι απόρροια του γεγονότος ότι το shRNA συντίθεται συνεχώς, παράγοντας λιγότερο παροδικά αποτελέσματα.

Από την άλλη πλευρά, θεραπείες που βασίζονται στο RNAi έχουν πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση οδηγώντας σε μη επιθυμητούς φαινότυπους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τέτοια μικρά RNAs μπορούν να προσδεθούν σε μετάγραφο mRNA με μερική συμπληρωματικότητα. Τα siRNAs, όπως

και τα miRNAs, έχουν μια αλληλουχία seed region (SR) από το 2ο–8ο νουκλεοτίδιο που είναι συμπληρωματικό με το 3' άκρο του mRNA. Χημικές τροποποιήσεις, ειδικά στη θέση 2, μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την ειδικότητα στόχευσης. Ωστόσο, η μεγάλη δόση siRNAs που απαιτείται αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Συγκρίνοντας τις θεραπείες με siRNAs έναντι εκείνων με shRNAs ίδιων δόσεων, τα shRNAs έχουν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες, λόγω των διαφορών στο μηχανισμό δράσης, που έγκειται στον τρόπο ρύθμισής τους (π.χ. τα shRNAs αντιμετωπίζουν την ίδια πυρηνική και κυτταροπλασματική ρύθμιση με τα miRNAs, ενώ τα siRNAs όχι). Η επαγωγή της απόπτωσης από τα miR-15a και miR-16-1 στη CLL, η αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων από το let-7, ο περιορισμός της διήθησης και της μετανάστευσης των κυττάρων που οφείλεται στο miR-125 στον καρκίνο του μαστού και η χρήση anti-miR-21 AMOs για την πρόκληση της προαποπτωτικής απόκρισης στο γλοιοβλάστωμα και στον καρκίνο του μαστού αποτελούν παραδείγματα θεραπευτικής χρήσης των miRNAs. Ως antagomirs ή AMOs χαρακτηρίζονται μόρια νουκλεϊκών οξέων που εμφανίζουν συμπληρωματικότητα προς συγκεκριμένα miRNAs και χρησιμοποιούνται προκειμένου να ελαττωθεί η έκφραση αυτών των miRNAs και, επομένως, και η δράση τους. Όσον αφορά στα anti-miR-21 AMOs, η χρήση τους αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων του χολαγγειοκαρκινώματος στη γεμισταβίνη. Αυτό δείχνει ότι η θεραπεία που βασίζεται σε miRNAs μπορεί να συνδυαστεί με τη χημειοθεραπεία. Το πρώτο εμπόδιο για να είναι μια τέτοια προσέγγιση αποτελεσματική είναι η στόχευση των miRNAs/AMOs στα κύτταρα στόχους *in vivo*.

Η αύξηση της αποτελεσματικότητας και της σταθερότητας, καθώς και η μείωση της τοξικότητας των AMOs έχει επιτευχθεί μέσω της ανάπτυξης ολιγονουκλεοτιδίων με 2'-O-μεθυλο- ή 2'-O-μεθυλαιθυλο-κατάλοιπα και με τη χρήση νουκλεοτιδίων, όπου ο δακτύλιος της ριβόζης είναι «κλειδωμένος» με μια γέφυρα μεθυλίου που συνδέει το άτομο 2'-O με το άτομο 4'-C (locked nucleic acids, LNA τροποποιημένα νουκλεοτίδια). Ο συνδυασμός DNA/LNA AMOs έχει χρησιμοποιηθεί για την καταστολή του miR-21, με αποτέλεσμα την αύξηση του αποπτωτικού θανάτου σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Τα ολιγονουκλεοτίδια που βασίζονται στην τεχνολογία του LNA έχουν αποδειχθεί μη τοξικά σε δόσεις <5 mg/kg/ημέρα σε ποντίκια και έχουν αντικαρκινικά αποτελέσματα *in vivo*. Έτσι, είναι πιθανό η θεραπευτική αγωγή για τον καρκίνο *in vivo* με AMOs να είναι εφικτή. Έχει δειχθεί επίσης ότι η ενδοφλέβια χορήγηση AMOs συνδεδεμένων με χοληστερόλη σε ποντίκια καταστέλλει σημαντικά τη δράση των miR-16, miR-122, miR-192 και miR-194 σε διάφορα όργανα. Ακόμη, καθώς

το anti-miR-122 AMO επηρεάζει τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης, τα ποντίκια στα οποία χορηγείται εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα.

