
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΝΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

ΠΡΩΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ Χ.
ΛΑΖΑΡΗΣ

ΥΠΟΨΗΦΙΟΣ ΔΙΔΑΚΤΩΡ: ΔΑΥΙΔ Γ.
ΣΥΜΕΩΝΙΔΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΩΝ ΣΤΗΝ
ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
ΔΕΙΚΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ
ΕΝΤΕΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 04/12/2015

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ ΟΡΙΣΜΟΥ 3ΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

30/09/2015

ΜΕΛΗ 3ΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΑ-ΕΛΕΝΗ ΘΩΜΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑ

ΑΝΔΡΕΑΣ Χ. ΛΑΖΑΡΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Γ. ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ, ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

04/12/2015

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΕΩΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ 7ΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

30/10/2019

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ 7ΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- 1.ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
- 2.ΛΑΖΑΡΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ ΤΟΥ ΧΡΗΣΤΟΥ
- 3.ΘΩΜΟΠΟΥΛΟΥ-ΛΑΖΑΡΗ ΓΕΩΡΓΙΑ-ΕΛΕΝΗ
- 4.ΑΓΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
- 5.ΦΟΥΚΑΣ ΠΕΡΙΚΛΗΣ
- 6.ΘΥΜΑΡΑ ΕΙΡΗΝΗ
- 7.ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΟΥ ΣΤΡΑΤΗΓΟΥΛΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: ΘΩΜΟΠΟΥΛΟΥ-ΛΑΖΑΡΗ ΓΕΩΡΓΙΑ-ΕΛΕΝΗ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

Αρχαίο κείμενο

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ὑπτεύου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πῆσσοδον φθόριον δώσω. Ἄγνως δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθίωντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρῆξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίαν δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρὴ ποτε ἐκκλαέεσθαι ἕξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιποκοῦντι, τάναντία τούτέων.

Νεοελληνική απόδοση

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς και τις Θεές επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονεῖς μου και να μοιραστῶ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ' αδελφία μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ' όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είθε ν' απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβῶ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστῶ τα αντίθετα από αυτά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ
2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ
3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ
4. ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ I-ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ
5. ΓΟΝΙΔΙΑ-ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ I
6. Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ I ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΟΝΤΟΤΗΤΕΣ
7. ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ I
8. Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ I ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
9. ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΚΑΙ Τ ΑΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗ ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ DNA
10. Η ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ
11. Η ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ
12. ΛΙΓΑ ΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ
13. Η ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ II-ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ
14. ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ
15. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ II ΣΤΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ
16. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ
17. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ II
18. ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ II ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ
19. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ II ΣΤΟ DNA
20. Η ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ II ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
21. ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΕΣ I ΚΑΙ II
22. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΟΝ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ
23. Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΡΥΠΤΗΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ
24. ΤΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ
25. Η ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΠΟ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΟΥΣ
26. ΤΑ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΙ ΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
27. ΤΟ ΠΟΡΤΡΑΙΤΟ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ ΑΠΟ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

28. ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΑΠΟ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
29. Η ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ
30. ΤΟ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ
31. Η ΣΧΕΣΗ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ
32. Η ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
33. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
34. Η ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
35. Ο ΔΕΙΚΤΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ LGR5
36. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ GPCR
37. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ GPCR
38. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΠΛΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΛΕΥΚΙΝΗ LGR
39. ΤΙ ΕΙΝΑΙ Ο ΔΕΙΚΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ LGR5
40. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΤΕΡΟ ΚΑΙ ΣΕ ΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΟΥΣ ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ
41. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ LGR5
42. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΟΥ LGR5 ΩΣ ΔΕΙΚΤΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΣ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
43. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ LGR5 ΣΕ ΑΔΕΝΩΜΑΤΑ
44. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ LGR5 ΣΤΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ
45. Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΩΝ R-SPONDINS ΣΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ LGR5
46. Η ΕΠΑΦΗ ΤΩΝ RSPOs ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ LGR5
47. Η ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ LGR5, RSPO ΚΑΙ WNT ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ
48. ΣΥΓΚΡΙΣΗ LGR5 ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ LGRs
49. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ LGR5
50. ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ HEDGEHOG
51. Η ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ HEDGEHOG
52. ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ BMP ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ Hh
53. ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ Hh ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ
54. ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ Hh ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
55. Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ Hh ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΩΘΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
56. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ Hh ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΛΩΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
57. ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΟΥ Hh
58. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ Hh
59. ΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ Hh
60. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ Hh

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 61. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ
- 62. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
- 63. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
- 64. ΣΥΖΗΤΗΣΗ
- 65. ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ
- 66. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ
- 67. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

2.ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου στον βιομηχανικό κόσμο και την δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Η επίπτωσή του, ενώ εμφανίζει πτώση στις αναπτυσσόμενες χώρες, εντούτοις έχει αυξηθεί στις αναπτυσσόμενες [1]. Από το 2002, καταγράφονται περισσότερες από 1000000 νέες περιπτώσεις ετησίως. Είναι σε συχνότητα ο δεύτερος καρκίνος στις γυναίκες και ο τρίτος στους άντρες με ποσοστά 9,4% και 10,1% αντίστοιχα [5].

Οι χώρες με την υψηλότερη επίπτωση είναι η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία, οι ΗΠΑ και ορισμένες περιοχές της Ευρώπης. Στις χώρες χαμηλότερου κινδύνου περιλαμβάνονται η Κίνα, η Ινδία, η Αφρική και η νότια Αμερική. Στη Ευρώπη παρατηρείται υψηλότερη επίπτωση στην κεντρική και δυτική, ιδίως στην Σλοβακία, Ουγγαρία, Δανία, Ολλανδία και Τσεχία.

Στο Ηνωμένο Βασίλειο εμφανίζονται κατά μέσο όρο 39000 νέες περιπτώσεις εκ των οποίων 16000 έχουν δυσμενή κατάληξη. Η νόσος είναι σπάνια πριν από την ηλικία των 40 ετών, ενώ παρουσιάζει προοδευτική αύξηση της επίπτωσης μεταξύ 40-50 ετών. Ο μέσος κίνδυνος εμφάνισης του καρκινώματος είναι 5% με το 90% να εμφανίζεται μετά την ηλικία των 50 ετών. Αντιθέτως ο καρκίνος του ορθού εμφανίζει σταδιακή αύξηση στις ηλικίες 20-30, και μειώνεται με την πάροδο των ετών.

Το 1990 πρωτοπεριγράφηκαν οι γενετικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την καρκινική μετατροπή ενός αδενώματος και από τότε η γενωμική αστάθεια αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών κέντρων με ένα κοινό συμπέρασμα να είναι η πολυπλοκότητα της διαδικασίας της καρκινικής μετατροπής [2]. Αρκετοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την καρκινογένεση στο παχύ έντερο, όπως η χρόνια φλεγμονή, η παχυσαρκία, η διατροφή, με τις δύο τελευταίες μάλιστα να υποστηρίζεται πως αυξάνουν τον κίνδυνο γενετικών μεταλλάξεων και επιγενετικών βλαβών [3,4]. Οι παράγοντες φλεγμονής, όπως η ιντερλευκίνη-6, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-a), και οι δραστικές ρίζες οξυγόνου επηρεάζουν την καρκινογένεση, μια σχέση που έχει μελετηθεί αρκετά σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδη Νόσοι του Εντέρου)[6]. Ο καρκινικός όγκος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια, δεν αποτελείται δηλαδή από μία μόνο κυτταρική ομάδα και αυτό το γεγονός είναι μια μεγάλη πρόκληση των θεραπευτικών μεθόδων. Μάλιστα οι βασικές αφορμές που οδήγησαν στην σταδιακή ανακάλυψη των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων ήταν η ικανότητα αυτοανανέωσης των κυττάρων του όγκου, η χημειοανθεκτικότητα και το μεταστατικό δυναμικό[7,8].

3.ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ 1

4.ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ-ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η τοποισομεράση 1(Τοπ1) είναι ένα ένζυμο το οποίο απαντά τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς και μάλιστα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελεί βασικό συστατικό της ομαλής ανάπτυξης, αλλά και της γήρανσης του. Η Τοπ1 συνδέεται στη μία έλικα της αλυσίδας του DNA βοηθώντας στην χαλάρωση της, προκειμένου να δημιουργηθεί ένα σημείο εκκίνησης της αντιγραφής του γενετικού υλικού[9]. Άρα λειτουργεί σαν τοπογραφικός παράγοντας, ικανός να διαμορφώσει σωστά στο χώρο την διπλή αλυσίδα του DNA για να είναι έτοιμη για τις επόμενες διεργασίες της αντιγραφής, αλλά και της μεταγραφής, ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου τη δεδομένη χρονική στιγμή.

Το γενετικό υλικό βρίσκεται συσπειρωμένο στο χώρο δημιουργώντας μια εικόνα πλεξούδας και ενώ ανάλογα με τον τρόπο περιστροφής στο χώρο μιλάμε για θετική ή αρνητική συσπείρωση. Αυτός ο τρόπος πακεταρίσματος του DNA επιδρά στις μεταβολικές διαδικασίες, αλλά και στην έκφραση των γονιδίων.

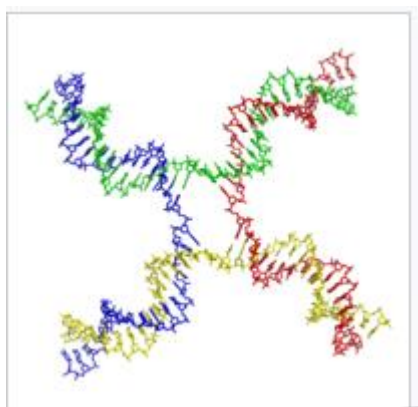
Structural features of the three major forms of DNA

Geometry attribute	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Helix sense	right-handed	right-handed	left-handed
Repeating unit	1 bp	1 bp	2 bp
Rotation/bp	32.7°	34.3°	60°/2
bp/turn	11	10.5	12
Inclination of bp to axis	+19°	-1.2°	-9°
Rise/bp along axis	2.3 Å (0.23 nm)	3.32 Å (0.332 nm)	3.8 Å (0.38 nm)
Pitch/turn of helix	28.2 Å (2.82 nm)	33.2 Å (3.32 nm)	45.6 Å (4.56 nm)
Mean propeller twist	+18°	+16°	0°
Glycosyl angle	anti	anti	C: anti, G: syn
Sugar pucker	C3'-endo	C2'-endo	C: C2'-endo, G: C2'-exo
Diameter	23 Å (2.3 nm)	20 Å (2.0 nm)	18 Å (1.8 nm)

[10,11]

Η υπερσυσπείρωση του DNA προκύπτει από το άθροισμα δύο γεγονότων. Το ένα αφορά τη στροφή της διπλής έλικας στο χώρο και το άλλο τη στροφή των αλυσίδων γύρω από τον εαυτό τους, δημιουργώντας ένα σχήμα που μοιάζει με το σχήμα 8. Φυσιολογικά η θετική συσπείρωση εμποδίζει την αντιγραφή και τη μεταγραφή του γενετικού υλικού και χρειάζεται η χαλάρωση της αλυσίδας. Ως επί το πλείστον στον πυρήνα των κυττάρων των θηλαστικών το DNA βρίσκεται σε αρνητική συσπείρωση [12]. Το θέμα, λοιπόν, της συσπείρωσης του DNA είναι απαραίτητο να γίνει κατανοητό, για να μπορέσουμε να αντιληφθούμε τον τρόπο δράσης της τοποισομεράσης.

Η Τοπ1 διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, οι οποίες είναι η IA και IB. Με τη σειρά της η ομάδα IA περιλαμβάνει τις Τοπ3α και Τοπ3β, όπου βοηθούν στη λύση του αρνητικού τύπου συσπείρωσης. Μάλιστα η Τοπ3α συμμετέχει στη διάλυση των συνδέσεων που πήραν το όνομα τους από τον επιστήμονα που τις ανακάλυψε, τις double Holliday junctions. Εδώ το γενετικό υλικό σχηματίζεται από τέσσερις διπλές αλυσίδες σε σχήμα σταυρού στο χώρο[13].

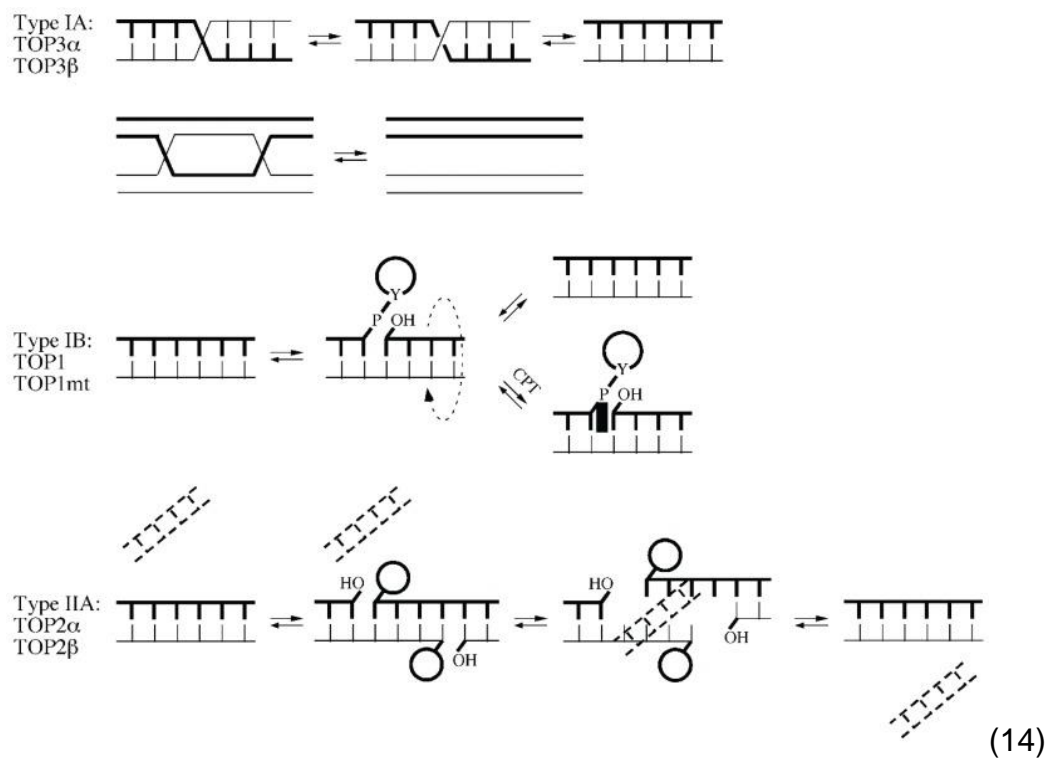


[13]

Η Τοπ IB τοποισομεράση διακρίνεται σε δύο υποομάδες, την πυρηνική και τη μιτοχονδριακή. Ενώ η μιτοχονδριακή είναι σημαντική για την ακεραιότητα και τη σωστή μεταβολική λειτουργία των μιτοχονδρίων, εντούτοις έρευνες σε ποντίκια που την στερούνται ανέδειξαν ικανοποιητική βιωσιμότητα, αλλά και αυξημένη αρνητική συσπείρωση του γενετικού τους μιτοχονδριακού υλικού [21].

Γενικά η τοποισομεράση 1 συνδέεται στο 3' άκρο της μιας αλυσίδας DNA μέσω του τυροσινικού άκρου Y723 (3'-P-Y). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το άνοιγμα της διπλής έλικας και την απομάκρυνση από την περιοχή της Τοπ1.

Στην συνέχεια το 5-OH άκρο μετατίθεται για να συνδεθεί με το 3 άκρο και στο ενδιάμεσο προκύπτει ένα τμήμα γονιδιακό έτοιμο για επεξεργασία[14].



Ξεκαθαρίζει συνεπώς σταδιακά ο τρόπος δράσης , αλλά και η ανάγκη της φυσιολογικής λειτουργικότητας της Τοπ1 για την αντιγραφή. Το ένζυμο αυτό απαιτείται όμως και στην μεταγραφή, καθώς υποστηρίζεται πως συγκρατεί στον σημείο έναρξης της μεταγραφής το βασικό ένζυμο της διαδικασίας που είναι η RNA πολυμεράση. Βέβαια ο μηχανισμός δράσης της σε αυτό το σημείο δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως και χρειάζονται κι άλλες έρευνες που να καταδεικνύουν τη λειτουργία αυτή[15]. Επίσης, η Τοπ1 συμμετέχει στη σωστή τοποθέτηση του συμπλόκου με την ονομασία 'spliceosome'- σωμάτιο συναρμογής (αναλύεται παρακάτω) στις μεταγραφικά ενεργές περιοχές του γονιδιώματος. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, διότι δρα στις ενεργώς μεταγραφικές περιοχές του γονιδιώματος [16].

Τι είναι το σωμάτιο συναρμογής (spliceosome):

Το σωμάτιο αυτό αποτελείται από πέντε μικρά πυρηνικά snRNAs και μια ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων. Τα snRNA του σωματίου είναι τα U1, U2, U4, U5, U6 τα οποία συνδεόμενα με τις πρωτεΐνες σχηματίζουν σύμπλοκα με την ονομασία snRNPs (small nuclear ribonucleo proteins).

Το σωμάτιο, λοιπόν, συναρμογής συνδέεται στο πυρηνικό ακόμα ανώριμο mRNA για να το μετατρέψει σε ώριμο και λειτουργικό. Αυτό γίνεται αφαιρώντας τα τελικά άκρα του, μετακινώντας τα εντρόνια και ενώνοντας τα εξόνια μεταξύ τους, έτοιμα για πιθανή μετάφραση. Κάθε εντρόνιο έχει μια αλληλουχία GU βάσεων στο 5' άκρο και AG στο 3' άκρο (άκρο πολυπυριμιδίνης) [17].

Η Τοπ1 συνδέεται όπως έχουμε προαναφέρει σε συγκεκριμένα σημεία της αλυσίδας που πρόκειται να υποστεί αντιγραφή σε διάφορα σημεία του κυτταρικού κύκλου, στη φάση δηλαδή M, στην πρώιμη G1 και στη G1/S, όπου διατηρεί την ακεραιότητα της πατρικής αλυσίδας [18]. Τέλος, για να επανέλθουμε στην μεταγραφή, η Τοπ1 έχει και δράσεις εκτός της τοπολογίας του γενετικού υλικού και μπορεί να την καταστείλει μέσω δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα TFIIID, ο οποίος αποτελεί μέρος του προεναρκτήριου συμπλόκου της μεταγραφής που επιτελείται από την RNA πολυμεράση II [19]. Επιπλέον, η αναστολή της σε λευχαιμικά κύτταρα οδηγεί σε υπερνεργοποίηση του πρωτοογκογονιδίου c-Jun [20]. Ακόμα, αλληλεπιδρά με τον παράγοντα ASF/SF2, βοηθώντας στην ωρίμανση του RNA και εμποδίζοντας τυχόν σύγκρουση της πατρικής αλυσίδας DNA και της νέας RNA.

5.ΓΟΝΙΔΙΑ-ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ1

TDP1 (τυροσιλική DNA φωσφοδιεστεράση 1): Είναι το ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της Τοπ1 και του 3-άκρου του DNA, οδηγώντας στη διάλυση του συμπλέγματος και την απελευθέρωση του γονιδιώματος. Κατά την έλλειψη του ενζύμου, τυχόν λάθη που συμβαίνουν στο άνοιγμα της διπλής έλικας του DNA από την Τοπ1, δεν διορθώνονται επαρκώς [22].

PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase): Είναι ένα ένζυμο που επίσης συμμετέχει στη διόρθωση που βλαβών που συμβαίνουν στο ενωμένο με την Τοπ1 γενετικό υλικό. Μελέτες, μάλιστα υποστηρίζουν ότι τα ένζυμα PARP και TDP1, αποτελούν τα μέλη της ίδιας οδού [23].

APTX (απραταξίνη) γονίδιο: Είναι το γονίδιο που έχει ενοχοποιηθεί για την νόσο της πρώιμης αταξίας με οφθαλμοκινητική απραξία τύπου 1 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ρόλο στη διόρθωση των ελλειμμάτων που

συμβαίνουν σε μία ή στις δύο έλικες του DNA [24]. Υπάρχουν μελέτες που μιλούν για συνεργική δράση του προϊόντος του γονιδίου APTX και του ενζύμου TDP1 [25].

MMR σύστημα επιδιόρθωσης (mismatch repair genes): Το καρκίνωμα του παχέος εντέρου με βάση το γενετικό υπόβαθρο διακρίνεται σε σποραδικό, οικογενές και ως καρκίνωμα σχετιζόμενο με κληρονομικά σύνδρομα. Ο σποραδικός τύπος είναι ο συχνότερος (50-60%), εμφανίζεται σε ηλικίες άνω των 60, και δεν συνδυάζεται με οικογενειακό ιστορικό γαστρεντερικού καρκινώματος. Ο οικογενής τύπος αφορά στο 30-40% των αδενοκαρκινωμάτων και απαντάται σε μέλη οικογενειών με μη πολυποδιασικό κληρονομικό καρκίνωμα κόλου (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer, Lynch Syndrome) πρέπει δε όλοι οι πρώτου βαθμού συγγενείς να ελέγχονται με κολonosκόπηση από την ηλικία των 40 ετών. Ο τρίτος τύπος είναι ο σπανιότερος (5-6%) και αναπτύσσεται στα πλαίσια συνδρόμου πολυποδίασης. Στην τελευταία περίπτωση έχει ενοχοποιηθεί κυρίως το σύστημα επιδιόρθωσης MMR, ενώ και στον σποραδικό καρκίνο σε ποσοστό 15% έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις στα γονίδια MSH2 ή MLH1, της οικογένειας MMR. Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζουν και διορθώνουν λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA, διατηρώντας την πιστότητα της γονιδιακής αλληλουχίας και στην πατρική, αλλά και στην νέα αλυσίδα. Υπάρχουν μελέτες που δηλώνουν πιθανή σχέση μέσω της επαγόμενης απόπτωσης από τις MMR ως απάντηση σε βλάβες του DNA και στην αναστολή της λειτουργίας της Top1.

6.Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ1 ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΟΝΤΟΤΗΤΕΣ

ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ:

Για την απομάκρυνση της Top1 και τη διόρθωση του DNA απαιτείται μια κινάση που λέγεται ATM (κινάσης σερίνης-θρεονίνης), που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την TDP1 με αποτέλεσμα την ελευθέρωση του γενετικού υλικού [26]. Μεταλλάξεις στα ένζυμα ATM και TDP1 ευθύνονται για κάποιες νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η αταξία-τηλεαγγειεκτασία και η παρεγκεφαλιδική αταξία με αξονική νευροπάθεια [27,28]. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για να ξεκαθαριστεί το τοπίο σε αυτόν τον τομέα.

ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ:

Στο σκληρόδερμα είναι χαρακτηριστική η εμφάνιση υψηλού τίτλου αντισωμάτων έναντι της Τοπ1 και μάλιστα σχετίζεται με κακή πρόγνωση και μεγάλη θνητότητα της νόσου [29]. Γενικά στους ασθενείς με σκληρόδερμα αναπτύσσονται αυτό-αντισώματα που βλάπτουν τους φυσιολογικούς ιστούς. Το έναυσμα μπορεί να είναι για παράδειγμα μια διαταραχή στη διαδικασία της απόπτωσης και εν συνεχεία στην παρουσίαση περισσότερων αποπτωτικών τμημάτων στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα οποία τελικώς υπερδιεγείρονται και στρέφονται ενάντια σε υγιή κύτταρα [30]. Ασθενείς με αντισώματα έναντι της RNA πολυμεράσης II (RNAPII), συχνά έχουν και αντισώματα έναντι της Τοπ1, παρόλα αυτά ο μηχανισμός δημιουργίας αυτών των αντισωμάτων δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός [31].

ΑΥΤΙΣΜΟΣ:

Ένας υπότυπος του αυτισμού είναι το σύνδρομο Angelman, όπου προστατευτικό ρόλο στην εμφάνισή του διαδραματίζει το γονίδιο UBE3A του οποίου η έκφραση καταστέλλεται από το μεταγραφικό RNA UBE3A-ATS. Αυτό το RNA όμως φαίνεται επίσης ότι καταστέλλεται σημαντικά σε ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε αναστολέας της Τοπ1 [32,33]. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι η επιρροή που δέχεται ένα γονίδιο από την Τοπ1 εξαρτάται από τον αριθμό των εντρονίων που αυτό περιέχει, γι' αυτό ίσως άλλωστε η καταστολή της Τοπ1 οδηγεί από τη μία μεριά σε μείωση της έκφρασης μεγάλων γονιδίων (66kb), από την άλλη όμως αυξάνει την έκφραση άλλων μικρότερων [34].

7.Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ 1

ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ 1

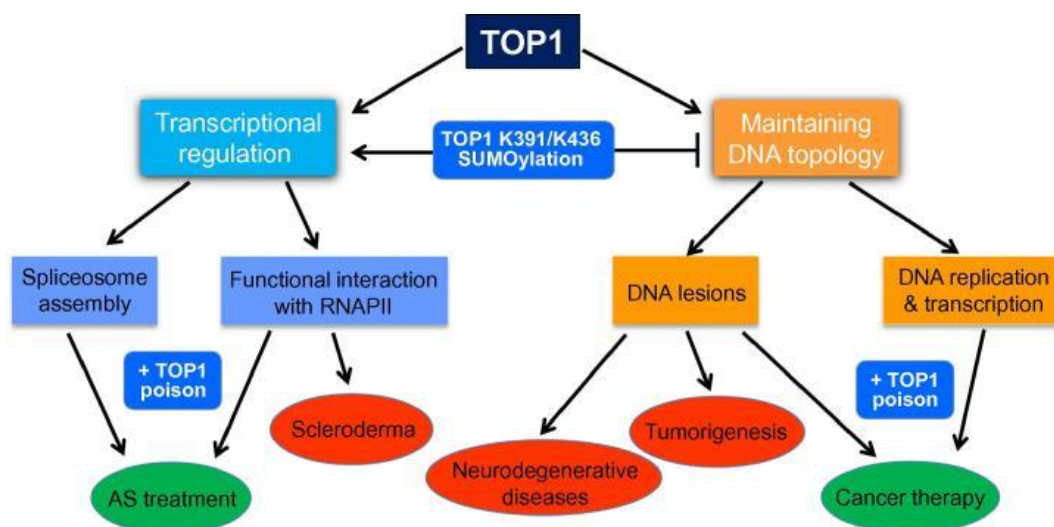
Η Τοπ1 όπως γίνεται κατανοητό από τα ανωτέρω, αποτελεί στόχο θεραπείας στην καρκινογένεση. Η καπποθεκίνη (carpothecin-CPT) είναι ένα φυσικό συστατικό το οποίο απομονώθηκε από το φυτό carpotheca που ευδοκίμει στην Κίνα και χρησιμοποιούνταν αρκετά συχνά σαν φάρμακο. Πέρασαν αρκετά χρόνια όμως και φτάσαμε στο 1980 όπου πρωτοαναφέρθηκε η σημασία της σαν αντικαρκινικό φάρμακο. Από τότε έχουν παραχθεί και συνθετικά ανάλογα της καπποθεκίνης, όπως η ιρινοτεκάνη και η τοποτεκάνη. Αυτές οι ουσίες συνδέονται στο σύμπλεγμα Τοπ1-DNA τη στιγμή που έχει ανοίξει από την Τοπ1 η διπλή έλικα και έχει ξεκινήσει η διαδικασία

αποσυσπείρωσης του και τότε απομακρύνεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία, με την έλικα του DNA να έχει υποστεί βλάβη, δεν συνεχίζεται η αντιγραφή ή η μεταγραφή και το κύτταρο οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο [35,36].

Σαφέστατα γίνεται αντιληπτό πως η δράση αυτή της CPT και των αναλόγων της, θα έχει και αντίκτυπο σε υγιή κύτταρα. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που έχουν ως τώρα αναφερθεί σε μεγάλο βαθμό είναι η τοξικότητα σε κύτταρα του αίματος, ιδίως ουδετεροπενία και γαστρεντερικές διαταραχές [37]. Θα πρέπει συνεπώς να αυξηθεί η ευαισθησία των σκευασμάτων σε ταχέως αναπτυσσόμενα κύτταρα (με καρκινικό φαινότυπο), κάτι το οποίο έχει πολλές δυσκολίες διότι τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στη δράση της Τοπ1 είναι αρκετά (όπως θα δούμε παρακάτω). Τα κύτταρα δηλαδή, με υψηλότερες τιμές Τοπ1, θα μπορούσαν να γίνουν πιο ευαίσθητα στη δράση των αναστολέων της Τοπ1, από ότι τα υπόλοιπα κύτταρα.

Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν πως τα κύτταρα που ανταποκρίνονται σε αναστολείς της Τοπ1, λόγω περισσότερης έκφρασης του ενζύμου, χαρακτηρίζονται από τη αναπαραγωγή πιο πολλών R-loops, κάτι που έχει αποδοθεί στην συσχέτιση της Τοπ1 με το σωματίο συναρμογής (spliceosome) [38-40].

Το σύμπλεγμα Τοπ1-DNA (Top1-Dna cleavage complex, Top1cc) φαίνεται να έχει διπλή δράση. Η συμμετοχή και η ανάγκη της φυσιολογικής λειτουργίας του τόσο στην αντιγραφή όσο και στη μεταγραφή του γενετικού υλικού είναι απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη ενός οργανισμού. Κατά την όλη διαδικασία όμως, μεταλλάξεις ή και άλλα λάθη μπορούν να συμβούν και να οδηγηθεί το κύτταρο στην καρκινογένεση.



[41]

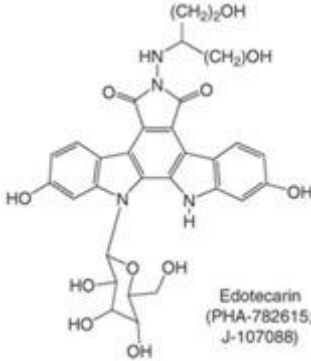
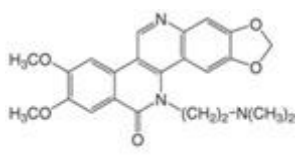
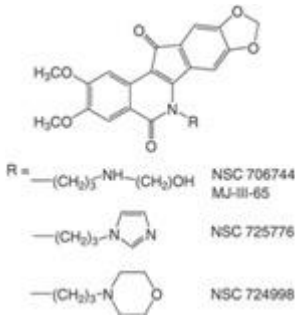
Η αναστολή της λειτουργίας του συμπλέγματος Top1cc είναι επιβλαβής για το κύτταρο, καθώς παραμένουν ελλείμματα στη διπλή έλικα του DNA, υπάρχουν ασταθή RNA παράγωγα καθώς και μη ολοκληρωμένες νέες αλληλουχίες DNA. Ενώ η αρχική CPT δεν χρησιμοποιείται πλέον, τα νέα ανάλογα που αναγράφηκαν βρίσκουν εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου στα παχύ έντερο, στον πνεύμονα και στον ωοθηκών. Η CPT είναι ένα κυκλικό αλκαλοειδές, το οποίο είναι ενεργό στην κλειστή E (τύπου λακτόνης) μορφή και ανενεργό στην ανοικτή E (τύπου καρβοξυλάσης) μορφή καθώς και σε αλκαλικό pH. Αυτός είναι και ο λόγος που δε δρα στην μιτοχονδριακή Τοπ1, λόγω του υψηλότερου pH των μιτοχονδρίων [42]. Όταν κυκλοφορεί στον οργανισμό στην ανενεργή της μορφή, συνδέεται με την αλβουμίνη του ορού και πιθανόν να είναι και μια αιτία των παρενεργειών που προκαλούνται. Η συγγένεια της με την Τοπ1 δεν είναι πολύ ισχυρή και αναστρέφεται με την απομάκρυνση του φαρμάκου από τον οργανισμό κάτι που καθιστά τη ρύθμιση της δράσης της CPT εύκολα ελεγχόμενη. Υπάρχουν και κάποια άλλα μόρια εκτός της οικογένειας της CPT που δεν περιλαμβάνουν τύπου E δακτύλιο στο μόριό τους και συνδέονται αναστρέψιμα στην Τοπ1 (indlocarbazles, indenisoquinolnes) [43].

8. Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ 1 ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Η κατανόηση του τρόπου δράσης συνεπώς της Τοπ1 ήταν αναγκαία για να μπορέσει η ιατρική επιστήμη να προχωρήσει στη ανακάλυψη αναστολέων του μορίου, οι οποίοι να έχουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου. Στις περιπτώσεις που η θεραπεία όμως δεν είναι ακόμα εφικτή, είναι κοινώς αποδεκτό πως και η επιμήκυνση του χρόνου ζωής του ασθενούς θα μπορούσε να θεωρηθεί ως επιτυχία.

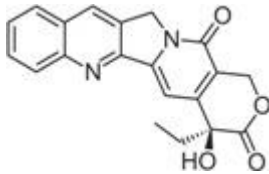
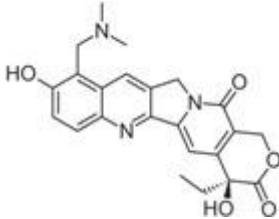
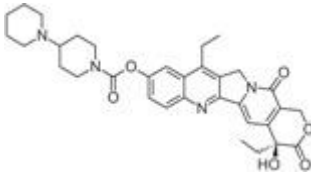
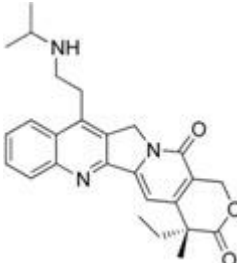
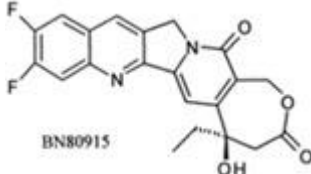
Όπως προαναφέραμε από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα αποτελούν τα ανάλογα της CPT, ιρινοτεκάνη και τοποτεκάνη. Υπάρχουν κι άλλες της ίδιας κατηγορίας ουσίες που βρίσκονται ακόμα στο στάδιο της μελέτης, όπως η διφλομοτεκάνη, η γιματεκάνη, η λοθροτεκάνη και η εξατεκάνη [44], δίνοντας ελπίδες για μεγαλύτερη αντικαρκινική αποτελεσματικότητα, ενώ εκτός των αναλόγων CPT, μόνο οι ινδανοισοκινολόνες φαίνεται να έχουν ιδιαίτερα καλή αντικαρκινική δράση.

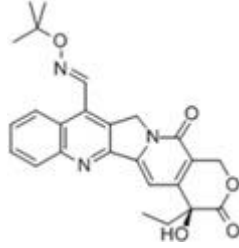
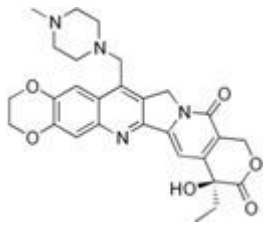
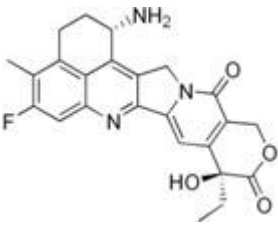
Ανάλογα εκτός CPT

Name	Structure	Clinical Trial	Malignancy	Reference
Indolocarbazoles (Edotecarin, BMS-250749)	 <p>Edotecarin (PHA-782615; J-107088)</p>	Phase II (Edotecarin, Pfizer) Preclinical (BMS-250749)	Stomach, breast neoplasms Anti-tumor activity in preclinical xenograft models	[45,46,47]
Phenanthridines (ARC-111/topovale)	 <p>ARC-111 (topovale)</p>	Preclinical	Anti-tumor activity in preclinical xenograft models	[48,49,47]
Indenoisoquinolines (LMP400, LMP776)	 <p>R = $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)OH$ NSC 706744 MJ-III-65 $-(CH_2)_2-N$ NSC 725776 $-(CH_2)_2-N$ NSC 724998</p>	Phase I	Lymphomas	[50,51,47]

[44]

Ανάλογα CPT

Name	Structure	Clinical Trial	Malignancy	Reference
Camptothecin		Discontinued		[42]
Topotecan (Hycamtin)		FDA approved	Ovarian cancer, SCLC	[42]
Irinotecan (Camptosar/CPT-11)		FDA approved	Colorectal	[42]
Belotecan (CKD-602)		Approved (South Korea)		[53]
Diflomotecan (BN80915)		Phase II (Ipsen)	Advanced metastatic cancer, SCLC	[54]

Name	Structure	Clinical Trial	Malignancy	Reference
Gimatecan (ST-1481, LBQ707)		Phase I/II (Sigma-Tau, Novartis)	Advanced solid tumors	[42]
Lurtotecan (Liposomal OSI- 211, NX 211)		Phase II (Astellas, NCLC)	SCLC, Ovarian	[42]
Exatecan mesylate (DX-8951f)		Phase II/III (Daiichi)	Sarcoma, Pancreatic, Gastric, Liver	[42]

[44]

Η μέσω αναλόγων CPT αναστολή της Τοπ1 στοχεύει στη συσσώρευση λαθών στο γονιδίωμα που να οδηγήσουν τελικώς σε κυτταρικό θάνατο, μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης. Υπάρχουν επίσης μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι αναστολείς PARP δρουν συνεργικά με τους αναστολείς της Τοπ1, αυξάνοντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα, εντούτοις εμφανίζονται δόσοεξαρτώμενες ανεπιθύμητες ενέργειες [52]. Ειδικά σε ασθενείς με καρκίνο στο παχύ έντερο ερευνάται η συνδυαστική θεραπεία με αναστολέα PARP, ιρινοτεκάνη και ακτινοθεραπεία, με στόχο μάλιστα στην δοσολογία, να μην εμφανίζονται τα βασικά συμπτώματα των διαρροιών και της καταστολής του μυελού.

Ένα πρόβλημα που προκύπτει, είναι ότι ορισμένες κυτταρικές σειρές περιέχουν μεταλλάξεις που επηρεάζουν την έκφραση και τη σύσταση της Τοπ1 με αποτέλεσμα να καθίσταται ανθεκτικό το μόριο στη δράση της CPT [58]. Η επαναλαμβανόμενη έκθεση ενός κυτάρου στη CPT οδηγεί σε προς τα κάτω ρύθμιση της έκφρασης της Τοπ1 κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε μονοπύρηννα κύτταρα από περιφερικό αίμα [59]. Κλινικά επίσης σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου οι απόλυτες τιμές της Τοπ1 βρέθηκαν χαμηλότερες στο χειρουργικό παρασκεύασμα από ότι στην αρχική βιοψία, καθώς είχε χορηγηθεί προεγχειρητικά χημειοθεραπεία με ιρινοτεκάνη και 5-φθοριοουρακίλη [60].

Στις 50% των περιπτώσεων με καρκίνο παχέος εντέρου οι τιμές της Τοπ1 είναι υψηλές, ενώ η έκφραση της Τοπ1 μπορεί να προβλέψει και την επιτυχία τη θεραπευτικής χορήγησης, ιρινοτεκάνης. Μάλιστα σε καρκίνο ορθού, υψηλότερα επίπεδα της Τοπ1 είχαν ως συνέπεια καλύτερη ανταπόκριση στην ιρινοτεκάνη μαζί με νεοεπικουρική χημειοθεραπεία [60]. Μελέτη με 1313 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου που είχαν μέτρια ή υψηλά επίπεδα της Τοπ1 όπως προέκυψε με ανοσοιστοχημικές μεθόδους, έδειξε ότι η προσθήκη ιρινοτεκάνης ή οξαλιπλατίνης σε 5-φθοριοουρακίλη (5FU), είχε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στη πιθανότητα μετάστασης [61]. Από την άλλη μεριά η μελέτη CAIRO δεν ανέδειξε συσχέτιση των τιμών της Τοπ1 με την ανταπόκριση σε θεραπεία με ιρινοτεκάνη και καμπεσιταμπίνη [62].

Στόχος είναι να εισέλθει το κύτταρο στην μίτωση με γενετικό υλικό που δεν έχει αντιγραφεί ή που δεν έχει ολοκληρωθεί η επισκευή των χρωμοσωμάτων μετά την αντιγραφή. Ακολουθούν ορισμένα παραδείγματα αναστολέων που βρίσκονται υπό μελέτη.

Οι κινάσες ATM/ATR σταματούν σε συγκεκριμένα σημεία τον κυτταρικό κύκλο προκειμένου να διορθωθούν βλάβες που έχουν προκύψει κατά την αντιγραφή του DNA, έτσι ώστε να διατηρείται η γενωμική σταθερότητα. Η αναστολή των κινασών αυτών φαίνεται να αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στη δράση της CPT [55]. Τα γονίδια HR ανήκουν στη κατηγορία των σιωπηλών γονιδίων που εκφράζονται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Τα προϊόντα τους συμμετέχουν και αυτά στη διόρθωση βλαβών της αλληλουχίας του DNA με στόχο και πάλι τη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας. Αρχικά έγινε προσπάθεια άμεσης αναστολής των γονιδίων κάτι που τελικώς δεν είχε επιτυχία καθώς σε πολλές περιπτώσεις καρκινογένεσης, τα γονίδια HR έχουν υποστεί μετάλλαξη, άρα δεν μπορεί το χημειοθεραπευτικό σκεύασμα να τα αναγνωρίσει [56]. Ενδιαφέρον, χωρίς ακόμα κάποιο όμως από αποτέλεσμα υπάρχει και στον συνδυασμό αναστολέων της Τοπ1 με αναστολέα PARP σε καρκινικά κύτταρα που φέρουν μετάλλαξη στα γονίδια BRCA1/2 (ογκοκατασταλτικά γονίδια, breast cancer 1/2) [57].

Επιθυμητό έχει καταστεί το γεγονός να αποτελέσει θεραπευτική επιλογή και ένας συνδυασμός αναστολέα της Top1 με της TDP1. Σε in vitro μελέτες φαίνεται ότι στα κύτταρα που υπάρχει έλλειψη της TDP1, συσσωρεύονται πολλές δομικές βλάβες του γενετικού υλικού όταν αυτά εκτίθενται στην καπτοθεκίνη [22]. Το αποτέλεσμα μπορεί να έχει ακόμα μεγαλύτερη επιτυχία, όταν χρησιμοποιηθεί νωρίτερα και αναστολέας PARP. Ο συνδυασμός TDP1 αναστολέων με ιρινοτεκάνη, χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στη θεραπεία αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου και υπάρχει προσπάθεια χρήσης του σε γλοιοβλάστωμα, αλλά και σε μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα.

Όπως προκύπτει από τα ανωτέρω το μόριο της TDP1 έχει και αυτό μεγάλη σημασία ως προγνωστικός δείκτης στη θεραπεία του καρκίνου. Σε μελέτη του 2008, η οποία περιελάμβανε 107 ασθενείς, φάνηκε πως ορισμένοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της TDP1, σχετίζονταν με αυξημένη ευαισθησία στη δράση της ιρινοτεκάνης [63]. Οι ενδείξεις, λοιπόν, για τα υψηλότερα επίπεδα της TDP1 σε καρκινικούς ιστούς είναι αρκετές. Άλλη μελέτη με 52 ασθενείς που είχαν ήδη μεταστατικό καρκίνο με πρωτοπαθή εστία το παχύ έντερο, ανέδειξε 24 γονίδια που εμπλέκονται στην χημειοευαισθησία του όγκου στην ιρινοτεκάνη. Το γονίδιο της TDP1 ήταν ένα από τα οχτώ με πολλή μεγαλύτερη έκφραση στον καρκινικό όγκο, από ότι συνέβαινε στα φυσιολογικά κύτταρα [64]. Μάλιστα ενώ έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες με αδενοκαρκίνωμα του ορθού όπου καταγράφηκε η έκφραση γονιδίων, λίγες συμπεριλάμβαναν τη TDP1, όπου το αποτέλεσμα συμφωνεί με τα προηγούμενα.

Η TDP1 γνωρίζουμε ότι συμμετέχει στην επιδιόρθωση του γενετικού υλικού [65] από βλάβες που προκαλεί η ιονίζουσα ακτινοβολία (IA). Κύτταρα με έλλειψη του ενζύμου φαίνεται πως εμφανίζουν καθυστέρηση στη επιδιόρθωση των βλαβών [66]. Θα μπορούσαμε συνεπώς να συμπεράνουμε ότι η TDP1 ίσως μελλοντικά να αποτελεί έναν σημαντικό βιοδείκτη τόσο για την αποτελεσματικότητα της ιρινοτεκάνης όσο και για τη ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία. Αναμένονται μελέτες που να ξεδιαλύνουν το τοπίο αυτό.