Προς το παρόν, δεν υπάρχουν αναφορές για την κλινική χρήση των miRNAs. Παρ' όλα αυτά, η αύξηση των μελετών για *in vivo* χρήση siRNAs και shRNAs για τη σίγηση γονιδίων-στόχων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη τεχνικών χρήσιμων στην καθοδήγηση των miRNAs στα κατάλληλα κύτταρα. Οι αντι-καρκινικές προσεγγίσεις που βασίζονται στη συστηματική καθοδήγηση των siRNA/shRNA σε προκλινικά μοντέλα έχουν βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια με τη χρήση ιικών φορέων, λιπιδίων και νανοσωματιδίων. Είναι πιθανόν ότι παρόμοιες προσεγγίσεις θα μπορούσαν να γίνουν με τη χρήση miRNAs ως θεραπευτικών μορίων. Το πλεονέκτημα των miRNAs έναντι των siRNA/shRNA είναι η δυνατότητα που παρέχουν για στόχευση πολλών γονιδίων με ένα μόνο μόριο. Παρόμοια με τα miRNAs, τα siRNAs/shRNAs μπορούν να αλληλεπιδρούν με αρκετούς στόχους, όμως εδώ το φαινόμενο αποτελεί μειονέκτημα λόγω του γεγονότος ότι οι στόχοι είναι μη προβλέψιμοι και πιθανόν προκαλούν ανεπιθύμητες ενέργειες. Για τα miRNAs, η αποκατάσταση της έκφρασής τους στα καρκινικά κύτταρα πιθανότατα αποκαθιστά και το συνολικό δίκτυο των φυσιολογικών αλληλεπιδράσεων.

Μέχρι στιγμής, η διαθεσιμότητα μόνο λίγων ζωικών μοντέλων που έχουν αναπτυχθεί για τα miRNAs που υπερή υποεκφράζονται σε καρκίνους περιορίζει σημαντικά τις προκλινικές *in vivo* μελέτες. Θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστούν νεοπλασίες σε ποντίκια και το προφίλ έκφρασης των απορρυθμισμένων miRNAs σε αυτές για την αναζήτηση αντίστοιχων miRNAs στους ανθρώπους. Πραγματικά, καθώς το ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα εμφανίζει παρόμοιες ανωμαλίες έκφρασης των miRNAs με το ηπατοκαρκίνωμα του ποντικού, είναι πιθανόν η τυχαία ή η επαγόμενη ανάπτυξη νεοπλασιών στα ποντίκια να παρέχει κατάλληλα συστήματα για τον έλεγχο της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των miRNAs και των AMOs ως θεραπευτικών παραγόντων.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα miRNAs έχουν εισβάλει δυναμικά στον τομέα της έρευνας του καρκίνου, ενώ φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην ανάπτυξη των βλαστοκυττάρων. Ισχυρές ενδείξεις απορρύθμισής τους στους καρκίνους του ανθρώπου μέσω μηχανισμών σχετικών με τις γονιδιωμικές αλλαγές και την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων δείχνουν ότι ίσως δρουν ως ογκογονίδια ή ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στις βιολογικές διαδικασίες που απορρυθμίζονται στον καρκίνο,

όπως είναι η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Επιπρόσθετα, τα miRNAs έχουν συσχετιστεί με γονιδιακά προϊόντα όπως τα *bcl2*, *mys* και *ras*, που ρυθμίζουν μονοπάτια τα οποία εμπλέκονται στον κακοήγη μετασχηματισμό και αυτό αποτελεί βάση για την κατανόηση των συνδετικών μηχανισμών μεταξύ της απορρύθμισης των miRNAs και συγκεκριμένων μοριακών μονοπατιών.