Συνεχίζοντας, έχουμε αναφέρει το γονίδιο της απραταξίνης (APTX), το οποίο έχει βρεθεί να σχετίζεται με την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου στην καπτοθεκίνη, ενώ σε μεταστατικούς καρκίνους παχέος εντέρου, όσο αυξάνεται η έκφραση του ενζύμου, τόσο μειώνεται η αποτελεσματικότητα και η δραστηριότητα της ιρινοτεκάνης [67,68]. Σε μια παρακολούθηση 135 ασθενών με μεταστατική νόσο βρέθηκε ότι η ελεύθερης νόσου χρονική περίοδος, αλλά και η συνολική επιβίωση των ασθενών, είχαν σαφώς καλύτερα αποτελέσματα στις περιπτώσεις χαμηλής έκφρασης του APTX [68].

Τέλος, θα αναφερθούμε στο πρωτεϊνικό σύστημα επιδιόρθωσης MMR, για το οποίο έχει γίνει ανάλυσή του νωρίτερα. Μια μεγάλη μελέτη παρακολούθησε 1264 ασθενείς με σταδίου III αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, οι οποίοι έλαβαν αγωγή θεραπείας με 5FU/λευκοβορίνη+/- ιρινοτεκάνη και μετρήθηκε με ανοσοιστοχημικές μεθόδους η έκφραση των πρωτεϊνών του συστήματος MMR. Στους όγκους με χαμηλά επίπεδα MMR, όταν δόθηκε ιρινοτεκάνη, κατεγράφη υψηλότερη ελεύθερης νόσου επιβίωση στη πενταετία Τα αποτελέσματα δεν διέφεραν και σε περιπτώσεις που υπήρχε μεταστατική νόσος, πριν την έναρξη της χημειοθεραπευτικής αγωγής [69].

9.ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΣΤΟ DNA

ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΜΙΑ ΕΛΙΚΑ ΤΟΥ DNA

Η πολυμεράση PARP καταλύει την έναρξη των απαραίτητων διαδικασιών απάντησης του κυττάρου σε χημικές ή άλλες βλάβες που προκαλούνται στο γενετικό υλικό [70]. Η διαδικασία αναστέλλεται από μια γλυκοϋδρολάση (PARG) , που υδρολύει την PARP. Η σύνδεση της PARP στην έλικα του DNA έχει σαν αποτέλεσμα αρχικά τη σύνδεση του XRCC1(x ray repair cross complementing 1), ενός επιδιορθωτικού συμπλόκου το οποίο με τη σειρά του λειτουργεί σαν 'λιμάνι' για την πρόσδεση της TDP1 και της PNKP (polynucleotide kinase 3-rosphatase/δρα σαν συμπαραγοντας της TDP1). Ο τρόπος που λειτουργούν τα ανωτέρω ένζυμα προστατεύει ώστε να μη χαθεί καμία βάση από το γενετικό υλικό και να μην αλλοιωθεί η κωδικοποίηση. Η TDP1 αναγεννά 3-P' άκρα και η PNKP μετατρέπει 3-P' σε 3-OH' και 5-OH' σε 5-P', δημιουργώντας συνθήκες κατάλληλες να εργαστούν τα επιδιορθωτικά ένζυμα. Η επαναφορά των αρχικών 3-OH' και 5-P' μεσολαβείται από το ένζυμο LIG3, που υποκινείται από το XRCC1. Η LIG3 είναι μια DNA λιγκάση που επαναφέρει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στην αλληλουχία του γενετικού υλικού.

ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΔΙΠΛΗ ΕΛΙΚΑ ΤΟΥ DNA

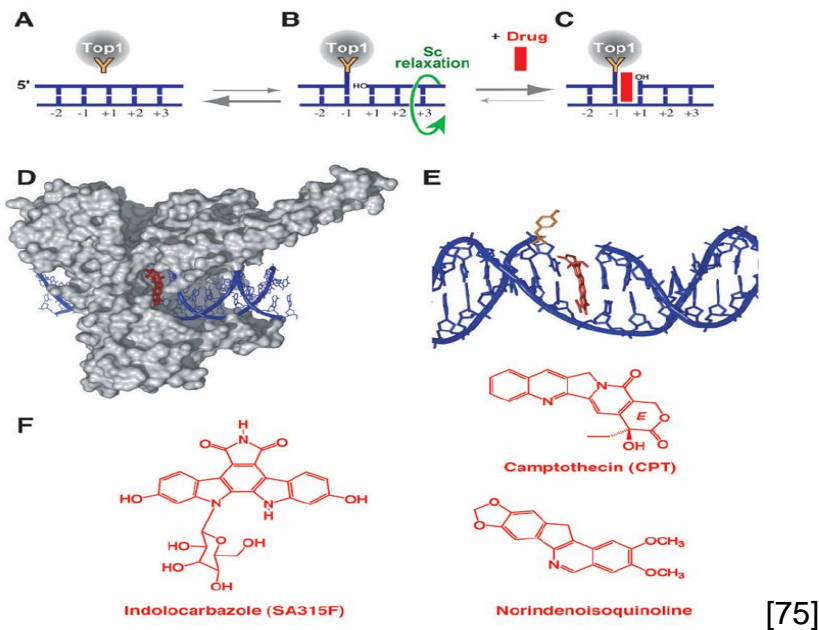
Η Top1 δημιουργεί ένα κενό στην αλληλουχία του γενετικού υλικού προκειμένου να ακολουθήσουν διαδικασίες αντιγραφής ή μεταγραφής. Στη φάση αυτή υποκινείται τα ένζυμο ATR το οποίο φωσφορυλιώνει το ένζυμο CHEK1(κινάση σερίνης θρεονίνης) που συμμετέχει στο για κάποιο διάστημα πάγωμα του κυτταρικού κύκλου. Δρα δηλαδή σαν σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου προκειμένου να μην συνεχιστεί εάν αναγνωριστεί η

οποιαδήποτε βλάβη στην γονιδιακή αλληλουχία. Ομοίως η ATM φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη CHEK2 [71].

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΑΥΞΑΝΟΥΝ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΗΝ ΚΑΠΤΟΘΕΚΙΝΗ

Για την επιδιόρθωση της μονής έλικας του DNA συμμετέχουν γονίδια όπως της PARP, XRCC1, PNKP, TDP1, για τη διπλή έλικα τα ATM-CHEK2, ATR-CHEK1, ενώ συμμετέχουν και τα προαναφερθέντα σιωπηλά γονίδια BRCA1/2, XRCC2,3. Μεταλλάξεις σε αυτούς τους επιδιορθωτικούς παράγοντες πιθανόν να αυξάνουν την ευαισθησία του κυττάρου στη δράση της CPT [72]. Δύο DNA ελικάσες (BLM/ bloom syndrome protein-WRN/ Werner syndrome helicase) έχει βρεθεί πως συμμετέχουν στη διόρθωση της βλάβης, που η CPT προκαλεί στο κύτταρο, ενώ μελέτες σε κύτταρα με έλλειψη της μιας έστω εκ των δύο, έδειξαν καλύτερη αποτελεσματικότητα της CPT [73].

Οι διασυνδεδετικές αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό (interstrand crosslinks), είναι βλάβες που συμβαίνουν ταυτόχρονα σε δύο διαφορετικές περιοχές της μιας έλικας του DNA, ή και στις δύο αντίθετες έλικες, δημιουργώντας γονιδιακές αλληλουχίες, οι οποίες προσδίδουν στο κύτταρο μεγαλύτερη ευαισθησία στην CPT. Αυτό προκαλείται μέσω ενός συμπλέγματος ενδονουκλεασών που επηρεάζει τη δράση του συστήματος επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού, καθώς δεν μπορούν τα επιδιορθωτικά ένζυμα να αναγνωρίσουν το σημείο που έχει δράσει η Τοπ1 και να επαναφέρουν την αλυσίδα προκειμένου το κύτταρο να συνεχίσει στον κυτταρικό κύκλο [74].



10.Η ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Έχει καταστεί σαφές πώς μέσω της απόπτωσης τα παθολογικά κύτταρα απομακρύνονται από τους ιστούς δίνοντας το χώρο σε λειτουργικά κύτταρα να αναπτυχθούν. Σε αντίθεση με τη νέκρωση, όπου προκύπτει λόγω έλλειψης απαραίτητων συστατικών για το κύτταρο ή όταν δεν πληρούνται οι κατάλληλες προϋποθέσεις περιβάλλοντος και προκύπτουν τοξικά για τους γύρω ιστούς προϊόντα, στην απόπτωση δεν επηρεάζονται αρνητικά οι γύρω κυτταρικές ομάδες. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο κυτταρικός θάνατος απαιτείται για την ανάπτυξη του οργανισμού. Στο έμβρυο για παράδειγμα απομακρύνονται οι μεσοδακτύλιες πτυχές για να αναπτυχθούν τα φυσιολογικά διαχωρισμένα δάχτυλα, άλλες φορές όταν ο ρόλος ενός κυτάρου έχει ολοκληρωθεί, τότε αυτό φεύγει από την κυκλοφορία, ενώ τέλος τη στιγμή που αναγνωρίζονται βλάβες σε ένα κύτταρο που θα οδηγήσουν σε παθολογική λειτουργία του, τότε αυτό πρέπει να αφαιρεθεί από τον οργανισμό, για την προστασία του.

Ενδοκυτταρικές πρωτεάσες έχουν ένα ενεργό άκρο κυστεΐνης όπου συνδέονται με πρωτεΐνες στόχους και μετονομάζονται σε κασπάσες. Παράγονται από κάθε κύτταρο σαν ανενεργά πρόδρομα στοιχεία, ενώ διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις εναρκτήριες και τις εκτελεστικές. Μία εναρκτήρια έχει την ικανότητα να ενεργοποιήσει πολλές εκτελεστικές κασπάσες. Καθώς το κύτταρο 'μπαίνει' στη διαδικασία της απόπτωσης, δεν μπορεί να επανέλθει, είναι δηλαδή μη αντιστρεπτή.

Η απόπτωση μπορεί να υποκινηθεί είτε από εξωκυττάρια σήματα είτε από το μιτοχονδριακό του κυττάρου σύστημα. Στο εξωκυττάριο μονοπάτι, ειδικές πρωτεΐνες συνδέονται σε υποδοχείς' θανάτου', όπως της οικογένειας TNF (παράγοντας νέκρωσης ου όγκου) που περιλαμβάνει δύο κατηγορίες υποδοχέων, τον TNF και τον Fas. Όταν συνδεθεί το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα με κάποια πρωτεΐνη, τότε το ενδοκυττάριο τμήμα του προσελκύει και συνδέει άλλες πρωτεΐνες με τελικό στόχο την ενεργοποίηση κασπασών. Αυτό είναι το λεγόμενο σύμπλεγμα DISC (death inducing signaling complex/σύμπλοκο που επάγει τον κυτταρικό θάνατο). Στο ενδοκυττάριο μιτοχονδριακό μονοπάτι, το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται στο κυτοσόλιο, συνδέει τη πρωτεΐνη Apaf1 (apoptotic protease activating factor-1/ παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικών πρωτεασών), η οποία ολιγομερίζεται σε ένα ολιγομερές που λέγεται αποπτώσωμα και ενεργοποιεί την κασπάση-9 [76].

Στο ενδοκυττάριο τώρα μονοπάτι υποκίνησης της απόπτωσης, είναι πολύ σημαντικό να ελέγχεται ότι η διαδικασία πραγματοποιείται μόνο όταν είναι απαραίτητο. Αυτόν τον έλεγχο ασκεί η οικογένεια πρωτεϊνών BCL2 (B-cell lymphoma-2). Αυτές οι πρωτεΐνες ασκούν τη δράση τους ελέγχοντας τη σωστή χρονικά απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c, με το να επικάθονται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Είναι σαφές λοιπόν πως για να ξεκινήσει η απόπτωση θα πρέπει να αδρανοποιηθούν οι Bcl-2 πρωτεΐνες. Αυτό γίνεται μέσω μιας υποοικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, τις BH3. Αυτές συνδέονται με τις Bcl-2 αδρανοποιώντας το αποπτωτικό τους τμήμα με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των Bax και Bak (που αποτελούν επίσης υποκατηγορίες της οικογένειας Bcl-2), όπου ενεργοποιούν την απελευθέρωση πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια. Εδώ φαίνεται και η λειτουργία του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 το οποίο αυξάνει την έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τις πρωτεΐνες BH3.

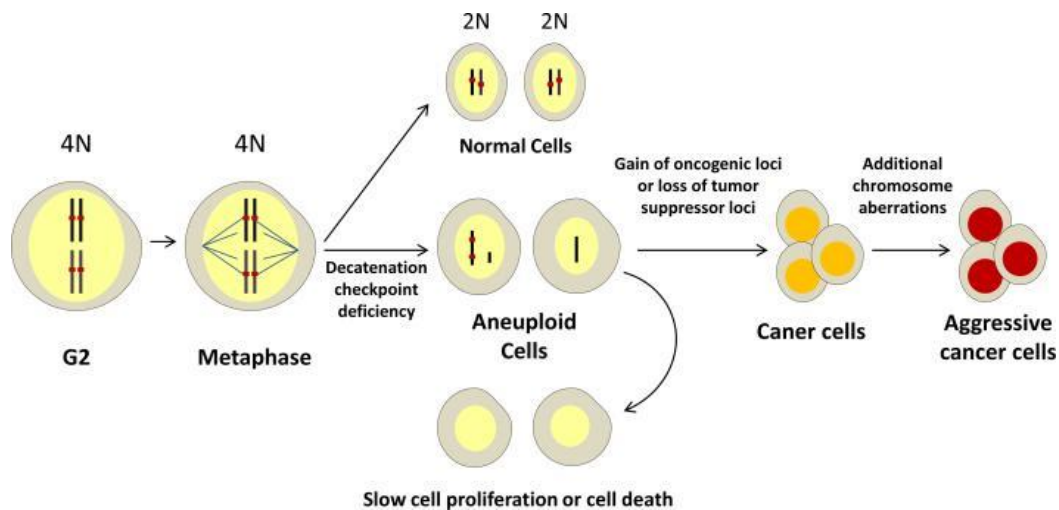
Το κύτταρο που έχει μπει στη διαδικασία της απόπτωσης, δεν διαλύεται, διότι έτσι τα ενδοκυττάρια προϊόντα του θα προκαλούσαν φλεγμονή η οποία σαφώς θα έβλαπτε και τα γειτονικά υγιή κύτταρα. Μια φωσφατιδυλοσερίνη διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και έρχεται σε επαφή τόσο με ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια τμήματα. Από τη μια μεριά το εσωτερικό του κυττάρου πέπτει και εξωτερικά ελκύονται μακροφάγα που θα φαγοκυτταρώσουν και τέλος θα απομακρύνουν από την περιοχή το κύτταρο. Αυτή βέβαια η διεργασία δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως και χρειάζονται περαιτέρω παρατηρήσεις και έρευνες [77].

11.Η ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ

Η χρωμοσωμική αστάθεια αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Κυρίως αναφέρεται στις περιπτώσεις εκείνες όπου τα καρκινικά κύτταρα έχουν υποστεί αρκετές μεταλλάξεις στο γενετικό τους υλικό [78]. Συνήθως είναι αποτέλεσμα βλαβών στο σύστημα επιδιόρθωσης των γονιδίων (MMR), με πιο συχνές περιπτώσεις γονιδίων, τα MLH1 και MSH2 [79]. Παρ' όλα αυτά οι αιτίες που θα οδηγήσουν σε χρωμοσωμική αστάθεια δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Πολλά από τα καρκινικά κύτταρα στα οποία μελετήθηκε η χρωμοσωμική αστάθεια, ήταν ανευπλοειδικά κύτταρα, άρα θα μπορούσαμε να πούμε ότι διαταραχές στη διεργασία της μίτωσης ανήκουν στις αιτίες του ασταθούς αυτού φαινοτύπου. Άλλωστε η μίτωση περιλαμβάνει αρκετούς ελεγκτικούς μηχανισμούς, λόγω της μεγάλης σημασίας που έχει και είναι δυνατό μια απορρύθμιση σε κάποιο στάδιο να διαταράξει τις ισορροπίες στο γονιδίωμα. Τα στάδια της μίτωσης είναι:

- πρόφαση
- προμετάφαση
- μετάφαση
- ανάφαση
- τελόφαση

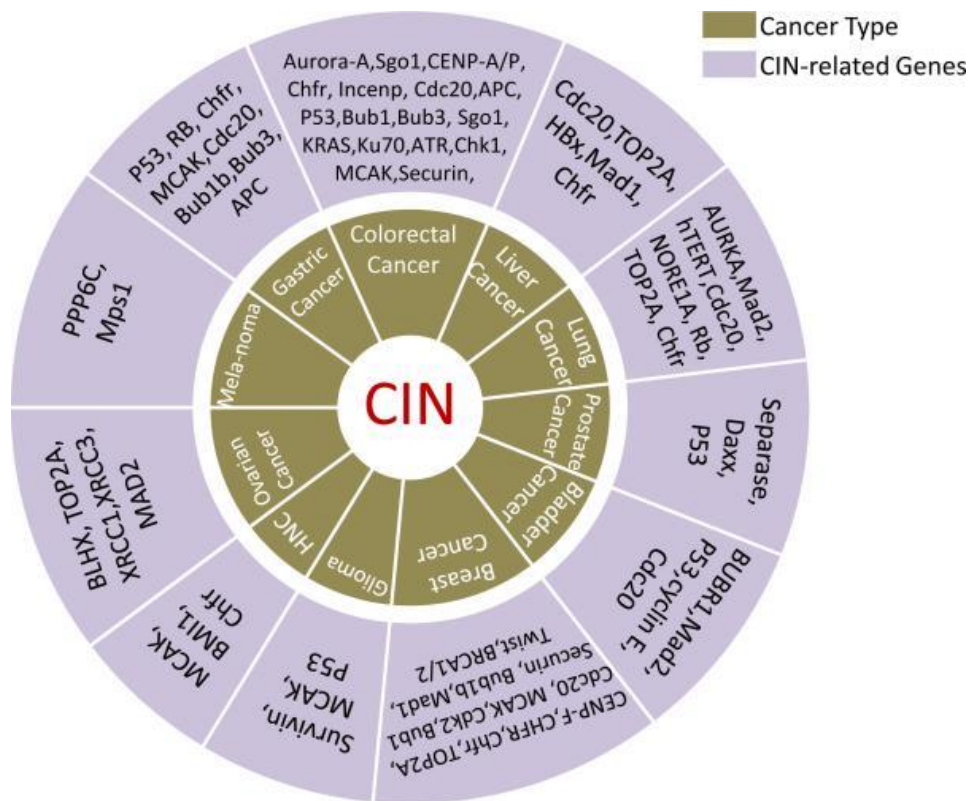
Σε κάθε ένα αυτά ασκείται έλεγχος τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος του βήματος, έτσι ώστε να διατηρείται η ομαλή μετάβαση από το ένα στάδιο στο επόμενο. Οι αδερφές χρωματίδες αφού συμπυκνώνονται προσανατολίζονται κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και στη συνέχεια απωθούνται στους δύο πόλους του κυττάρου προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός. Είναι απαραίτητο σε κάθε νέο κύτταρο που θα δημιουργηθεί να κατανέμονται ίσα τα χρωμοσώματα. Η Τοποισομεράση IIa (TopIIa) έχει έναν ιδιαίτερο ρόλο συμμετέχοντας στις διαδικασίες που θα δώσουν στα χρωμοσώματα τη σωστή κατεύθυνση στο σύστημα των μικροσωληνίσκων. Αν τα χρωμοσώματα δεν έχουν το σωστό προσανατολισμό τότε παρατηρείται διαταραχή στο διαχωρισμό τους. Αυτό θα οδηγήσει σε ελαττωματικό γενετικό υλικό στα κύτταρα που θα δημιουργηθούν και μπορεί να οδηγήσει σε καρκινική μετατροπή τους, αν αποκτήσουν λόγω των μεταλλάξεων υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και διείσδυσης [79].



Οι διαταραχές στη μίτωση και η χρωμοσωμική αστάθεια [82]

Συνεπώς η χρωμοσωμική αστάθεια περιλαμβάνει τις περιπτώσεις εκείνες όπου τα χρωμοσώματα δεν διαχωρίζονται σωστά στα νέα κύτταρα, είτε με προσθήκη χρωμοσώματος είτε με έλλειψη, οδηγώντας σε ανευπλοειδή κύτταρα. Πέρα όμως από την αλλαγή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων, βλάβες μπορεί να υπάρξουν και στην αρχιτεκτονική τους, με ελλείψεις τμημάτων ή διαμεταθέσεις. Όλες αυτές οι περιπτώσεις έχουν σαν αποτέλεσμα την χρωμοσωμική αστάθεια [81].

Αρκετοί καρκινικοί υπότυποι και μάλιστα επιθετικοί έχουν ως βασικό τους στοιχείο τη χρωμοσωμική αστάθεια. Σε φυσιολογικούς οργανισμούς η ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων, σε απόλυτο αριθμό, αλλά και στη δομή τους, είναι βιοτικής σημασίας. Η ανευπλοειδία πιστεύεται ότι απαντάται μόνο στον ανθρώπινο οργανισμό. Σε αντίθεση με τα πολυπλοειδικά κύτταρα όπου υπάρχει ένα επιπλέον ζεύγος χρωμοσωμάτων, στην ανευπλοειδία πρόκειται για ένα επιπλέον ή ένα λιγότερο χρωμόσωμα, με τον τελικό αριθμό χρωμοσωμάτων να είναι μονός, 45 ή 47. Τα καρκινικά όμως κύτταρα πέρα από την διαταραχή που υπάρχει όσον αφορά τον αριθμό των χρωμοσωμάτων, διακρίνονται και από μεταλλάξεις στο ήδη υπάρχον γονιδίωμά τους [79].



CIN: chromosome instability

Η χρωμοσωμική αστάθεια σε συμπαγείς όγκους και τα σχετιζόμενα γονίδια [80].

Το αν η χρωμοσωμική αστάθεια αποτελεί εναρκτήριο διαδικασία της καρκινογένεσης ή συμμετέχει στην καρκινική μετατροπή είναι ακόμα αναπάντητο ερώτημα. Πολλοί πιστεύουν ότι οι βλάβες στα χρωμοσώματα διαταράσσουν μηχανισμούς που μπορεί να οδηγήσουν στη καρκινογένεση, ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι ο καρκινικός φαινότυπος των κυττάρων έχει σαν ένα ακόμα επακόλουθο την χρωμοσωμική αστάθεια [83,84]. Σε κάθε περίπτωση πάντως, είναι ένα αρκετά ενδιαφέρον ζήτημα, που θα ξεκαθαρίσει λίγο ακόμα το πεδίο της καρκινικής μετατροπής ενός αρχικά φυσιολογικού κυττάρου [85].

Για να γίνει καλά κατανοητός ο ρόλος της χρωμοσωμικής αστάθειας στην καρκινογένεση, πρέπει να έχει πρώτα αποσαφηνιστεί η μοριακή βιολογία του καρκίνου. Είναι αποδεκτό πως οι όποιες γενετικές αλλαγές, μπορούν να οδηγήσουν τα κύτταρα στην απόκτηση νέων δυνατοτήτων, όπως είναι το ταχύ δυναμικό πολλαπλασιασμού και η αυξημένη ικανότητα μετάστασης [86]. Έτσι ο πληθυσμός των κυττάρων αυξάνεται δίχως να μπορεί να τα καταστρέψει ο οργανισμός, αφού καταφέρνουν με διάφορους τρόπους να διαφεύγουν την

απόπτωση και καταφέρνουν αν επιβιώνουν υπό συνθήκες που δεν θα άντεχε ένα φυσιολογικό κύτταρο. Το ογκογενετικό δυναμικό αυξάνεται, με το κατασταλτικό να μειώνεται. Όμως, η χρωμοσωμική αστάθεια δεν οδηγεί πάντα στην καρκινογένεση ούτε παρατηρείται σε όλα τα καρκινικά κύτταρα. Αυτό σημαίνει πως συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες, είναι δηλαδή μια πολυσταδιακή διεργασία με αρκετά σημεία ελέγχου που θα μπορούσε η θεραπευτική να στοχεύσει. Ευτυχώς οι νέες τεχνικές που μας δίνουν εικόνα των χρωμοσωμάτων ξεδιαλύνουν το τοπίο, αφού μάθαμε σε μεγάλο βαθμό ορισμένες απαλοιφές γονιδίων ή κάποιες αριθμητικές ανωμαλίες, που σχετίζονται με καρκινικό φαινότυπο [87,88].

Η ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΣΤΟΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

Οι χρωμοσωμικές αλλαγές που μπορούν να οδηγήσουν σε χρωμοσωμική αστάθεια συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων [79]. Πάνω από 100 γονίδια έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στο σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, μέσω των πρωτεϊνικών προϊόντων τους και σε ορισμένα από αυτά οι βλάβες έχουν σαν αποτέλεσμα τη μη σωστή ανακατεύθυνση[85]. Ένα πολύ σημαντικό σύμπλεγμα είναι το APC/C (το σύμπλεγμα που προωθεί την ανάφαση). Για την ενεργοποίησή του απαιτείται η πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου 20 (CDC20) με συνεργάτες τη σεκουρίνη και την κυκλίνη B1 [89]. Η μείωση της σεκουρίνης οδηγεί σε απελευθέρωση της σεπαράσης που διασπά τους συνδέσμους κοεσίνης των χρωμοσωμάτων. Αυτές οι συνδέσεις διατηρούν τις αδερφές χρωματίδες μαζί. Η ΤοπIIa που θα αναλυθεί παρακάτω συνεργάζεται με το σύμπλεγμα APC/C/CDC20, προκειμένου να γίνει ο σωστός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων.

Protein	Description	Function
Bub1	Budding uninhibited by benzimidazole 1	Inhibit CDC20 by phosphorylation
Bub1b	Bub1p	Encoding Bub receptor 1 protein
Bub3	Budding uninhibited by benzimidazole 3	Localize Bub1 and BubR1 to kinetochores
Mad1	Mitotic arrest deficient 1	Recruit Mad2 to unattached kinetochores

Protein	Description	Function
Mad2	Mitotic arrest deficient 2	Bind to CDC20 and inhibit APC/C activity
Cenp-E	Centromere protein E	Activate Bub1 at the unattached kinetochore
CMT2	Charcot-Marie-Tooth gene 2	Inhibit mitotic checkpoint signaling by antagonizing MAD2
MPS1	Monopolar spindle 1	Phosphorylate Bub1
ZW10	Zeste white 10 protein	Recruit the MAD1–MAD2 heterodimer to unattached kinetochores
ROD	Rough deal protein	Recruit the MAD1–MAD2 heterodimer to unattached kinetochores
Zwilch	N/A	Recruit the MAD1/2 heterodimer to unattached kinetochores
Securin	N/A	Activate separase
Separase	N/A	Cleave the cohesion links
CDC20	Cell-division cycle protein 20	Cofactor of APC/C
Cdh1	Cadherin-1	Cofactor of APC/C
TOP2A	Topoisomerase IIalpha	Decatenation checkpoint, separate knotted and intertwined DNA molecules, decatenate intertwined daughter DNA duplexes
Chfr	Checkpoint with Forkhead and RING finger domains	E3 ubiquitin ligase, inhibit cyclin B nuclear import, regulate Mad2 and BubR1 functions
Nup98	Nucleoporin 98	Prevent cohesion degradation
Rae1	Bub3-related protein RNA export factor 1	Prevent cohesion degradation
RanBP2	Ran binding protein 2	Promote disentanglement of sister chromatids
Plk1	Polo-like kinase I	Phosphorylate and remove cohesion complex proteins
Sgo1	Shugoshin 1, inner centromere protein	Counteract phosphorylation of cohesion; may directly inhibit separase
Incenp	Inner centromere protein	Localize along chromosome arms in anaphase
Cdc5	Polo-like kinase	Phosphorylate and remove meiotic cohesin
Survivin	Inhibitor of apoptosis protein	Unclear; may play multiple roles in regulating apoptosis

Protein	Description	Function
		and cell division
MCAK	Mitotic centromere-associated kinesin	Coordinate onset of sister centromere separation
Orc6	Origin recognition complex 6	Coordinate chromosome replication and segregation
MIIIP	Migration and invasion inhibitor protein	Interact with CDC20 and inhibit APC/C activity

Γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν στο σωστό διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων [90].

12.ΛΙΓΑ ΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από δύο κυρίως στάδια, όπου το ένα είναι η μεσόφαση και το άλλο η μίτωση. Η μεσόφαση διακρίνεται στα βήματα G1, S, G2. Στο βήμα S γίνεται ο διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων και στην συνέχεια στη μίτωση γίνεται ο διαχωρισμός. Η χρονική διάρκεια της μεσόφασης είναι περίπου 23 ώρες, ενώ η μίτωση διαρκεί σχεδόν 1 ώρα. Αρκετές φορές τα κύτταρα πριν εισέλθουν στη φάση G1, παραμένουν σε μια ενδιάμεση αδρανή φάση που λέγεται G0. Εκεί είναι έτοιμα όταν οι συνθήκες το απαιτούν για να συνεχίσει ο πολλαπλασιασμός τους, κάτι το οποίο μπορεί να μη συμβεί καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κυττάρου [91].

Σε όλο το κυτταρικό κύκλο υπάρχουν 3 βασικά σημεία που ελέγχουν την ακεραιότητα της διαδικασίας, προκειμένου ο κυτταρικός διαχωρισμός να είναι φυσιολογικός:

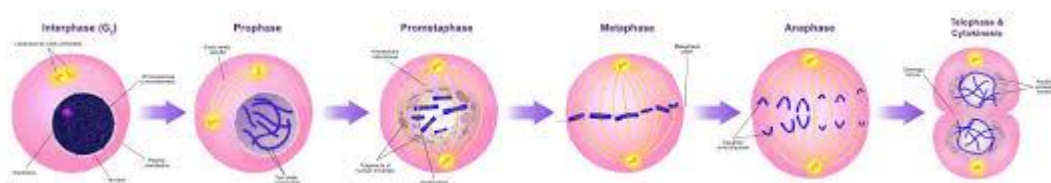
- G1, κατά την είσοδο του κυττάρου στη φάση αυτή
- G2/M, πριν το κύτταρο εισέλθει στη μίτωση
- Στάδιο μετάφασης - ανάφασης

Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε διάφορα σημεία ελέγχουν τη διαδικασία στα σημεία ελέγχου.

Η μίτωση διακρίνεται σε 5 σημεία, πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση, τελόφαση [92].

Οι κυκλιοεξαρτώμενες κινάσες (Cdks), είναι πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται μόνο όταν συνδεθούν η κάθε μια με την κατάλληλη κυκλίνη [93]. Τα επίπεδα των κινασών είναι πάντα σταθερά σε αντίθεση με τις κυκλίνες που τα επίπεδά τους προσαρμόζονται στο στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Οι κυκλίνες κατηγοριοποιούνται σε 4 βασικές κατηγορίες:

- G1/S-κυκλίνες: κατά την έναρξη του κυτταρικού κύκλου
- S-κυκλίνες: παραμένουν μέχρι την έναρξη της μίτωσης
- M-κυκλίνες :όταν το κύτταρο πια εισέρχεται στη μίτωση, μετά τα μισά της μίτωσης τα επίπεδα τους υποχωρούν
- G1-κυκλίνες:δρουν συνεργικά με τις G1/S-κυκλίνες. [94]

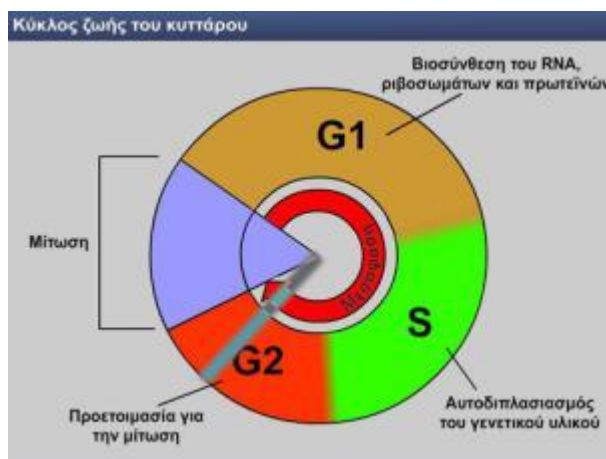


[96]

Όταν απουσιάζει η κυκλίνη που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της αντίστοιχης κινάσης, τότε το σημείο πρόσδεσης της κινάσης σχηματίζει μια θηλιά και το ένζυμο είναι ανενεργό, στο σημείο αυτό εισέρχονται οι καταστολείς των κινασών όπως οι πρωτεΐνες Wee1 που φωσφορυλιώνουν το σημείο πρόσδεσης, ενώ αντίστοιχα μέσω αποφωσφορυλίωσης από φωσφατάσες όπως η Cdc25, επανενεργοποιείται η κινάση.

Κατά τη διάρκεια της μίτωσης σχηματίζεται ένα σύμπλοκο που προωθεί την διεργασία της ανάφασης και συμβολίζεται ως APC/C (anaphase promoting complex or cyclosome) και θα το αναφέρουμε πλέον ως κυκλόσωμα [95]. Το κυκλόσωμα αρχικά μέσω ουμπικουιλίνωσης καταστρέφει τη σεκουρίνη, μια πρωτεΐνη που διατηρεί τις συνδετικές σχέσεις μεταξύ των αδελφών χρωματίδων. Μόλις συμβεί αυτό, οι χρωματίδες μπορούν να αρχίσουν να διαχωρίζονται. Επιπλέον φωσφορυλιώνει τις κυκλίνες S και M, με συνέπεια την απενεργοποίηση των αντίστοιχων κινασών, προκειμένου να ευνοηθεί πια η μίτωση.

Κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου γίνεται ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού. Για να ξεκινήσει, πρέπει αρχικά να διαχωριστούν οι δύο έλικες, με τη βοήθεια ενζύμων που λέγονται ελικάσες. Εκεί σχηματίζεται το σύμπλοκο ORC(origin recognition complex), το οποίο περιέχει ενεργοποιητές και καταστολείς κινασών και είναι υπεύθυνο για τη σωστή πρόσδεση των ελικασών στο γενετικό υλικό. Στο τέλος της S φάσης προκύπτουν οι αδερφές χρωματίδες, οι οποίες παραμένουν όμως συνδεδεμένες με τη βοήθεια των κοεσινών.



[97]

Στη μίτωση υπάρχουν ειδικά ένζυμα, όπως οι Polo-like κινάσες και οι Aurora-A, όπου βοηθούν να προσανατολιστούν σωστά στο δίκτυο των μικροσωληνίσκων οι αδερφές χρωματίδες, προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός τους. Στο στάδιο αυτό η κινάση M-Cdk είναι ενεργοποιημένη. Πριν αρχίσει ο διαχωρισμός, οι χρωματίδες συμπυκνώνονται αρκετά και σχηματίζουν σχεδόν ευδιάκριτες δομές, έτοιμες για απομάκρυνση η μία από την άλλη. Η συμπύκνωση υποβοηθείται από τα ένζυμα κοντενσίνες.

Η μιτωτική άτρακτος όπως έχουμε προαναφέρει αποτελείται από το δίκτυο των μικροσωληνίσκων, ενώ υπάρχουν 3 κατηγορίες μικροσωληνίσκων:

- οι εσωπολικοί, που δημιουργούν τους δύο αντίθετους πόλους της ατράκτου

- το κινετοχώριο, στο κέντρο των χρωματίδων και τις κατευθύνει σταδιακά στα άκρα
- οι αστρικοί που συνδέουν τα άκρα των μικρωσωληνίσκων στη μεμβράνη του κυττάρου, για να υπάρχει σταθερότητα

Κάθε κύτταρο περιέχει το κεντρόσωμα, ένα οργανίδιο που διπλασιάζεται στη φάση S και είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της μιτωτικής ατράκτου των κυττάρων που θα σχηματιστούν, συνεπώς κάθε νέο κύτταρο έχει και από ένα κεντρόσωμα. Στη μίτωση, λοιπόν οι αδερφές χρωματίδες διαχωρίζονται και κινούνται προς τους αντίθετους πόλους.

Ένα σημαντικό στοιχείο του κυτταρικού διαχωρισμού είναι και ο διπλασιασμός του κυτταροπλάσματος και ο σωστός διαχωρισμός της μεμβράνης προκειμένου τα νέα κύτταρα να είναι ίδια. Αυτό ξεκινάει μέσω ενός δακτυλίου από ακτίνη και μιοσίνη που σχηματίζεται στο κέντρο των κυττάρων μετά όμως το διαχωρισμό των χρωματίδων. Κατά τη συμπίεση αυτού του δακτυλίου προκύπτει το μεσόσωμα που περιέχει το τελικό υπόλειμμα από τη μιτωτική άτρακτο. Μόλις κι αυτό συμπιεστεί τόσο όσο να διαχωριστούν τα κύτταρα, ο κυτταρικός κύκλος έχει ολοκληρωθεί.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Υπάρχουν 3 κατηγορίες ελεγκτικών μηχανισμών για τον έλεγχο του φυσιολογικού διαχωρισμού ενός κυττάρου:

- μιτογόνα, που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση ή μη, διαφόρων κυκλινοεξαρτώμενων κινασών
- αυξητικοί παράγοντες, που επάγουν την αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού
- παράγοντες επιβίωσης, που προστατεύουν το κύτταρο από μηχανισμούς απόπτωσης

Όταν το κύτταρο είναι στη φάση G₀ ενεργοποιούνται οι MAP κινάσες (mitogen activated protein kinases), οι οποίες ενεργοποιούν τις κατάλληλες κινάσες για να εισέλθει το κύτταρο στη φάση G₁. Αυτό γίνεται μέσω μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο Myc. Αργότερα δρουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας E2F, όπου ρυθμίζουν ένζυμα κατάλληλα για την έναρξη της φάσης S. Εδώ δρα και η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος αναστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων για τις πρωτεΐνες αυτές. Όταν αναγνωριστεί κάποια βλάβη στο

γενετικό υλικό δραστηριοποιούνται οι πρωτεΐνες ATM και ATR, οι οποίες συνδέονται σε συγκεκριμένα σημεία του γονιδιώματος μπλοκάροντας τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο αυτό. Ένας από τους στόχους είναι το γονίδιο p53, που επάγει την έκφραση του γονιδίου p21, με αποτέλεσμα την έκφραση μιας ανασταλτικής πρωτεΐνης για τις κινάσες G1/S-Cdks και S-Cdks και έτσι τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου [98].

Η ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ II

13.ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Οι τοποισομεράσες II (TopII) είναι ένζυμα που συμμετέχουν σε πολλές διεργασίες του γενετικού υλικού, από την αντιγραφή και τη μεταγραφή του, έως τη συμπύκνωση και την σωστή τοποθέτηση των χρωμοσωμάτων [99,100,101]. Στον άνθρωπο συναντάμε δύο ισομορφές, την A και τη B. Είναι ομοδιμερή με ομοιότητα σχεδόν 70% στην αλληλουχία αμινοξέων τους και γενικά παρόμοιες δράσεις [99,100]. Εκφράζονται από διαφορετικά γονίδια και συγκεκριμένα η TopIIa από το γονίδιο 17q21-22 και η TopIIβ από το 3p24 [99,102].

Όσον αφορά τις διαφορές τους η TopIIa είναι πιο απαραίτητη για την επιβίωση των υπό πολλαπλασιασμό κυττάρων και η παρουσία της σχετίζεται με την ανάπτυξη ενός κυττάρου. Σε ιστούς που δεν γίνεται κυτταρικός πολλαπλασιασμός υπάρχει σε χαμηλά επίπεδα, ενώ ένα ταχέως πολλαπλασιαζόμενο κύτταρο μπορεί να περιέχει έως και 500000 αντίγραφα του ενζύμου. Παραμένει συνδεδεμένη στα χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της μίτωσης αναδεικνύοντας τη χρησιμότητά της για την σωστή συμπύκνωση, αλλά και τοποθέτηση των χρωμοσωμάτων στη μιτωτική άτρακτο [103,104].

Από την άλλη μεριά η TopIIβ δεν είναι τόσο αναγκαία για την κυτταρική ανάπτυξη και τα επίπεδά της δεν μπορούν να αντικαταστήσουν πιθανή έλλειψη της TopIIa. Μάλιστα σχεδόν κάθε κυτταρικός τύπος έχει υψηλά επίπεδα της TopIIβ [99,103,105,106]. Διαχωρίζεται από τα χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της μίτωσης, εντούτοις φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο κατά τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται αναλόγως των αναγκών του οργανισμού [107-109].

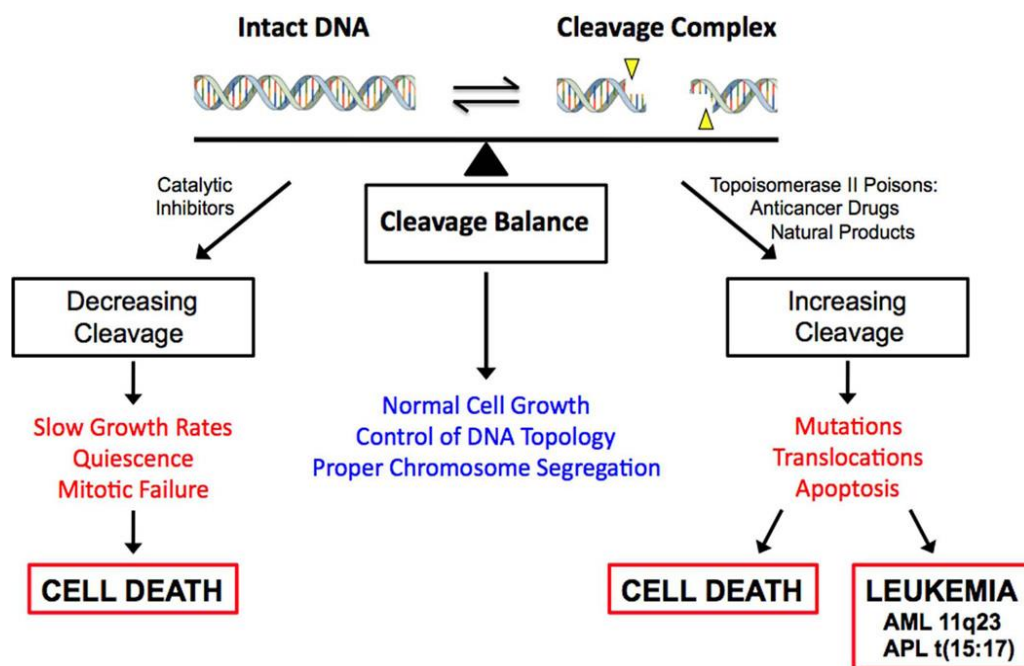
Μπορούμε έως τώρα να καταλάβουμε περίπου τη δράση των δύο ισομορφών της TopII. Η A είναι περισσότερο χρήσιμη στην κυτταρική ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό, ενώ η B ως ρυθμιστικό ένζυμο της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Παρόλο που υπάρχει αυτή η διαφορά

μεταξύ τους, τις περισσότερες φορές αναφέρεται σαν ένα ένζυμο, τοποισομεράσηII. Έτσι θα συνεχίσει να καταγράφεται και παρακάτω ως TopII.

Γενικά η TopII προκαλεί σπάσιμο στη διπλή έλικα του γενετικού υλικού, αποκαλύπτει το DNA στην περιοχή αυτή και στη συνέχεια αφού αποκατασταθεί η σωστή τοποθέτηση του DNA στο χώρο επανασυνδέει τα σπασμένα τμήματα [9-101,115]. Για τη λειτουργία της η TopII απαιτεί in vivo Mg καθώς και ATP, ενώ κατά τη μετακίνηση της έλικας δημιουργεί με το νεοσυσταθέν 5-άκρο δεσμούς φωσφοτυροσινικούς [110-114].

Μέσω της ομοδιμερούς κατασκευής του ενζύμου έχει την ικανότητα να δημιουργεί την πύλη από την οποία θα περάσει το DNA προκειμένου να λυθεί η 'θηλιά' και επιπλέον έχει δύο άκρα τυροσίνης για να συνδέεται σταθερά και ταυτόχρονα σε δύο σημεία της διπλής έλικας.

Όπως γίνεται, λοιπόν, κατανοητό η TopII είναι ένα ιδιαίτερο ένζυμο με πολύ σημαντικό ρόλο, αλλά ταυτόχρονα και πολύ επικίνδυνο αφού δύναται να διακόψει την γονιδιακή αλληλουχία [99-101, 116-117].