Με εξαίρεση τις μελέτες της γονιδιακής έκφρασης που έχουν εφαρμοστεί σε ένα μεγάλο αριθμό κακοηθειών στον άνθρωπο, οι υπόλοιπες μελέτες έχουν δώσει μόνο ενδείξεις για την απορρύθμιση των miRNAs στις κατηγορίες καρκίνου. Αυτές πρέπει να επεκταθούν προκειμένου να καθοριστεί ο πλήρης ρόλος των miRNAs στον καρκίνο και οι μηχανι-

σμοί που συνδέονται με την απορρύθμισή τους. Επί πλέον, περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την αναγνώριση και την ταυτοποίηση νέων στόχων των miRNAs, καθώς και για τη διευκρίνιση των σχέσεών τους με τα μοριακά μονοπάτια του καρκίνου, οδηγώντας έτσι στην ανακάλυψη νέων μοριακών βιοδεικτών της νόσου. Τελικά, η αξιολόγηση του δυναμικού των miRNAs ως διαγνωστικών δεικτών και ως θεραπευτικών μορίων ή στόχων είναι μόλις στο ξεκίνημά της. Η ανάπτυξη ζωικών μοντέλων αναμφισβήτητα θα συντελέσει στην περαιτέρω αποσαφήνιση του ρόλου των miRNAs στην ογκογένεση και στην ανάπτυξη χρήσιμων εργαλείων για *in vivo* έλεγχο των αντικαρκινικών AMOs και miRNAs.

ABSTRACT

MicroRNAs, cancer and cancer stem cells: From research to therapy

E. SKOURTI, I. CHRISTODOULOU, S. LOGOTHETI, V. ZOUMBOURLIS

Biomedical Applications Unit, Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2013, 30(4):391–405

MicroRNAs (miRNAs) are 21–23 nucleotide RNA molecules that act as regulators of gene expression in eukaryotic cells by binding in a non-coding region of their mRNA targets, specifically the 3' untranslated region (3'UTR). Through this mechanism miRNAs regulate the self-renewal, differentiation and division of cells, via post-translational gene silencing. They have a significant role in many cellular processes, including stem cell proliferation and apoptosis, and in several diseases, cancer being the most prominent example. MiRNAs regulate gene expression via two separate mechanisms, namely inhibition of translation and promotion of mRNA degradation. Although miRNAs are encoded by only 3% of human genes, they regulate approximately 30% of protein-coding genes, which illustrates not only their significance in various regulatory pathways, but also their potential for manipulation of cellular functions. In the context of cancer, miRNAs have been shown to act as both oncosuppressor molecules and oncogenes, inhibiting and inducing tumor development, respectively. In addition, an overall underexpression of miRNAs has been observed in several types of cancer tissue in comparison with the corresponding normal tissues. A possible therapeutic use of miRNAs could thus involve restoration of the aberrant expression levels of target-genes that are implicated in signaling pathways in cancer cells, particularly in the cancer stem cells that are primarily responsible for carcinogenesis and metastases. This article highlights the crucial role that miRNAs play in stem cell proliferation, apoptosis and differentiation and their potential contribution to cancer therapeutics.