Αποτελέσματα μη σωστής δράσης της TopII [118]

Αυτό το σύμπλοκο που δημιουργεί με το γενετικό υλικό το ένζυμο είναι απαραίτητο για να συνεχισθούν σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες. Αν για παράδειγμα δεν σχηματισθεί, τότε κατά τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου δεν θα διαχωρισθούν σωστά τα χρωμοσώματα και θα αποτύχει η μίτωση, με διάφορες συνέπειες. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε με δημιουργία περισσότερων από όσων χρειάζεται συμπλόκων, είτε με υπολειτουργία του ενζύμου. Σε κάθε περίπτωση πάντως προκύπτουν αποτελέσματα που είναι καταστροφικά για τον οργανισμό [99,100,116,119-121]. Αν η θραύση αυτή στο γενετικό υλικό

δεν μπορεί να διορθωθεί επαρκώς, τότε συνήθως το κύτταρο είναι μη βιώσιμο, άλλες φορές πάλι η επιδιόρθωση δεν επαρκεί και προκύπτουν κύτταρα με διαφορετική από τη φυσιολογική λειτουργία, οδηγώντας σε ασθένειες όπως λευχαιμικού τύπου [122-124].

14.ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ

Αρκετές ουσίες χρησιμοποιούνται με στόχο να αυξήσουν τη δραστηριότητα της TopII, δημιουργώντας σύμπλοκα με την διπλή έλικα του DNA τα οποία δεν μπορούν να επανέλθουν, συνεπώς το σπάσιμο της αλυσίδας θα οδηγήσει το κύτταρο στον θάνατο [99,116,117].

Αυτές οι ουσίες διακρίνονται σε δύο γενικές κατηγορίες. Η μία είναι οι διαχωριστικές και η άλλη οι ομοιοπολικές.

Τα διαχωριστικά είναι αυτά που συνδέονται στο σύμπλοκο DNA-ενζύμου και καταλύουν τη συνεχή σύνδεση της TopII στις έλικες, προκειμένου να εμποδιστεί το κλείσιμο του ανοίγματος [125,126]. Αρκετά χημειοθεραπευτικά σκευάσματα δρουν με αυτόν τον τρόπο, όπως η ετοπποσίδη, η δοξορουβικίνη και τα βιοφλαβοβοειδή.

Τα ομοιοπολικά συνδέονται στα ενεργά άκρα της TopII που αλληλεπιδρούν με το γενετικό υλικό, αυξάνοντας τη δύναμη σύνδεσης του ενζύμου στο γενετικό υλικό. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν φάρμακα όπως οι κινόνες [127-130].

Σε αυτές τις δύο κατηγορίες ανήκουν αρκετά αντικαρκινικά φάρμακα, ενώ μάλιστα 6 έχουν πάρει έγκριση χορήγησης στην Αμερική [99,100,116,117]. Χρησιμοποιούνται είτε ως συνθετικά είτε ως φυσικά, προερχόμενα από φυσικές πηγές δηλαδή, για τη θεραπεία αρκετών κακοηθειών στον άνθρωπο. αξιόπιστο παράδειγμα είναι η ετοπποσίδη και η δοξορουβικίνη, που έχουν έγκριση για την αντιμετώπιση αρκετών συμπαγών όγκων, όπως στο αναπνευστικό, σε σαρκώματα και σε λευχαιμίες.

Σε γενικές γραμμές, τα όποια θεραπευτικά σκευάσματα έχουν αποτέλεσμα και στις δύο ισομορφές της TopII. Τώρα αν κάποιο δρα περισσότερο στην A ή στη B, αποτελεί θέμα υπό διερεύνηση. Δε μπορεί να αποδειχθεί πλήρως αυτή η 'προτίμηση', αν και επί του παρόντος δεν έχουν ακόμα αναφερθεί φάρμακα που να αναδεικνύουν ξεκάθαρη προτίμηση στη μία από τις δύο ισομορφές [131-133].

Είναι πολύ σημαντικό να ανακαλυφθούν φάρμακα που να είναι πιο εκλεκτικά. Για παράδειγμα, η καρδιοτοξικότητα της δοξορουβικίνης και άλλων ανθρακυκλινών οφείλεται να παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (αν και δεν υπάρχει ακόμα πλήρη συμφωνία των ερευνητών). Άρα αν ρυθμιστεί αυτό,

τότε τα φάρμακα θα μπορούν χορηγηθούν κατά περίπτωση και ανάλογα με τη γενική κατάσταση του ασθενούς. [134-136].

15.Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΟΠΟΙΣΙΜΕΡΑΣΗΣ II ΣΤΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ

Η ΤοpII, λοιπό, είναι ένα ένζυμο που μέσω ATP καταλύει το σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA προκειμένου να γίνει σωστή τοποθέτηση του γενετικού υλικού στο χώρο, αλλά και να μην υπάρχουν λάθη στη σωστή περιέλιξη της διπλής έλικας. Έχουμε επίσης δει έως τώρα τη χρησιμότητα του, στη σωστή συμπύκνωση και στον μετέπειτα διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης στον κυτταρικό κύκλο.

Όταν το γενετικό υλικό κατά τον κυτταρικό κύκλο αντιγράφεται, δημιουργούνται αρκετές θηλιές μεταξύ των αδερφών χρωματίδων, οι οποίες πρέπει να λυθούν και να διαχωριστούν σαφώς και με ακρίβεια τα χρωμοσώματα, για να κατευθυνθούν αντίθετα στη μιτωτική άτρακτο. Στη φάση G2, γίνεται ο έλεγχος του σωστού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων, όπου αν δεν υπάρξει έγκριση, καθυστερεί η έναρξη της μίτωσης [137-139]. Όπως έχουμε αναφέρει πιο πάνω αν οι διαδικασίες της συμπύκνωσης και αργότερα της σωστής ανακατεύθυνσης των χρωμοσωμάτων δεν γίνουν με απόλυτη ακρίβεια, μπορεί να προκύψει χρωμοσωμική αστάθεια στα κύτταρα που θα προκύψουν [138]. Η ΤοpIIα εκφράζεται κατά κύριο λόγο στη φάση G2 και στη μίτωση. Η λειτουργία της κρίνεται απαραίτητη πριν το κύτταρο εισέλθει στην ανάφαση. Μελέτες με αναστολείς του ενζύμου, ανέδειξαν πως υπήρχαν βλάβες στο γενετικό υλικό κατά τη δημιουργία του συμπλόκου έναρξης της ανάφασης και ως αποτέλεσμα υπήρξε η πολυπλοειδία. Αυτό αφορά κύτταρα ποντικών κατά τη μείωση [140,141].

Οι αναστολείς του ενζύμου της ΤοpII δρουν μειώνοντας τη μέσω ATP δραστηριότητα του σταθεροποιώντας το, χωρίς να επηρεάζουν τη σύνδεσή του στο γενετικό υλικό, όπως αντίθετα συμβαίνει με τους ενεργοποιητές [142]. Οι διοξοπιπεραζίνες αποτελούν ίσως τους πιο καλά μελετημένους αναστολείς, οι οποίοι δεν επάγουν το σπάσιμο της διπλής έλικας. Σε μελέτες με αναστολείς έχει φανεί πως επηρεάζεται η ανακατεύθυνση των χρωματίδων με αποτέλεσμα πολλές φορές τη δημιουργία πολυπλοειδικών κυττάρων. Ούτε και εδώ μπορεί να αποσαφηνισθεί μια ισομορφή ευθύνεται. Αυτό όμως που έχει σημασία είναι οι ανεπιθύμητες ενέργειες, που καθιστούν αναγκαία τη προσεκτική χορήγηση τους [143,144]. Όταν έγινε αναστολή του ενζύμου μετά τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, τα κύτταρα σταμάτησαν στη μετάφαση, απέτυχαν να διαχωριστούν σωστά και οδήγησε σε μεγαλύτερο ή μικρότερο

αριθμό χρωμοσωμάτων, κάτι που επιβεβαιώνει τη σημασία της TopII στην ανάφαση [145-148].

16.Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ

Γνωρίζουμε πλέον ότι τα επίπεδα της TopIIa φθάνουν στο μέγιστο τους στις φάσεις G2 και M, ενώ μειώνονται αρκετά με τη συμπλήρωση της διεργασίας της μίτωσης. Άρα η διακύμανση των επιπέδων του ενζύμου κατά τα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου πρέπει να διατηρείται σε αυστηρά ρυθμισμένα όρια έτσι ώστε να προχωράει σωστά ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων στα νέα κύτταρα [149]. Στο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την TopIIa υπάρχει μια ρυθμιστική περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για τη σωστή ανάλογα με τις απαιτήσεις παραγωγή του ενζύμου. Αυτή η περιοχή αποτελείται από δύο κύκλους GC και πέντε CCAAT. Αρκετά μόρια επηρεάζουν την ενεργοποίηση αυτού γονιδίου μεταξύ των οποίων είναι και η κατασταλτική πρωτεΐνη TP53. Η επιρροή σε αυτήν την περιοχή συνήθως γίνεται μέσω ενός μεταγραφικού παράγοντα NF-Υ. Όταν τα επίπεδά του είναι μειωμένα τότε έχει παρατηρηθεί και αντίστοιχα μειωμένη έκφραση του ενζύμου [150-153].

Οι αλληλουχίες GC είναι πολύ συχνές σε ρυθμιστικές των γονιδίων περιοχές. Όσον αφορά την TopIIa υπάρχουν δύο εκκινητές, GC1 και GC2. Η GC1 είναι συνήθως υπεύθυνη για τη μεταγραφή του γονιδίου, ενώ η GC2 ρυθμίζει τα επίπεδα του ενζύμου στο κύτταρο. Οι βασικές πρωτεΐνες που δρουν σε αυτές τις περιοχές είναι οι SP1 και Sp3 αντίστοιχα [154]. Η SP1 είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής και αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου στο οποίο ενεργεί. Η SP3 όμως έχει διπλή δράση τόσο στον εκκινητή, όσο και στην πρωτεΐνη SP1. Η μείωση των επιπέδων της SP3 μπορεί να οδηγήσει σε αντίστοιχη μείωση της έκφρασης της TopII. Έχει φανεί επίσης, πως η αναλογία των επιπέδων SP1 και SP3 μπορεί να διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και εξαρτάται από τις μεταβολικές και άλλες ανάγκες του κάθε κυτταρικού ιστού, ξεχωριστά [155].

17.ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΟΠΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ II

Οι δράσεις της ΤοπII επηρεάζονται στα θηλαστικά σε μεγάλο βαθμό από ποικίλες άλλες πρωτεΐνες. Τα ένζυμα αυτά μέσω διαδικασιών όπως η φωσφορυλίωση ή η ουμπικουιλίνωση, τροποποιούν το τελικό ρόλο της ΤοπII, αφού προκαλούν αλλαγές στη στερεοδομή της. Επίσης, αν υπάρξει κάποια αλλαγή στη γονιδιακή αλληλουχία των γονιδίων που είναι απαραίτητα για την παραγωγή της ΤοπII, τότε το τελικό αποτέλεσμα θα διαφέρει σε σύγκριση με το αναμενόμενο φυσιολογικό.

ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ

Η φωσφορυλίωση αποτελεί μηχανισμό κλειδί στη ρύθμιση της λειτουργίας ενός ενζύμου και μάλιστα τροποποιεί την καταλυτική του ικανότητα [156,157]. Οι περισσότερες θέσεις φωσφορυλίωσης της ΤοπII βρίσκονται στο C τελικό άκρο. Υποστηρίζεται ότι αυτές οι περιοχές δεν είναι τόσο αναγκαίες για την ενζυμική δραστηριότητα της ΤοπII, όσο για τη σωστή τοποθέτηση της στον πυρήνα του κυττάρου. Αυτό μάλιστα επιβεβαιώνεται, διότι απαλοιφή σε αυτήν την περιοχή του ενζύμου δεν οδήγησε σε αδρανοποίηση [158,159]. Μια μελέτη υποστήριξε σε αντίθεση με τα ανωτέρω όμως, ότι όταν ένα σημείο σερίνης στο άκρο του ενζύμου της ΤοπII φωσφορυλιώθηκε ή όταν το άκρο σερίνης μεταλλάχθηκε σε αλανίνη, τότε παρατηρήθηκε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Επιπλέον, σχετίστηκε και με αυξημένη αντίσταση του ενζύμου στη δράση της ετοποσιδης [160]. Συνεπώς, δεν μπορεί να δοθεί

σαφή απάντηση, εντούτοις είναι ενδιαφέρον, διότι ίσως προκύψουν αργότερα συμπεράσματα που βελτιώσουν τα θεραπευτικά αποτελέσματα.

Τώρα, στην φωσφορυλίωση της ΤοπII συμμετέχουν αρκετά πρωτεϊνικά ένζυμα, με αρκετούς μάλιστα τρόπους. Μια πρωτεϊνική κινάση C, η κινάση κασεΐνης IIβ και η εξωκυτταρική σηματοδοτική κινάση-2, φαίνεται ότι με την επιρροή τους στην ΤοπII ενισχύουν τη δράση του ενζύμου, αυξάνοντας τη δραστηριότητά του [158,161]. Μια πρωτεΐνη της οικογένειας των μιτογόνων κινασών p38, η p38γ, ενεργοποιείται τόσο σε περιβάλλον κυτταρικού στρες, όσο και από σήματα που διεγείρουν μιτωτική δραστηριότητα στο κύτταρο. Αυτή η κινάση φαίνεται ότι φωσφορυλιώνοντας ένα άκρο της ΤοπII επηρεάζει όχι μόνο τη λειτουργία της, αλλά και τη σταθερότητά της [162]. Από τα ανωτέρω, αλλά και από άλλες μελέτες που έχουν γίνει ή που ιδενεργούνται τώρα, προκύπτει ότι η φωσφορυλίωση είναι μια διαδικασία που τροποποιεί την ενεργότητα της ΤοπII, αλλά και την ικανότητά της ως ενεργό μέλος της συμπύκνωσης και αργότερα της σωστής ανακατεύθυνσης των χρωματίδων στη μιτωτική άτρακτο [163].

ΟΥΜΠΙΚΟΥΙΤΙΝΩΣΗ

Το γονίδιο BRCA είναι γνωστό για το γεγονός, ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του έχει ογκοκατασταλτική δράση. Οι δράσεις της πρωτεΐνης που προέρχεται από αυτό το γονίδιο, είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν την απόκριση των ελεγκτικών μηχανισμών σε βλάβη του γενετικού υλικού, τη σωστή λειτουργία των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου για το διαχωρισμό των χρωματίδων, το διπλασιασμό του κεντροσώματος και το διαχωρισμό των αδερφών χρωματίδων [164]. Επίσης, επηρεάζει τη χρωμοσωμική σταθερότητα, αφού δύναται να τροποποιήσει τις διεργασίες σύνδεσης και αποσύνδεσης της ΤοpII στο γενετικό υλικό. Έρευνες σε ποντίκια με απαλοιφή αυτού του γονιδίου ανέδειξαν πολλές διαταραχές να εμφανίζονται στα χρωμοσώματά τους [165,166].

Έχουν υπάρξει αρκετές προσπάθειες να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της BRCA1 πρωτεΐνης στη ΤοpII, χωρίς ωστόσο να έχει προταθεί κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο. Πιστεύεται ότι δρα συνεργικά της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος [167,168], σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Σε αυτό το σύμπλοκο η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος είναι υπεύθυνη για την απενεργοποίηση της ΤοpII σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες.

ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΟΥΜΠΙΚΟΥΙΤΙΝΗΣ

Αποτελούν ένζυμα με δράση ουμπικουιτίνης σε μικρότερο όμως βαθμό, ενώ έχουν την δυνατότητα να αλλάξουν τον τρόπο δράσης της ΤοpII. Αρκετές βιοχημικές και άλλες μελέτες καταλήγουν στο κοινό συμπέρασμα ότι ο κυτταρικός κύκλος εξαρτάται εν μέρει από αυτά τα ένζυμα [169,170]. Μάλιστα έχει φανεί να αλλάζει η λειτουργία της ΤοpII στα εναρκτήρια στάδια της μίτωσης. Η αναστολή τους οδηγεί σε εσφαλμένο διαχωρισμό των χρωματίδων κατά την ανάφαση ενώ επηρεάζεται και η ικανότητα σύνδεσης της ΤοpII στα χρωμοσώματα [171,172]. Επίσης η πρωτεΐνη PIASγ μέλος της οικογένειας ανασταλτών STAT μαζί με τη λιγκάση E3 της οικογένειας ρυθμιστών με δράση ουμπικουιτίνης, ρυθμίζει τη σωστή τοποθέτηση της ΤοpII σε συγκεκριμένες περιοχές των χρωμοσωμάτων, που απαιτείται πιο εκτεταμένη δραστηριότητα του ενζύμου προκειμένου το κύτταρο να προχωρήσει στην ανάφαση [173]. Έλλειψη της πρωτεΐνης PIASγ σχετίζεται με ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου στη μετάφαση με αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο αυτό, ενώ μάλιστα οι αδερφές χρωματίδες παραμένουν συνδεδεμένες, αν και οι κοεσίνες έχουν απομακρυνθεί [174].

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η πρωτεΐνη RanBp2, η οποία είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη, που επηρεάζει την συμπυκνωση της ΤοπII. Η δραστηριότητα αυτής της πρωτεΐνης έγκειται κυρίως στο ότι κατευθύνει τα κεντρομερίδια των χρωματίδων στην ανάφαση. Σε περιπτώσεις έλλειψης της, παρέμειναν συνδετικές γέφυρες μεταξύ των αδερφών χρωματίδων και συνεπώς δεν έγινε σωστά ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων [175].

ΑΠΟΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ

Οι ακετυλάσες(HATs) και οι αποακετυλάσες(HDACs) είναι ένζυμα που δρουν στις ιστόνες που βρίσκονται στο DNA. Δύο οικογένειες αποακετυλασών, οι HDAC1 και HDAC2 σχετίστηκαν κυρίως με την ΤοπII σε μελέτες in vivo [176]. Ιδιαίτερα φαίνεται ότι αυξάνουν τη δραστηριότητα της ΤοπII, αν και ο μηχανισμός που οδηγεί σε αυτό το αποτέλεσμα δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Το μόνο σίγουρο και αποδεκτό είναι πως η ακετυλίωση και αντίστοιχα η αποακετυλίωση επηρεάζουν τη σύνδεση της ΤοπII στα χρωμοσώματα.

18.ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΗ II ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Μπορούμε έως τώρα να συμπεράνουμε ότι η ΤοπII αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαδραματίζει ιδιαίτερο ρόλο στην καρκινογένεση. Παρ' όλα αυτά δεν ενεργεί από μόνη της σαν ένζυμο, αλλά χρειάζεται αρκετά συνένζυμα που επηρεάζουν το διαχωρισμό των αδερφών χρωματίδων. Μεταλλάξεις, λοιπόν, στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ΤοπII μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκινικών κυττάρων. Αυτό το συμπέρασμα επιβεβαιώνεται από μελέτες σε αρκετές διαφορετικές κακοήθεις νόσους του ανθρώπου [177-179]. Για παράδειγμα σε καρκίνο ωοθηκών έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα τόσο της ΤοπII όσο και του mRNA κυρίως σε υψηλού βαθμού κακοήθειας και σε μεταστατικές περιπτώσεις, μάλιστα αυτό συσχετίστηκε και με χειρότερη πρόγνωση της νόσου [178]. Σε μια άλλη μελέτη σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, τα επίπεδα της ΤοπII ήταν αυξημένα στις περιπτώσεις που υπήρχε επίσης μεγαλύτερο ποσοστό υποδοχέων HER-2. Αυτό εν μέρει δικαιολογείται και από το γεγονός ότι τα γονίδια για τον υποδοχέα HER και για την ΤοπII είναι γειτονικά στο χρωμόσωμα 17 και πιθανόν η έκφραση του ενός επηρεάζει την έκφραση του άλλου. Στην ίδια συσχέτιση έρχεται και μια ακόμα μελέτη όπου αυξημένη

ενίσχυση του γονιδίου της ΤοπII βρέθηκε σε ποσοστό 39% των HER θετικών ασθενών και δεν ευρέθη στις περιπτώσεις ασθενών HER αρνητικών [180]. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί ότι η αυξημένη ενίσχυση του γονιδίου της ΤοπII θα οδηγήσει και σε αυξημένη έκφραση του ενζύμου [181].

Πέρα από τα ανωτέρω παραδείγματα αυξημένη έκφραση της ΤοπII έχει βρεθεί σε καρκίνο στόματος, οροφάρυγγα, οισοφάγου, πνεύμονα, ηπατοκυτταρικό και παχέος εντέρου. Σε αυτές τις κακοήθειες, τα επίπεδα του ενζύμου έχουν συσχετισθεί με επιθετικότερη νόσο και χειρότερη πρόγνωση των ασθενών [179].

BRCA1

Το ογκολατασταλικό γονίδιο BRCA1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q21,31. Όταν η έκφραση του γονιδίου βρίσκεται κάτω από τα απαιτούμενα επίπεδα, τότε ο κίνδυνος καρκινογένεσης αυξάνεται [182]. Επιπλέον, απώλεια του γονιδίου σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας ιστολογικά [183]. Στον καρκίνο του μαστού τα μειωμένα επίπεδα ευρίσκονται σε άτομα με σποραδικό καρκίνο μαστού, έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μεταστάσεων και χειρότερη πρόγνωση [184]. Σε γενικό ποσοστό, η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου μαστού σε περίπτωση μετάλλαξης του γονιδίου ποικίλλει από 50-80% [185]. Τέλος, μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν κατηγορηθεί και για καρκίνο προστάτη και παγκρέατος [186].

BRG1

Ένα άλλο γονίδιο που έχει ενοχοποιηθεί να δρα συνεργικά με της ΤοπII σε αρκετές καρκινικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου και του παχέος εντέρου, είναι το BRG1. Εδράζει στο χρωμόσωμα 19p13 και συνδέεται λειτουργικά όχι μόνο με την ΤοπII, αλλά και το p53 και το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος. Η απώλεια της έκφρασης του επιταχύνει την καρκινική μετατροπή. Συνεπώς, υπό φυσιολογικές συνθήκες πρόκειται για ένα ογκοκατασταλικό γονίδιο [187].

Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα τα επίπεδα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης ήταν πολύ χαμηλά, ενώ συσχετίστηκαν και με κακή πρόγνωση της νόσου [188]. Αλλού αναφέρεται ότι η μείωση της μεταγραφής του γονιδίου ίσως αποτελεί εναρκτήριο έναυσμα της καρκινογένεσης τη στιγμή που πλήρη απώλεια του γονιδίου προωθεί κυρίως την καρκινική μετατροπή, χωρίς να την εκκινεί [189].

19. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ ΤΟΠΙΣΟΜΕΡΑΣΗΣ II ΣΤΟ DNA

Η ΤοπII είναι ένα ένζυμο που απαιτεί ATP για τις διαδικασίες υδρόλυσης που επιτελεί. Όσο παρέχονται στο ένζυμο τα απαραίτητα μόρια ATP τόσο αυξάνεται η ικανότητα υδρόλυσης. Εδώ συμμετέχει μια πρωτεΐνη-υποομάδα ATPάσης (ISWI) , η οποία αλλάζει κατά τέτοιο τρόπο τη στερεοδομή του νουκλεοσώματος, έτσι ώστε να διευκολύνεται η σύνδεση στο ίδιο σύμπλοκο της ΤοπII [190].

Ένας ακόμα μηχανισμός που επηρεάζει τη σύνδεση της ΤοπII στο γενετικό υλικό είναι το επίσης εξαρτώμενο από το ATP, σύμπλεγμα SWI/SNF. Στα θηλαστικά αυτό το σύμπλεγμα αποτελείται από δύο τμήματα, τον παράγοντα BAF και τα αντίστοιχα με αυτό σύμπλοκα PBAF. Ο παράγοντας BAF περιλαμβάνει δύο καταλυτικές ATPάσες, τις BRG1 και BRM. Απουσία ιδίως της BRG1 έχει φανεί ότι επηρεάζει τόσο τη συνδετική ικανότητα της ΤοπII στο γενετικό υλικό, που ο κυτταρικός κύκλος πιθανόν να σταματήσει στο στάδιο της ανάφασης. Αρά η δράση της ΤοπII σχετίζεται άμεσα με τη λειτουργικότητα του συμπλόκου του παράγοντα BAF. Ομοίως και διάφορες μεταλλάξεις στη πρωτεΐνη BRG1 θα ελαττώσουν τη συνδεσιμότητα της ΤοπII με τη χρωματίνη [191].

Μια ακόμα ιδιαίτερα σημαντική πρωτεΐνη είναι η MDC1 (mediator to DNA damage checkpoint) η οποία αλληλεπιδρά με την ΤοπII. Μάλιστα σε μελέτη έχει βρεθεί πως στα 71 αμινοξέα του C τελικού τμήματος της ΤοπII, υπάρχει ένα αμινοξύ σερίνης, που σχετίζεται με τη σύνδεση της MDC1 στο μόριο της ΤοπII [192]. Μετάλλαξη σε αυτό το σημείο εμπόδισε τη σύνδεση αυτή. Κατά τη μετάβαση από τη φάση G2 στη φάση M, συμβαίνει φωσφορυλίωση στο αμινοξύ της σερίνης που επάγει τη σύνδεση της MDC1 στην ΤοπII προκρινόμενου το ένζυμο στη συνέχεια να προσδεθεί σωστά στη χρωματίνη. Αν και αυτή η σύνδεση δεν βρίσκεται κάτω από έλεγχο παύσης, δηλαδή αν δεν έχει πραγματοποιηθεί σωστά δεν διακόπτεται ο κυτταρικός κύκλος, εντούτοις σε επόμενη φάση δεν θα συνδεθεί σωστά η ΤοπII στο DNA και μέσω άλλου σημείου ελέγχου θα διακοπεί.

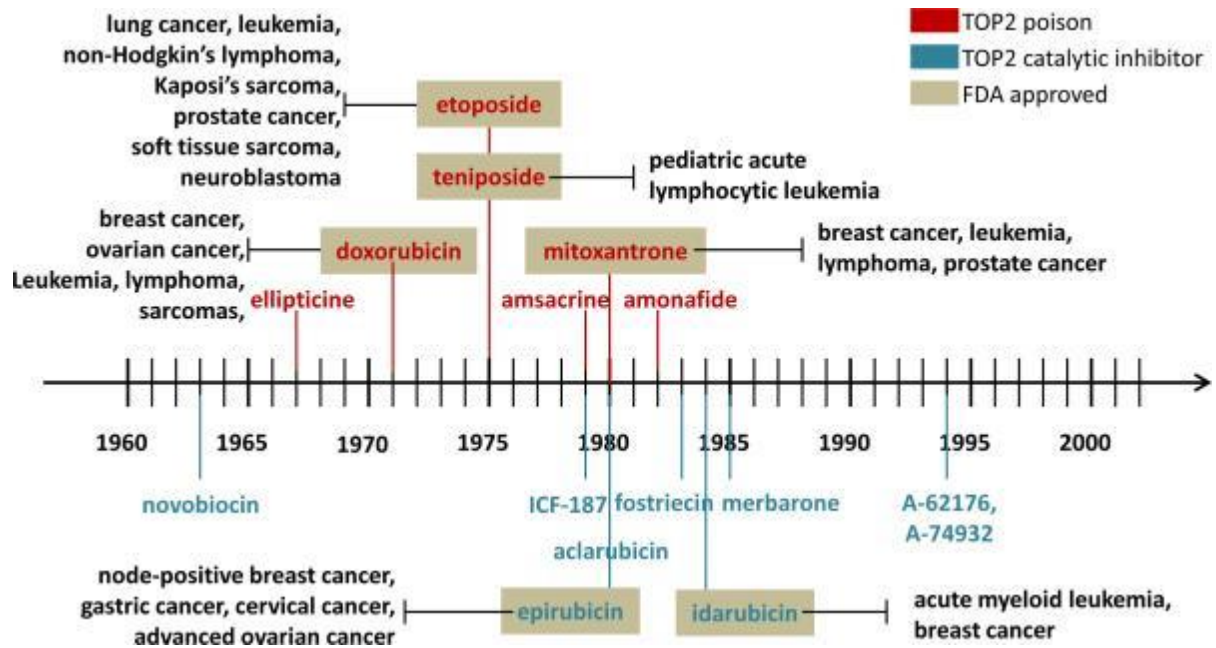
Οι ανωτέρω συνεπώς μηχανισμοί καταδεικνύουν τη πολυπλοκότητα της σύνδεσης της ΤοπII στο γενετικό υλικό. Υπάρχουν πολυάριθμοι παράγοντες που επηρεάζουν αυτή τη σύνδεση και ένα μικρό λάθος μπορεί να οδηγήσει σε

λάθος αποτελέσματα. Είναι απαραίτητο να αποσαφηνιστούν τα μονοπάτια και οι μηχανισμοί αυτοί προκειμένου να στοχοποιηθούν μόρια που θα εμποδίσουν την παραγωγή λάθος τελικών κυττάρων και άρα της καρκινογένεσης, χωρίς ωστόσο να υπάρξει μεταβολή και στους φυσιολογικούς μηχανισμούς των υγιών κυττάρων.

20.Η ΤΟΠΟΙΣΙΜΕΡΑΣΗ II ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Έχει καταστεί σαφές πλέον ότι είναι απαραίτητη η διατήρηση της ισορροπίας στους μηχανισμούς που επηρεάζουν τη σύνδεση της ΤοpII στο γενετικό υλικό. Οποιαδήποτε αλλαγή θα αλλάξει τις διαδικασίες αντιγραφής και διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Τα επίπεδα τόσο της ΤοpI όσο και της ΤοpII αντανακλούν τις ανάγκες που υπάρχουν στο κύτταρο τη δεδομένη χρονική στιγμή [193]. Τα επίπεδα της ΤοpII αυξάνονται έως και 3 φορές από τη φάση G2 σε M και κυρίως σε κύτταρα που χαρακτηρίζονται από ταχύ ρυθμό πολλαπλασιασμού λόγω αυξημένων αναγκών [194]. Στόχευση της ΤοpII θα μπορούσε συνεπώς να περιορίσει το δυναμικό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

Αρκετοί αναστολείς ή τροποποιητές της ΤοpII έχουν πάρει έγκριση στην Αμερική σαν χημειοθεραπευτικά μέσα, όπως είναι η ετοποσίδη, η τενιποσίδη, η δοξορουβικίνη, η ινταρουβικίνη, η επιρουβικίνη και η μιτοξαντρόνη. Η ετοποσίδη χρησιμοποιείται κυρίως στη θεραπεία νεοπλασμάτων του πνεύμονα σε νευροβλάστωμα, ενώ η τενιποσίδη κυρίως σε παιδιατρικούς ασθενείς με κακής πρόγνωσης οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία [194]. Από τις ανθρακυκλίνες η πιο ευρέως γνωστή είναι η δοξορουβικίνη, για τη θεραπεία συμπαγών όγκων. Είναι πολύ σημαντικό τα φάρμακα αυτά να χορηγούνται με τέτοιο τρόπο, ώστε να φθάνουν στο μέγιστο δυνατό της συγκέντρωσης τους στο κύτταρο, που να επηρεάσουν τη δράση της ΤοpII, προκειμένου να παύσει ο καρκινικός πολλαπλασιασμός, χωρίς όμως να εμφανίζονται τοξικές παρενέργειες στον οργανισμό .



[195]

Φάρμακα που στοχεύουν την ΤοπII

Τα φάρμακα που στοχεύουν την ΤοπII διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Με κόκκινο αυτά που επεμβαίνουν στο ένζυμο και με μπλε οι αναστολείς.

Γενετικές, αλλά και μοριακές μεταβολές που θα οδηγήσουν σε αύξηση των επιπέδων της ΤοπII ίσως να αποτελέσουν προβλεπτικούς παράγοντες προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη ανταπόκριση στα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα. Για παράδειγμα ασθενείς με καρκίνο και έλλειψη του TP53 παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα της ΤοπII και μεγαλύτερη ευαισθησία στα αντίστοιχα φάρμακα [196]. Επίσης μεταλλάξεις στον μεταγραφικό παράγοντα NF- γ που αλληλεπιδρά με τον εκκινητή του γονιδίου της ΤοπII, είχε συνέπειες στην τελική παραγωγή του ενζύμου [197]. Όσο γίνονται πιο κατανοητοί οι παράγοντες που δρουν μαζί με την ΤοπII τόσο θα αυξάνονται και τα θεραπευτικά μέσα.

Λόγω του γεγονότος πως η ΤοπII είναι ένα ένζυμο, είναι λογικό, πως όταν για ποικίλους λόγους έχει επηρεαστεί η παραγωγή του, τότε αναλόγως μειώνεται και το επιθυμητό αποτέλεσμα των φαρμάκων. Γνωρίζουμε μάλιστα πως η φωσφορυλίωση που λαμβάνει μέρος στο ένζυμο αν μεταβληθεί μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα σε ένα σκεύασμα, που κανονικά η ΤοπII είναι ευαίσθητη [198]. Υποφωσφορυλίωση της ΤοπII ίσως να είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη ανταπόκριση των φαρμάκων σε ορισμένους ασθενείς. Από την άλλη μεριά αναστολή των κινασών ERK1 και ERK2 αίρει την παύση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G2/M που προκαλεί η ετοπιοσίδη [199]. Πέρα όμως από τη φωσφορυλίωση και η ουμπικουιλίνωση, όπως έχουμε δει προηγουμένως, ρυθμίζει τον τρόπο δράσης του ενζύμου. Μάλιστα, ουμπικουιλίνωση του BRCA1 μειώνει τη δραστηριότητα της ΤοπII

[200]. Απώλεια της κανονικής λειτουργίας του BRCA1 ενισχύει την ευαισθησία των κυττάρων στη δράση της ετοποσιδής [201].

Ένα ιδιαίτερο κλινικό σημείο που περιορίζει τη χρήση των ανωτέρω σκευασμάτων, είναι η σχέση που έχουν με την εμφάνιση δευτερογενών όγκων. Η ετοποσιδή για παράδειγμα που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία αρκετών κακοηθειών, φαίνεται πως αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης λευχαιμίας και κυρίως οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Πιθανών δρα στη γονιδιακή περιοχή 11q23 που σχετίζεται με τη λευχαιμία. Αυτός ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου είναι μάλιστα δόσοεξαρτώμενος. Όταν η δόσολογία της ετοποσιδής είναι $>2 \text{ g/m}^2$ τότε η πιθανότητα εμφάνισης λευχαιμίας είναι 336 φορές μεγαλύτερη από ότι αν η δόση είναι $<2 \text{ g/m}^2$ [202].

Ένα βέβαια μεγάλο πρόβλημα που χρειάζεται να αντιμετωπισθεί είναι αυτό της αντοχής των κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της TopII έχουν βρεθεί σε τέτοιες περιπτώσεις. Αρκετά γονίδια που σχετίζονται με τη χρωμοσωμική αστάθεια επηρεάζουν τη τελική λειτουργικότητα της TopII και σαν συνέπεια την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων. Παρόλα αυτά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σε αυτό το πεδίο που να οδηγήσουν σε νέες μεθόδους αποφυγής αυτής της ανθεκτικότητας.

21.ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΤΟΠΟΙΣΟΜΕΡΑΣΕΣ I ΚΑΙ II

Αναστέλλοντας την TopI παραμένουν στην διπλή έλικα του DNA θραύσματα τα οποία ενεργοποιούν μηχανισμούς επιδιόρθωσης για τη σταθεροποίηση του γενετικού υλικού. Στα καρκινικά μάλιστα κύτταρα, αυτοί οι μηχανισμοί είναι περισσότερο δραστικοί με αποτέλεσμα να μειώνεται το επιθυμητό αποτέλεσμα των φαρμάκων. Συνεπώς καθίσταται απαραίτητο μαζί με την αναστολή της TopI να επιτευχθεί και αποσιώπηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών προκειμένου τελικά να διακόπτεται ο κυτταρικός κύκλος. Η δυσκολία σε αυτό έγκειται στο γεγονός πως σε κάθε τύπο καρκίνου συμμετέχουν πολλές φορές και διαφορετικοί μηχανισμοί και έτσι χρειάζεται εξατομίκευση της θεραπείας. Αυτό θα φέρει καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα και καλύτερη πρόγνωση των ασθενών.

Από την άλλη μεριά τα τελευταία χρόνια υπάρχει ενδιαφέρον για τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, όπως μπορεί να συμβεί για παράδειγμα από την ακτινοβολία. Η διόρθωση του γενετικού υλικού

δύναται να επιτευχθεί με φάρμακα που ενισχύουν τη δράση της ΤοπI. Όλα αυτά όμως απαιτούν μελέτες σε μοριακό επίπεδο που θα λαμβάνονται υπόψη πολλοί και διαφορετικοί παράγοντες έτσι ώστε να υπάρξει αποτέλεσμα θεραπευτικό χωρίς κυτταροτοξικότητα.

Είδαμε τη σημασία της γενωμικής αστάθειας στην καρκινογένεση με τις μεταλλάξεις στα γονίδια των επιδιορθωτικών ενζύμων να έχουν ιδιαίτερη σημασία. Δεν έχει καταστεί σαφές βέβαια αν η χρωμοσωμική αστάθεια αποτελεί σημείο εκκίνησης της καρκινογένεσης, ή η καρκινική μετατροπή την επάγει. Το μόνο σίγουρο είναι πως πρόκειται για καταστάσεις συνδεδεμένες μεταξύ τους. Όσο αυξάνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός τόσο μεγαλώνουν οι πιθανότητες βλάβης στο γενετικό υλικό.

Τα επίπεδα της ΤοπII κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου κυμαίνονται ανάλογα με το εκάστοτε στάδιο και έτσι η επιρροή στο ένζυμο πρέπει να γίνεται σε αυστηρά όρια. Όσο δημοσιεύονται μελέτες που αφορούν την ΤοπII τόσο θα προκύπτουν και νέα σκευάσματα με καλύτερα αποτελέσματα στη θεραπεία του καρκίνου.

ΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

22.Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

Αρχικά θα πρέπει να κατανοήσουμε τη σημασία και την ιδιαιτερότητα των φυσιολογικών αρχέγονων κυττάρων που εντοπίζονται στον εντερικό σωλήνα, καθώς έχουν πολλά κοινά σημεία, αλλά και μοιράζονται σε αρκετές περιπτώσεις τα ίδια μοριακά μονοπάτια με τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν βέβαια στο λεπτό έντερο και έχουν χαρακτηριστεί καλύτερα τα αρχέγονα κύτταρα, όμως έχουμε στην κατοχή μας έναν αρκετά σημαντικό αριθμό μελετών που να φορούν και το παχύ έντερο. Τα αρχέγονα κύτταρα διακρίνονται τοπογραφικά στη κρύπτη σε 2 κατηγορίες, η πρώτη αφορά τα κύτταρα που εκφράζουν δείκτες όπως BMI1, HOPX, TERT, LRIG1 (στη θέση +4 της εντερικής κρύπτης) και η δεύτερη αφορά τα κύτταρα που βρίσκονται στην βάση της κρύπτης του εντερικού βλεννογόνου και εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα το δείκτη LGR5. Και οι 2 κατηγορίες έχουν αναγνωριστεί για την ικανότητά τους να δίνουν γένεση σε πολλά και διαφοροποιημένα αυτοανανεούμενα κύτταρα του γαστρεντερικού επιθηλίου [203]. Οι 2 ομάδες επίσης, αλληλεπιδρούν σημαντικά μεταξύ τους, αφού τα κύτταρα που εκφράζουν BMI1 αποτελούν πηγή για την παραγωγή κυττάρων που εκφράζουν LGR5, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ομοιόστασης του επιθηλίου [204]. Μάλιστα τα LGR5 αρχέγονα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα έκφρασης και του δείκτη BMI1 [205]. Ενεργώς πολλαπλασιαζόμενα αρχέγονα κύτταρα LGR5 μπορούν να δώσουν γένεση σε άλλα αρχέγονα κύτταρα τα οποία δύναται να εκφράζουν δείκτες και από την ομάδα των +4, ταυτόχρονα με LGR5 [206]. Το ίδιο αποτέλεσμα βέβαια προέκυψε και σε μελέτες για LGR5- κύτταρα τα οποία όμως εκφράζουν τη λιγκάση Dll1 της οδού Notch [207]. Η ταμοξιφένη σαν χημειοθεραπευτικό σκεύασμα οδηγεί σε απόπτωση τα αρχέγονα κύτταρα της ομάδας +4, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της ισορροπίας του πληθυσμού τους, παραμένει όμως ένας ικανός αριθμός να αναδημιουργήσει τα αρχέγονα κύτταρα. Αυτό οδήγησε αρκετούς ερευνητές στην προσπάθεια εξακρίβωσης του αριθμού των αρχέγονων κυττάρων τα οποία είναι ενεργά τη δεδομένη χρονική στιγμή, αφού αυτά οδηγούνται στην απόπτωση [208].

Το παχύ έντερο έχει αρκετές δομικές διαφορές σε σχέση με το λεπτό έντερο, καθώς οι κρύπτες δεν εξωθούνται στη δημιουργία λαχνών στην επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου, ενώ δεν περιέχουν κύτταρα Paneth ούτε +4 αρχέγονα κύτταρα. Τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα στο παχύ έντερο έχουν

χαρακτηρισθεί ως LGR5 ή EphB2 [209,210]. Επιπλέον έχουν βρεθεί αρχέγονα κύτταρα με χαμηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού από άλλες υποκατηγορίες, στα οποία το μοριακό μονοπάτι Notch διαδραματίζει πιο ενεργό ρόλο [211]. Αυτή η ομάδα βλαστικών κυττάρων όμως απαιτεί περαιτέρω μελέτες για την εξακρίβωση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της.

23.Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΡΥΠΤΗΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ

Το παχύ έντερο και το ορθό αποτελούν το τελικό τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα. Το μήκος του παχέος εντέρου φθάνει τα 130cm ενώ το μήκος του ορθού φθάνει τα 15 έως 20εκ. Τα επιμέρους τμήματα του παχέος εντέρου είναι τα ακόλουθα: Τυφλό – Ανιόν – Εγκάρσιο – Κατιόν – Σιγμοειδές. Το παχύ έντερο αρχίζει από την θέση της ειλεοτυφλικής βαλβίδας συνεχίζοντας με το τυφλό. Σε σχετικά μικρή απόσταση από την ειλεοτυφλική βαλβίδα βρίσκεται συνήθως η σκωληκοειδής απόφυση. Στην συνέχεια υπάρχει το ανιόν κόλον το οποίο πορεύεται δεξιά προς τα άνω μέχρι το ήπαρ όπου σχηματίζει τη δεξιά κολική (ηπατική καμπή). Ακολουθεί το εγκάρσιο κόλον το οποίο πορεύεται τοξοειδώς προς τα αριστερά μέχρι το αριστερό άνω τμήμα της κοιλίας όπου κατά τον πόλο του σπλήνα σχηματίζει την αριστερή κολική καμπή (σπληνική καμπή) όπου και μεταπίπτει στο κατιόν κόλον. Το κατιόν κόλον πορεύεται προς τα κάτω και πίσω κατά μήκος του αριστερού πλαγίου της κοιλιακής χώρας. Η πρόσφυση του αριστερού κολικού συνδέσμου (φρενοκολικός σύνδεσμος) αποτελεί το έδαφος του χώρου που κατασκηώνει ο σπλήνας. Το κατιόν κόλον μεταπίπτει στο σιγμοειδές κόλον το οποίο αρχικά πορεύεται στον αριστερό λαγόνιο βόθρο και μετά εισέρχεται στην ελάσσονα πύελο σχηματίζοντας αγκύλη σχήματος 'S'. Στο ύψος του 2ου -3ου ιερού σπονδύλου μεταπίπτει στο ορθό ή απευθυσμένο το οποίο καταλήγει στον πρωκτό. Το ορθό αρχικά ακολουθεί το κοίλο σχήμα του ιερού οστού (ιερή καμπή) και μετά, στο ύψος του κόκκυγα στρέφεται προς τα πίσω και περνάει διαμέσου του πυελικού εδάφους (περινεϊκή καμπή). Η ιερή καμπή καλύπτεται εν μέρει από μπροστά με περιτόναιο (ευθυκυστικό ή ευθυμητρικό κόλπωμα) ενώ η περινεϊκή καμπή βρίσκεται εξωπεριτοναϊκά. Το άνω τριτημόριο του ορθού είναι πιο διευρυσμένο και αποτελεί την λήκυθο. Κάτω από την λήκυθο στο εσωτερικό του ορθού υπάρχουν τρεις σταθερές εγκάρσιες πτυχές, η άνω, η μέση και η κάτω από τις οποίες η άνω και η κάτω είναι μικρότερες και βρίσκονται αριστερά, ενώ η μέση είναι μεγαλύτερη, βρίσκεται δεξιά και λέγεται πτυχή ή βαλβίδα του Kohlrausch. Η απόστασή της από τον πρωκτό είναι 5-8 εκ.