Key words: Cancer stem cells, Cancer therapeutics, miRNAs, Stem cells

Βιβλιογραφία

- LEEY, AHN C, HAN J, CHOI H, KIM J, YIM J ET AL. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003, 425:415–419
- ZIMMERMAN AL, WU S. MicroRNAs, cancer and cancer stem cells. *Cancer Lett* 2011, 300:10–19
- CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCHE ET AL. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:15524–15529
- CALIN GA, LIU CG, SEVIGNANI C, FERRACIN M, FELLI N, DUMITRU CD ET AL. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:11755–11760
- HE L, THOMSON JM, HEMANN MT, HERNANDO-MONGE E, MU D, GOODSON S ET AL. A microRNA polycistron as a potential hu-

- man oncogene. *Nature* 2005, 435:828–833
6. CIMMINO A, CALIN GA, FABBRI M, IORIO MV, FERRACIN M, SHIMIZU M ET AL. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:13944–13949
 7. TROMPETER HI, ABBAD H, IWANIUK KM, HAFNER M, RENWICK N, TUSCHL T ET AL. MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC. *PLoS One* 2011, 6:e16138
 8. WANG S, OLSON EN. Angiomirs – key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2009, 19:205–211
 9. DEWS M, HOMAYOUNI A, YU D, MURPHY D, SEVIGNANI C, WENTZEL E ET AL. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 2006, 38:1060–1065
 10. SELARU FM, OLARU AV, KAN T, DAVID S, CHENG Y, MORI Y ET AL. MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Hepatology* 2009, 49:1595–1601
 11. VOORHOEVE PM, LE SAGE C, SCHRIER M, GILLIS AJ, STOOP H, NAGEL R ET AL. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006, 124:1169–1181
 12. DIAO S, ZHANG JF, WANG H, HE ML, LIN MC, CHEN Y ET AL. Proteomic identification of microRNA-122a target proteins in hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2010, 10:3723–3731
 13. ROLDO C, MISSIAGLIA E, HAGAN JP, FALCONI M, CAPELLI P, BERSANI S ET AL. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006, 24:4677–4684
 14. KJERSEM JB, IKDAHL T, GURENT, SKOVLUND E, SORBYE H, HAMFJORD J ET AL. Let-7 miRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3'UTR; colorectal cancer screening population prevalence and influence on clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin +/- retuximab. *BMC Cancer* 2012, 12:534
 15. YIN Y, YAN ZP, LU NN, XU Q, HE J, QIAN X ET AL. Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1829:239–247
 16. KAWAGUCHI T, KOMATSU S, ICHIKAWA D, MORIMURA R, TSUJIURA M, KONISHI H ET AL. Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2013, 108:361–369
 17. ZHANG G, XIA S, TIAN H, LIU Z, ZHOUT. Clinical significance of miR-22 expression in patients with colorectal cancer. *Med Oncol* 2012, 29:3108–3112
 18. KONG W, HEL, RICHARDS EJ, CHALLA S, XU CX, PERMUTH-WEY J ET AL. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2013, doi: 10.1038
 19. MADANECKI P, KAPOOR N, BEBOK Z, OCHOCKA R, COLLAWN JF, BARTOSZEWSKI R. Regulation of angiogenesis by hypoxia: The role of microRNA. *Cell Mol Biol Lett* 2013, 18:47–57
 20. SAYED D, HE M, HONG C, GAO S, RANE S, YANG Z ET AL. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem* 2010, 285:20281–20290
 21. CICALESE A, BONIZZI G, PASI CE, FARETTA M, RONZONI S, GIULINI B ET AL. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 2009, 138:1083–1095
 22. LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D ET AL. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005, 435:834–838
 23. FANG C, ZHU DX, DONG HJ, ZHOU ZJ, WANG YH, LIU L ET AL. Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol* 2012, 91:553–559
 24. KARUBE Y, TANAKA H, OSADA H, TOMIDA S, TATEMATSU Y, YANAGISAWA K ET AL. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 2005, 96:1111–1155
 25. NEGRINI M, FERRACIN M, SABBIONI S, CROCE CM. MicroRNAs in human cancer: From research to therapy. *J Cell Sci* 2007, 120:1833–1840
 26. SIOUD M, FURSET G, CEKAITE L. Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 361:122–126
- Corresponding author:*
- V. Zoumpourlis, Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Ave., GR-116 35 Athens, Greece
e-mail: vzub@eie.gr