Το επιθήλιο του παχέος εντέρου είναι ένα απλό κυλινδρικό ή κυβοειδές επιθήλιο το οποίο λειτουργεί ως προστατευτική ασπίδα μεταξύ του εσωτερικού και του αυλού. Αποτελείται από απορροφητικά και καλυκοειδή κύτταρα. Και οι δύο κυτταρικοί τύποι είναι πολικοί και επικάθονται πάνω στην βασική μεμβράνη. Τα απορροφητικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την μεταφορά ύδατος και ηλεκτρολυτών. Στο ενδοαυλικό τμήμα τους παρουσιάζουν ψυκτροειδή παρυφή λόγω της παρουσίας των μικρολαχνών. Το κυτταρόπλασμα των ώριμων επιφανειακών απορροφητικών κυττάρων είναι ηωσινόφιλο και δεν περιέχει βλέννη. Οι πυρήνες είναι ωοειδείς, στην βάση του κυττάρου και με τους μεγάλους άξονες τους παράλληλα με τους μεγάλους άξονες των κυττάρων. Συχνά περιέχουν πυρήνια. Τα καλυκοειδή κύτταρα συνθέτουν, αποθηκεύουν και εκκρίνουν κοκκία βλέννης. Το κυτταρόπλασμα τους είναι γεμάτο κοκκία βλέννης. Οι πυρήνες τους βρίσκονται στην βασική επιφάνεια και συνήθως βάζονται πιο πυκνά με αιματοξυλίνη σε σχέση με τους πυρήνες των απορροφητικών κυττάρων και για αυτό δεν διακρίνονται πυρήνια.

Λεμφοκύτταρα και περιστασιακά ηωσινόφιλα μπορεί φυσιολογικά να βρίσκονται μεταξύ των επιφανειακών επιθηλιακών κυττάρων, όπως και αποπτωτικά σωμάτια τα οποία περιέχουν κυτταρικά και πυρηνικά υπολείμματα.. Μια λεπτή βασική μεμβράνη η οποία αποτελείται από κολλαγόνο και άλλες πρωτεΐνες υποστηρίζει το επιθήλιο. Η δομή αυτή είναι διαπερατή σε απορροφηθέντα ή εκκριθέντα ιόντα, πρωτεΐνες και νερό και επιπλέον επιτρέπει την μετανάστευση λεμφοκυττάρων του χορίου προς την επιθηλιακή επιφάνεια.

Επιθήλιο των κρυπτών (αδένων Lieberkuhn) : Το απλό κυλινδρικό επιθήλιο το οποίο καλύπτει τις κρύπτες του παχέος εντέρου αποτελείται από ένα πολύ ετερογενή πληθυσμό κυττάρων. Σε αντίθεση με τα ώριμα απορροφητικά και καλυκοειδή κύτταρα, ανώριμα και αδιαφοροποίητα πρώιμα κύτταρα καθώς και εξειδικευμένα νευροενδοκρινικά κύτταρα βρίσκονται στις κρύπτες. Τα απορροφητικά κύτταρα και καλυκοειδή κύτταρα έχουν δομές παρόμοιες με αυτές του επιφανειακού επιθηλίου, αλλά τα λιγότερο ώριμα, λιγότερο διαφοροποιημένα που βρίσκονται βαθύτερα στις κρύπτες είναι πιο κυβοειδή από τα επιφανειακά κυλινδρικά. Τα λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα περιέχουν ελάχιστη ή καθόλου βλέννη. Τα νευροενδοκρινικά κύτταρα παρουσιάζουν συνήθως πολικότητα αντίθετη με αυτή των πολυάριθμων απορροφητικών και καλυκοειδών κυττάρων. Το κυτταρόπλασμα το οποίο είναι γεμάτο κοκκία βρίσκεται κάτω από τον πυρήνα προς τη βάση. Υπάρχουν δύο κατηγορίες νευροενδοκρινικών κυττάρων. Αυτά των οποίων η κορυφή έρχεται σε επαφή με τον αυλό του οργάνου (ανοικτή κατηγορία) και αυτά των οποίων η κορυφή καλύπτεται από άλλα επιθηλιακά κύτταρα (κλειστή κατηγορία). Τα περισσότερα από τα νευροενδοκρινικά κύτταρα είναι αργυρόφιλα ενώ λίγα είναι αργενταφινικά. Πάντως ο αριθμός των

νευροενδοκρινικών κυττάρων του παχέος εντέρου είναι σημαντικά μειωμένος σε σχέση με το λεπτό έντερο.

Τα κύτταρα Paneth είναι εκκριτικά κύτταρα των οποίων η ακριβής λειτουργία δεν έχει διευκρινιστεί με βεβαιότητα. Είναι πυραμιδικά κύτταρα και παρουσιάζουν την ίδια πολικότητα βάσης και κορυφής-αυλού όπως τα απορροφητικά και τα καλυκοειδή κύτταρα. Το χαρακτηριστικό τους είναι τα μεγάλα ηωσινόφιλα εκκριτικά τους κοκκία, τα μεγαλύτερα σε όλο το επιθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος. Τα κοκκία τους περιέχουν λυσοζύμη, επιδερμιδικό αυξητικό παράγοντα και βασικές πρωτεΐνες πλούσιες σε αργινίνη καθώς και γλυκοπρωτεΐνες. Η λυσοζύμη διαθέτει αντιβακτηριακή δραστηριότητα και μπορεί να παίζει ρόλο στον έλεγχο της εντερικής χλωρίδας. Τα κύτταρα Paneth βρίσκονται φυσιολογικά μόνο στο τυφλό και στο εγγύς δεξιό κόλον. Η παρουσία τους σε άλλες περιοχές του παχέος εντέρου καταδεικνύει μεταπλασία, συνήθως ως συνέπεια χρόνιας φλεγμονώδους επεξεργασίας. Μία από τις σπουδαιότερες λειτουργίες των κρυπτών είναι η ανανέωση του επιφανειακού επιθηλίου, τα κύτταρα του οποίου έχουν πεπερασμένο χρόνο ζωής και διαρκώς εκπίπτουν στον αυλό ή χάνονται διαμέσου της διεργασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου γνωστού ως απόπτωση. Η ζώνη πολλαπλασιασμού στη βάση των κρυπτών διακρίνεται από τις μτώσεις των προγονικών επιθηλιακών κυττάρων τα οποία διατηρούν την ικανότητα τους για κυτταρική διαίρεση. Το βασικό 50% της κρύπτης αποτελεί την ζώνη πολλαπλασιασμού ενώ το 25% αποτελεί τη ζώνη ωρίμανσης. Τα περισσότερα από τα κύτταρα της ζώνης ωρίμανσης έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού αλλά συνεχίζουν να διαφοροποιούνται και γίνονται όλο και περισσότερο λειτουργικά ώριμα μέχρι τελικά να εκπέσουν από την επιφάνεια. Τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου αντικαθίστανται κάθε 6 ημέρες από άωρα κύτταρα τα οποία μετατρέπονται είτε σε απορροφητικά, είτε σε καλυκοειδή είτε σε ενδοκρινικά. Τα κύτταρα Paneth αντικαθίστανται πολύ πιο αργά και ζουν περίπου 30 ημέρες μέχρι να αντικατασταθούν.

Το χόριο αποτελεί το στρώμα που υποστηρίζει το βλεννογόνο του παχέος εντέρου και εκτείνεται από την υποεπιθηλιακή βασική μεμβράνη μέχρι τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα. Περιέχει ένα ποικίλο αριθμό κυττάρων ο οποίος βρίσκεται ανάμεσα σε σχετικά αραιές ίνες κολλαγόνου, λείες μυϊκές και νευρικές ίνες. Τα περισσότερα κύτταρα του χορίου είναι υπεύθυνα για τοπικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς που εξασφαλίζουν την άμυνα ενάντια σε επιβλαβείς ξενιστές.

Μια λεπτή στιβάδα από λείες μυϊκές ίνες, η βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα, διαχωρίζει τον βλεννογόνο (επιθήλιο και χόριο) από τον υποβλεννογόνο χαλαρό συνδετικό ιστό. Μερικά λεία μυϊκά κύτταρα από αυτή τη στιβάδα μπορεί να εκτείνονται προς τα επάνω στο χόριο και μπορεί να είναι πολυάριθμα σε περιοχές που βρίσκονται βλεννογονικές προβολές, οι

μηνοειδείς πτυχές. Το πάχος της βλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας ποικίλλει. Συσπάσεις της μυϊκής στιβάδας προκαλούν αλλαγές της μορφής του βλεννογόνου και αλλάζουν τις φυσιολογικές διεργασίες του επιθηλίου (απορροφητικές, εκκριτικές). Η βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα φυσιολογικά διασχίζεται από λεμφαδενικά συμπλέγματα, αγγειακούς σχηματισμούς και νευροϊνίδια.

Υπολογίζεται ότι μια φυσιολογική κρύπτη περιέχει περίπου 2000 κύτταρα, εκ των οποίων περίπου 19 είναι αρχέγονα κύτταρα [212].

Οι βασικές λειτουργίες των αρχέγονων κυττάρων είναι η ικανότητα να πολλαπλασιάζονται συνεχώς χωρίς να φθάνουν σε ένα σημείο φθοράς που να εμποδίζει τον διπλασιασμό και η δυνατότητα να διαφοροποιούνται προς ποικίλες κυτταρικές σειρές. Αν και οι γνώσεις μας για τα αρχέγονα κύτταρα είναι σαφώς περισσότερες από ότι στο παρελθόν, παρόλα αυτά ο χαρακτηρισμός, αλλά και η εντόπισή τους έχουν δυσκολίες [213].

Αρκετά μόρια έχουν ενοχοποιηθεί ως δείκτες έκφρασης των βλαστικών κυττάρων. Η συνδεδεμένη στο RNA πρωτεΐνη Msi-1 που βρέθηκε πρώτη φορά στη *Drosophila*, εκφράζεται από αρχέγονα κύτταρα στα κατώτερα επίπεδα της κρύπτης και πιθανόν να ρυθμίζει κατά κάποιον τρόπο την σωστή τοποθέτηση τους στο χώρο της κρύπτης [214]. Ο μοριακός δείκτης Hes1 αποτελεί έναν μεταγραφικό αναστολέα που ενεργοποιείται από το δείκτη Msi1, εκφράζεται μεν από αρχέγονα κύτταρα στη βάση της κρύπτης, αλλά από πιο ευρύ πληθυσμό κυττάρων [215]. Επιπλέον τα αρχέγονα κύτταρα του παχέος εντέρου εκφράζουν δείκτες της οικογένειας των ιντεγκρινών (διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες) [216].

Αναφέραμε νωρίτερα το δείκτη EriB. Πρόκειται για μια ομάδα υποδοχέων τύπου τυροσινικής κινάσης που η έκφρασή τους σε παχύ έντερο ποντικών προήλθε από αρχέγονα κύτταρα στη βάση της κρύπτης. Αναστολή τους οδήγησε σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού, χωρίς όμως να επηρεάζει τον συνολικό αριθμό των αρχέγονων κυττάρων [217]. Αυτό υποδηλώνει πως δεν πρόκειται για ανεξάρτητο δείκτη, αλλά δρα συνεργικά και με άλλους.

Ιδιαίτερα σημαντικό θέμα είναι η σηματοδοτική οδός του αυξητικού παράγοντα TGF- β , που συμμετέχει στην φυσιολογική ανάπτυξη του ενδοδέρματος, αλλά και στην διαφοροποίηση αρχικά αδιαφοροποίητων βλαστικών κυττάρων [218]. Μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι υποδοχείς του TGF- β βρίσκονται τόσο σε διαφοροποιημένα όσο και σε αδιαφοροποίητα κύτταρα της κρύπτης, καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης του

εντέρου [219]. Μάλιστα πιο πρόσφατα αναφέρθηκε ότι τα μοριακά μονοπάτια του TGF-β μαζί με το WNT δρουν συνεργικά στην καρκινογένεση, μέσω της ετεροζυγωτίας Arc/Smad4+-, που έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγαλύτερων πολυπόδων με αυξημένη την πιθανότητα της καρκινικής μετατροπής [220].

Τα βασικά γονίδια, λοιπόν, των οποίων η κατανόηση θα βοηθήσει στην επιπλέον αποσαφήνιση του τρόπου λειτουργίας των κυττάρων της κρύπτης είναι σε αριθμό 3:

-Msi-1: μείωση της έκφρασης του γονιδίου οδηγεί σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Μειώνεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί της απόπτωσης και σταματά ο κυτταρικός κύκλος των καρκινικών κυττάρων σε μελέτες σε ξενομοσχεύματα. Επιπλέον μέσω της αναστολής του προκύπτει και έμμεση αναστολή της οδού Notch-1 [221].

-Hes-1: σε μελέτες σε έντερο ποντικών βρέθηκε πως η αναστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου οδηγεί σε αύξηση των εντεροενδοκρινικών κυττάρων και σε μείωση των εντερικών κυττάρων [222,223].

-Lgr-5: έλλειψη του μοριακού δείκτη LGR5 έχει σαν αποτέλεσμα απορύθμιση της σηματοδοτικής οδού WNT και συνεπώς σε υπερέκφραση των γονιδίων στόχων της οδού. Η έκφραση του δείκτη σχετίζεται και με την έκφραση από τα αρχέγονα κύτταρα άλλων δεικτών που μπορεί να σχετίζονται και με το μικροπεριβάλλον [224].

24.ΤΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ειδική ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού της β-κατενίνης, με τα βλαστικά κύτταρα να εκφράζουν δείκτες όπως LGR5, BMI1, CD133, οδηγεί συχνά σε ανάπτυξη αδενωμάτων, κάτι που υποδηλώνει πως τα υπάρχοντα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων [225,226]. Αρκετές μελέτες σε γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών έχουν αναδείξει ορισμένα συμπεράσματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Αρχικά αδενώματα που προέρχονται από καρκινικά αρχέγονα κύτταρα δεν καταλήγουν παρά μόνο σπάνια σε καρκινώματα [227].

Επίσης, στα υπό μελέτη ποντίκια αφορούσαν το λεπτό έντερο, ενώ στον άνθρωπο πιο συχνά η καρκινογένεση αφορά το παχύ έντερο και τέλος, υπάρχουν κι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την καρκινογένεση στον άνθρωπο, όπως είναι η ύπαρξη φλεγμονώδους νόσου [228]. Αρκετές μεταλλάξεις έχουν έως τώρα αναγνωριστεί (APC, p53, KRAS) που να επηρεάζουν το δυναμικό των αρχέγονων κυττάρων, καθιστώντας τα καρκινικά.

Σε παρασκευάσματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου οι μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα δεν είναι νέες ομάδες κυττάρων, αλλά παλαιοί πληθυσμοί που έχουν υποστεί μεταλλάξεις και έχουν δημιουργήσει κλώνους κυττάρων με καρκινικό φαινότυπο. Δεν πρόκειται για κύτταρα τα οποία δημιουργήθηκαν ως καρκινικά, αλλά είναι μια εξελικτική διαδικασία [229]. Επιπλέον, η ανάπτυξη και η λειτουργία από τη μια πλευρά των φυσιολογικών αρχέγονων κυττάρων και από την άλλη πλευρά των καρκινικών, εξαρτάται αρκετά από την ύπαρξη φλεγμονής στην περιοχή. Τα αρχέγονα κύτταρα με μετάλλαξη στο p53 φαίνεται να έχουν καλύτερη επικράτηση σε συνθήκες φλεγμονής [230].

Συνεπώς οι παράγοντες της φλεγμονής και των γενετικών αλλαγών ασκούν ιδιαίτερη επίδραση στη διεργασία της καρκινογένεσης. Μάλιστα, ενώ στην αρχή τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα ανταγωνίζονται τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, αργότερα παρατηρείται μια σύγκρουση μεταξύ των διαφορετικών υποομάδων καρκινικών κυττάρων που καθορίζει αυτά που θα επιβιώσουν στις διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος. Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς αντοχής πέρα από το δυναμικό πολλαπλασιασμού, ενώ εξελίσσουν και την ικανότητα μετάστασης σε απομακρυσμένες θέσεις [231].

Άλλες εργασίες υποστηρίζουν ότι τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα προέρχονται από πιο διαφοροποιημένους πληθυσμούς κυττάρων, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της οδού του NF-κβ [232] ή από κύτταρα που είναι θετικά για το δείκτη DCLK1 με έλλειψη του γονιδίου APC και ταυτόχρονη ύπαρξη φλεγμονής [233]. Άρα ένας όγκος μπορεί να προέλθει τόσο από βλαστικά κύτταρα όπως και από μη βλαστικά κύτταρα. Αυτό αναδεικνύει την ανάγκη μελέτης ενός όγκου από διαφορετικές σκοπιές προκειμένου να καταλήγουμε σε συμπεράσματα που θα έχουν πραγματική θεραπευτική αξία.

25.Η ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΟΥΣ

Το καρκίνωμα του παχέος εντέρου είναι από τα πιο καλά χαρακτηριζόμενα καρκινώματα. Έχουν γίνει αρκετές έρευνες σε περιπτώσεις κληρονομικών νοσημάτων, αλλά και σε χειρουργικά παρασκευάσματα, που σε συνδυασμό με την καλή παρακολούθηση των σθενών, έχει σαν αποτέλεσμα να έχουμε στη διάθεσή μας αρκετές πληροφορίες. Όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο, η ενεργοποίηση γονιδίων και η αποσιώπηση άλλων, οδηγούν σε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, αλλά και σε αποφυγή της απόπτωσης. Μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια θα επιταχύνουν τη μετατροπή ενός αρχικά απλού αδενώματος σε καρκίνωμα, ενώ αργότερα η συσσώρευση περαιτέρω μεταλλάξεων που θα διαταράξει τη σταθερότητα του γονιδιώματος, θα σταθεροποιήσει πια τον καρκινικό όγκο και θα ξεκινήσει η επέκτασή του.

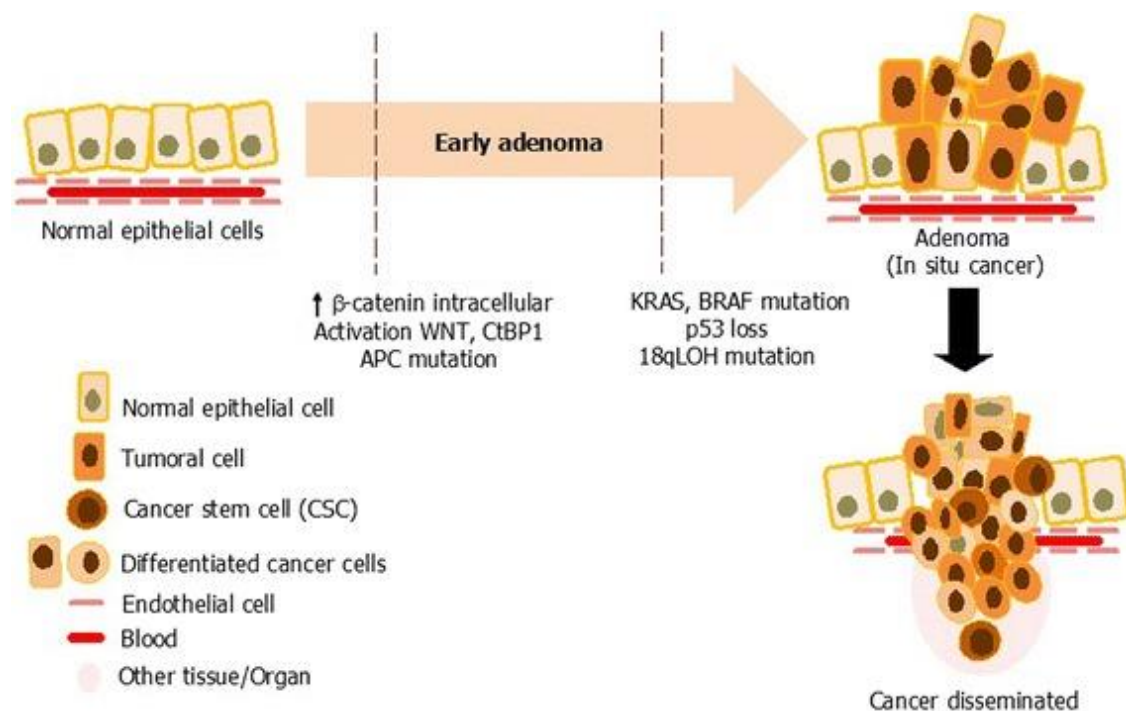
Η καρκινογένεση απαιτεί 6 βασικά προαπαιτούμενα τα οποία είναι:

- επάρκεια αυξητικών σημάτων
- αναισθησία σε μηχανισμούς που εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- αποφυγή της απόπτωσης
- απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού
- επαρκή αγγειογένεση και ικανότητα διείσδυσης στους ιστούς

Το εναρκτήριο έναυσμα είναι πάντοτε η πρόκληση ενός ελλείμματος στο γενετικό υλικό που θα οδηγήσει στην αστάθειά του και συνεπώς στη μείωση της επιρροής των ογκοκατασταλτικών σημάτων [261].

Συνήθως η πρώτη μετάλλαξη φαίνεται να αφορά κύτταρο στον πυθμένα της κρύπτης. Οι δύο βασικές κατηγορίες των αρχέγονων κυττάρων ανάλογα με τις κύριες ιδιότητες τους είναι, τα αυτοανανεούμενα και τα κύτταρα με δυνατότητα διαφοροποίησης. Τα αυτοανανεούμενα πιθανόν να αποτελούν πιο μικρό ποσοστό κυττάρων, αυτά είναι η αρχική πηγή των καρκινικών κυττάρων. Στην συνέχεια τα κύτταρα διαχωρίζονται τόσο συμμετρικά όσο και ασύμμετρα δίνοντας γένεση σε νέα καρκινικά βλαστικά κύτταρα που υιοθετούν όμως τις ίδιες ικανότητες.

Το μοντέλο της καρκινογένεσης ξεκινά με αύξηση της έκφρασης της ενδοκυττάριας β-κατενίνης στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού WNT με ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου APC. Στην συνέχεια η ενεργοποίηση του KRAS σε συνδυασμό με την μετακίνηση της β-κατενίνης στον πυρήνα των κυττάρων, δρουν συνεργικά για την μετατροπή ενός αδενώματος σε καρκίνωμα [234]. Σε αρκετές περιπτώσεις προχωρημένων καρκινωμάτων παχέος εντέρου παρατηρείται απώλεια λειτουργικότητας του p53 μαζί με ετεροζυγωτία στο χρωμόσωμα 18q [235]. Μόνο η μετάλλαξη του p53 έχει βρεθεί να συμβαίνει κατά το χρονικό διάστημα που το αδένωμα μετατρέπεται σε καρκίνωμα. Επίσης, μεταλλάξεις στα γονίδια του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα TGFb (TGFBR) και της κινάσης-3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIK3CA) ευθύνονται σε σημαντικό ποσοστό για την πρόοδο του καρκινικού όγκου [236].



Η πρόοδος του φυσιολογικού εντερικού επιθηλίου σε διηθητικό καρκίνωμα περνάει μέσα από αρκετά στάδια [237].

Αρχικά τα φυσιολογικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου χάνουν την πολικότητά τους και χαλαρώνουν οι δεσμοί τους με τη βασική μεμβράνη, καθιστώντας πιο εύκολη την αποκόλλησή τους. Οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων CpG, σε συνδυασμό με τη μικροδορυφορική αστάθεια, αλλά και τη

χρωμοσωμική αστάθεια, είναι τα βασικά στοιχεία της καρκινογένεσης [238]. Όλες αυτές όμως οι διαδικασίες επιτελούνται μέσω μοριακών μονοπατιών για να υπάρξει τελικώς ένας καρκινικός φαινότυπος, που περιλαμβάνει την ικανότητα της επιβίωσης και της μετάστασης [239,240].

Διαταραχές στο σύστημα επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού έχει σαν αποτέλεσμα ελαττωματικό γονιδίωμα, μια κατάσταση που ονομάζεται μικροδορυφορική αστάθεια και εμφανίζεται σε περίπου 20% των περιπτώσεων [214]. Η απενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης (MMR), μπορεί να προκύψει είτε με μετάλλαξη στις εναρκτήριες CpG περιοχές του γονιδίου MLH1 είτε άμεσα σε άλλα γονίδια της οικογένειας MMR [242,243].

Τα προγονικά κύτταρα της κρύπτης διαχωρίζονται κάθε 12-16 ώρες, παράγοντας περίπου 300 νέα κύτταρα σε κάθε κρύπτη κάθε ημέρα [244]. Τα κύτταρα TA (transmit-amplifying) είναι τα υπεύθυνα κύτταρα σχηματισμού ιστών και μετά από κάποιο μέγιστο όριο πολλαπλασιασμού διαφοροποιούνται σε άλλες κατηγορίες κυττάρων, όπως κύτταρα Paneth, ή εντεροενδοκρινικά. Ο πολλαπλασιασμός τους οριοθετείται κανονικά από μηχανισμούς απόπτωσης, κάτι που δεν συμβαίνει με τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα, τα οποία διαχωρίζονται σε νέα κύτταρα συνεχώς, ως αποτέλεσμα των συσσωρευμένων μεταλλάξεων και των αυξητικών μηνυμάτων από το διαταραγμένο επίσης μικροπεριβάλλον [245,246].

ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μέσω ειδικών μορφών καλλιέργειας κυττάρων και με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής έχουν αναγνωρισθεί αρκετοί δείκτες των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων, με τους πιο σημαντικούς να είναι οι ακόλουθοι:

CD133, CD44, CD34, CD24, ειδικά επιθηλιακά αντιγόνα (ESA), CD166, CD29, LGR5, πυρηνική β-κατενίνη, ErCAM, CD49f, ALDH1.

Τα κύτταρα που εκφράζουν το δείκτη CD133, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, αυτά που εκφράζουν κυτταροκερατίνη 20 και τα θετικά για το δείκτη ErCAM. Βέβαια υπολογίζεται ότι μόλις 1 στα 262 κύτταρα CD133+ είναι πραγματικό αρχέγονο καρκινικό κύτταρο. Μάλιστα ο δείκτης αυτός ευρίσκεται και σε φυσιολογικά κύτταρα, αν και σε μικρότερη συχνότητα [247]. Ο δείκτης CD44 δεν εκφράζεται μόνο στα κύτταρα του πυθμένα της κρύπτης, αλλά και στα συνεχώς πολλαπλασιαζόμενα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα, κάτι που τον διαχωρίζει από τους υπόλοιπους δείκτες.

Τα κύτταρα που είναι θετικά για CD44/EpCAM έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε νέα κύτταρα τα οποία διατηρούν την ετερογένεια και τις ιδιότητες σε σχεδόν πλήρη ακρίβεια των μητρικών κυττάρων. Σε ποσοστό από αυτά βρέθηκε ταυτόχρονα και ο δείκτης CD166 [248]. Επίσης, η έκφραση του δείκτη CD49f χαρακτηρίζει κύτταρα που είναι πιο εξιδεικευμένα ακόμα, από ότι άλλα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα, καθιστώντας τον έναν ιδιαίτερο μώριο για την αναγνώριση [249].

Χρειάζονται ακόμα αρκετές μελέτες για να αποσαφηνιστούν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε μοριακού δείκτη, αλλά και ο τρόπος συνέκφρασης τους και τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Η αναγνώριση όμως των κυττάρων και ιδίως το στάδιο καρκινικής μετατροπής στο οποίο βρίσκονται τη δεδομένη χρονική στιγμή, θα προσφέρει σημαντικά στις μεθόδους θεραπείας που πρόκειται να ακολουθήσουν.

26.ΤΑ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα, τα καρκινικά δεν βρίσκονται υπό έλεγχο όσον αφορά στο δυναμικό πολλαπλασιασμού τους και αυτό σε συνδυασμό με την συμμετοχή τους στην διαδικασία της καρκινογένεσης, τα καθιστά μια ιδιαίτερη ομάδα κυττάρων που επηρεάζουν τους θεραπευτικούς χειρισμούς [250]. Η έκφραση αυξητικών παραγόντων από το μικροπεριβάλλον, όπως ο επιδερμικός, ο ινσουλινομιμητικός, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων, ασκούν επίδραση στην συμπεριφορά των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων, αλλά και σε όλα τα καρκινικά κύτταρα του όγκου [251].

Οι βασικές ιδιότητες των αρχέγονων κυττάρων διακρίνονται σε 3 κατηγορίες:

-Αυτοανανέωση: Είναι η ικανότητα των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων να δημιουργούν νέα κύτταρα με τα ίδια χαρακτηριστικά με το μητρικό κύτταρο. Με αυτόν τον τρόπο διατηρείται πάντα μια αρχική πηγή κυττάρων που θα δίνει γένεση σε άλλα νέα, διατηρώντας τον πληθυσμό τους πάντα σε υψηλά επίπεδα. Μοριακά μονοπάτια μέσω ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίων, όπως WNT/β-κατενίνης και Notch, το μοριακό μονοπάτι του Hedgehog (έχει μελετηθεί πιο πολύ σε ασθενείς με καρκίνο στο πάγκρεας, με πολλαπλό μυέλωμα, αλλά πλέον υπάρχουν και αναφορές στην ορθοκολική νεοπλασία),

αποτελούν σηματοδοτικές οδούς που ευνοούν αυτήν την ικανότητα των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων [252,253].

Μεσεγχυματικά κύτταρα, κύτταρα του στρώματος, διαφοροποιημένα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα, επηρεάζουν την ομοιοστασία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, δηλαδή τη διατήρηση αρχικά του πληθυσμού τους και κατά δεύτερον την αύξησή του, αν και αυτή η αλληλουχία γεγονότων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως [254].

Αυξημένος αριθμός αρχέγονων καρκινικών κυττάρων σε έναν όγκο, εμφανίζεται κυρίως σε περιπτώσεις χαμηλής διαφοροποίησης και σε πιο εκτεταμένες βλάβες, όπου το μικροπεριβάλλον του όγκου, προωθεί έντονα την επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή.

Διαφοροποίηση: είναι η ικανότητα των κυττάρων που προέρχονται από κάποιο πατρικό κύτταρο να διαφοροποιούνται προς διάφορες κυτταρικές σειρές. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργούνται ασταθείς ιστοί από συνεχώς ανανεούμενα κύτταρα [255]. Ιστοπαθολογικές μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου έδειξαν πως όσο πιο μεγάλος ο αριθμός των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων στον όγκο, τόσο πιο αδιαφοροποίητος ήταν [256,257].

-Ρύθμιση της ομοιόστασης: Είναι η ικανότητα των κυττάρων να κρατούν σε ισορροπία τις διαδικασίες της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης τους [255]. Μάλιστα αυτή είναι μια ιδιότητα που έχει αποδοθεί κυρίως σε 2 κυτταρικούς τύπους, στα θετικά για LGR5 και για BMI1 [258]. Τα LGR5+ κύτταρα είναι ενεργώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και επηρεάζονται αρκετά από το μοριακό σηματοδοτικό μονοπάτι WNT. Σε αντίθεση, τα BMI1+ είναι κύτταρα που δεν επηρεάζονται από το μοριακό μονοπάτι WNT, είναι ανενεργά και ενεργοποιούνται σε ειδικές περιπτώσεις, όπου ενεργοποιούν προγονικά κύτταρα, έτοιμα να δώσουν γένεση σε νέους κυτταρικούς κλώνους [259]. Συνολικά, όμως η διατήρηση του ομοιοστατικού ελέγχου, εξαρτάται από πολλούς και διαφορετικούς άξονες, όπως είναι οι παράγοντες που εκκρίνονται από κύτταρα του στρώματος, από τα μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια και από την ίδια την εντερική χλωρίδα [260]. Οι μηχανισμοί αυτοί ακόμα είναι υπό μελέτη και δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί.

27.ΤΟ ΠΟΡΤΡΑΙΤΟ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ ΑΠΟ **ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

Τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα αναγνωρίστηκαν αρχικά από τον δείκτη έκφρασης CD133 και βρέθηκαν να επάγουν τη δημιουργία όγκων σε ποντίκια [262]. Ξεκίνησε μια προσπάθεια εύρεσης και άλλων δεικτών επιφανείας προκειμένου η μελέτη τους σε κάθε περίπτωση να δίνει πληροφορίες όσον αφορά τον κατάλληλο θεραπευτικό χειρισμό, αλλά και την εκάστοτε πρόγνωση. Αυτοί οι δείκτες όμως εκφράζονται και από τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα και άρα τα επίπεδά τους δεν αντανακλούν πάντα τον πληθυσμό και το είδος των καρκινικών αντιστοίχων [210]. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως η έκφραση της κινάσης DCLK1 αφορά μόνο τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα και όχι τα φυσιολογικά, η ενδοκυττάρια όμως εντόπισή της καθιστά δύσκολη την αναγνώριση αυτών των κυττάρων [263].

Ο ιδιαίτερος κυτταρικός πληθυσμός από αρχέγονα καρκινικά προσδίδει στον όγκο χημειοανθεκτικότητα, όπως συμβαίνει με τα LGR5+. Επιπλέον, κυτταροκίνες που εκκρίνονται από το μικροπεριβάλλον του όγκου, ενισχύουν τις βασικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, όπως αναφέρθηκαν ανωτέρω [264]. Από την άλλη η έκφραση των δεικτών αναγνώρισης πιθανόν να εξαρτάται σε κάποιο βαθμό και από το στάδιο του καρκίνου τη συγκεκριμένη στιγμή, από το αν έχει χορηγηθεί χημειοθεραπεία σε προηγούμενο στάδιο και γενικά από τα χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος [265]. Άρα οι δείκτες έκφρασης των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν παρακολούθηση της προόδου του καρκίνου και όχι απαραίτητα σαν κριτήριο για την επιλογή της κατάλληλης χημειοθεραπείας. Τα μοριακά μονοπάτια πέρα από τους δείκτες αποτελούν επίσης μια παράμετρο που δίνει πληροφορίες για τα αρχέγονα κύτταρα [266]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες ID1 και ID3, συμμετέχουν δραστικά στην ικανότητα των αρχέγονων κυττάρων για αυτοανανέωση και έτσι η μελέτη τους προσθέτει επιπλέον βοήθεια [267]. Η αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα BMI1 έχει φανεί να μειώνει τον κυτταρικό πληθυσμό από καρκινικά βλαστικά κύτταρα και την πρόοδο του όγκου [265]. Αρκετές μελέτες επίσης εστιάζουν στην εύρεση των μοριακών μονοπατιών μέσα από τα οποία επιβιώνουν και εξελίσσονται τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να δημιουργήσουν διαφορετικές ομάδες κυττάρων, σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, οι οποίες έχουν και διαφορετικό μοτίβο λειτουργίας [268].

28.ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΑΠΟ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ TGF-Β

Το μοριακό αυτό μονοπάτι συμμετέχει στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην κυτταρική διαφοροποίηση και μετανάστευση, καθώς και στην απόπτωση και αφορά ένα από τα πιο σημαντικά μονοπάτια της καρκινογένεσης στον άνθρωπο [269]. Υποδοχείς σερίνης/θρεονίνης είναι υπεύθυνοι για την μεταφορά των σημάτων σε συγκεκριμένα ενδοκυττάρια προϊόντα, όπως οι πρωτεΐνες Smad [270]. Έχουν ταυτοποιηθεί 8 πρωτεΐνες που διακρίνονται σε 3 οικογένειες:

-υποδοχο-ενεργοποιούμενες: Smad1, smad2, smad3, smad5, smad8

-μεταφορείς: smad4, smad10

-ανασταλτές: smad6, smad7

Αρκετά γονίδια στόχοι του μοριακού μονοπατιού δρουν μέσω αυτών των πρωτεϊνών. Μάλιστα η ενεργοποίηση των γονιδίων p21, p27, p15 οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου [271]. Φυσιολογικά το TGF-β δρα στο εντερικό επιθήλιο ογκοκατασταλτικά εμποδίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγοντας την απόπτωση [272]. Σε πολλές περιπτώσεις ορθοκολικής νεοπλασίας έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα του όγκου στα κατασταλτικά μηνύματα του μονοπατιού. Άλλοτε πάλι έχει αναφερθεί η υπερδραστηριότητά του λόγω έλλειψης των ανασταλτικών πρωτεϊνών smad [273]. Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα TGF-β σε συνδυασμό με την αυτοκρινή του δράση μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από τις πρωτεΐνες smad οδηγεί σε περαιτέρω διαταραχή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και εν συνεχεία ενίσχυση της καρκινικής μετατροπής [574].

Το γονίδιο TBR2 περιέχει μικροδορυφορικές αλληλουχίες που είναι επιρρεπείς σε λάθη κατά την αντιγραφή, ιδίως όταν το σύστημα επιδιόρθωσης MMR υπολειπургεί [275]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο ευρίσκονται σε >80% των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου [276]. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα TBR1 αναγνωρίζονται συχνά σε ορθοκολική νεοπλασία, ενώ η επαναφορά της λειτουργίας του υποδοχέα βοηθά στην μείωση του καρκινικού δυναμικού. Μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες Smad4 κυμαίνονται από 16-25%, ενώ στις Smad2 σε ποσοστό 6% [277]. Ποντίκια με ομόζυγη απαλοιφή της Smad3

εμφανίζουν σε πρόωρη ηλικία επιθετικά καρκινώματα του εντερικού σωλήνα [278].

Ο παράγοντας β2SP είναι ένας διαμεσολαβητικής που ρυθμίζει την πυρηνική εναπόθεση των Smad3/4. Σε περιπτώσεις καρκίνου σταδίου κατά Dukes B1 τα επίπεδά του ήταν χαμηλά. Σε ποντίκια ταυτόχρονη μετάλλαξη σε β2SP/Smad4 είχε σαν συνέπεια την ανάπτυξη αδενωμάτων πιο συχνά από ότι σε μονή μετάλλαξη Smad4. Τα μειωμένα επίπεδα, λοιπόν, του β2SP ευνοούν την μετάπλαση από απλή υπερπλασία σε αδένωμα. Η ταυτόχρονη μετάλλαξη β2SP/Smad4 ανευρίσκεται συχνά και σε επιθετικά μεταστατικά καρκινώματα [279]. Αυτά αναδεικνύουν τη σημασία του β2SP στη δραστηριότητα του μοριακού μονοπατιού TGF-β.

ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT

Η αυτοανανέωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων βρίσκονται σε ένα βαθμό υπό τον έλεγχο αυτού του μοριακού μονοπατιού, το οποίο έχει αναγνωριστεί και σε σωματικά κύτταρα, καθώς και γενικότερα σε καρκινικά κύτταρα.

Πρόκειται για το μονοπάτι WNT/β-κατενίνης, αυτό που αφορά την καρκινογένεση στο παχύ έντερο, το οποίο στο σύνολο των περιπτώσεων δρα μέσω των υποδοχέων Frizzled (Fzd), παρουσία του χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης συνυποδοχέα Lrp5/6. Έτσι προκύπτει ένα τριπλό σύμπλοκο WNT/Fzd/Lrp5/6 [280]. Ακολουθεί η αναστολή της κινάσης με δράση συνθετάσης γλυκογόνου Gsk3, καθώς και της αξίνης, με αποτέλεσμα το μη σχηματισμό του συμπλόκου που περιέχει το γονίδιο Arc, της αδενωματοδούς πολυποδίασης. Ο μη σχηματισμός αυτού του συμπλόκου οδηγεί σε συσσώρευση της β-κατενίνης και εν συνεχεία την πυρηνική της εναπόθεση. Εκεί δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας οδηγώντας στην ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του WNT, όπως το Myc. Επίσης, η β-κατενίνη μπορεί να δράσει συνεργικά και με παράγοντες από άλλα μοριακά μονοπάτια [281].

Το σημείο κατατεθέν συνεπώς που αποδεικνύει ότι το μονοπάτι είναι ενεργό, είναι η πυρηνική εναπόθεση της β-κατενίνης και υπάρχει φυσιολογικά στο εντερικό επιθήλιο. Απαλοιφή του παράγοντα Tcf4, που αποτελεί στόχο της πυρηνικής β-κατενίνης σχετίζεται με νεογνική θνησιμότητα, που σημαίνει ότι είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του εντερικού επιθηλίου η λειτουργία της β-κατενίνης στο ενεργοποιημένο WNT [281]. Άρα είναι απαραίτητο να μελετάται η συμμετοχή του WNT σε κάθε περίπτωση ορθοκολικής νεοπλασίας, προκειμένου να δημιουργείται μια πιο ασφαλή φόρμα θεραπευτικής παρέμβασης, κάτι που απαιτεί περαιτέρω έρευνες στην αποσαφήνιση του τρόπου δράσης του συγκεκριμένου μοριακού μονοπατιού.

Για παράδειγμα μετάλλαξη στο KRAS έχει βρεθεί να οδηγεί σε υπερενεργοποίηση του WNT/ β -κατενίνης μονοπατιού, όταν υπάρχει απώλεια του γονιδίου APC, με αποτέλεσμα την δημιουργία καρκινικών όγκων με υψηλό μεταστατικό δυναμικό [282]. Όπως επίσης και οι δραστικές ρίζες οξυγόνου φαίνεται σε πολλές μελέτες να συμμετέχουν στην καρκινογένεση. Το μονοπάτι WNT σχετίζεται και με το μονοπάτι Hippo, που αφορά τη ρύθμιση του μεγέθους των σπλαχνικών οργάνων [283]. Οι παράγοντες του YAP/TAZ αποτελούν συμπαραγόντες της πυρηνικής β -κατενίνης, όταν το μονοπάτι WNT είναι ενεργοποιημένο. Λίγα είναι γνωστά γι' αυτούς τους 2 παράγοντες. Ο YAP μπορεί να δρα είτε ως ενεργοποιητής είτε ως καταστολέας της ογκογένεσης και ο TAZ φαίνεται να προσδίδει χημειοανθεκτικότητα σε περιπτώσεις καρκίνου στον πνεύμονα [284,285]. Άρα, τα συστατικά του μοριακού μονοπατιού Hippo τελικώς επηρεάζουν την επαγωγή της καρκινογένεσης, δρώντας συνεργικά με το μονοπάτι WNT/ β -κατενίνης.

Κατά κάποιο τρόπο λοιπόν, το μονοπάτι TGF- β προωθεί την κυτταρική διαφοροποίηση και την απόπτωση δρώντας ενάντια σε σήματα του WNT. Όμως στην καρκινογένεση δρουν συνεργικά με αποτέλεσμα που την ευνοεί. Ο παράγοντας GATA6 είναι ένας ρυθμιστής τόσο του WNT όσο και των πρωτεϊνών BMP της οικογένειας TGF- β , που επηρεάζει τη δράση του LGR5, ενώ η καταστολή του, βοηθάει στην υποστροφή της καρκινογένεσης [286]. Ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αυτοανανέωση των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων μέσω αναστολής των πρωτεϊνών BMP. Αυτό, αναδεικνύει την ογκοκατασταλτική σημασία των BMP, αλλά ανοίγει νέους δρόμους στο πως η συνεργασία WNT και TGF- β , μπορεί να προσφέρει στην αντιμετώπιση της καρκινογένεσης.

Ένας άλλος τρόπος στην καρκινογένεση όπου το WNT μειώνει τη δράση του TGF- β , είναι μέσω της έκφρασης του υποδοχέα BAMBI, που μοιάζει με τον υποδοχέα τύπου I του TGF- β , χωρίς να έχει ενδοκυττάριο τμήμα [287]. Εμποδίζει τη δημιουργία σύνδεσης μεταξύ των τύπου I και τύπου II υποδοχέων του TGF- β , ενώ σε περιπτώσεις καρκίνου παχέος εντέρου έχουν ανιχνευθεί αυξημένα επίπεδά του στο καρκινικό εντερικό τμήμα σε σύγκριση με το φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο των ίδιων ασθενών [288]. Η υπερέκφραση του BAMBI ενισχύει την πυρηνική δράση της β -κατενίνης ως μεταγραφικού παράγοντα, επάγοντας την έκφραση γονιδίων, όπως το c-myc και της κυκλίνης D1. Μάλιστα επειδή ο υποδοχέας αυτός συνδέεται και με πρωτεΐνες Smad, η δράση του μπορεί να επηρεαστεί και από τα δύο μοριακά μονοπάτια [289]. Τελικώς, η συνολική του λειτουργία έγκειται στην ενίσχυση της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω του WNT και της αναστολής του TGF- β .

ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ NOTCH

Ένα ακόμα μοριακό μονοπάτι που συμμετέχει στην καρκινογένεση στο παχύ έντερο είναι το Notch [290]. Η δράση του σε μελέτες σε ποντίκια έγκειται στη διατήρηση της ομοιοστασίας των βλαστικών κυττάρων στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο. Η αναστολή του μειώνει το καρκινικό δυναμικό και ενισχύει την χημειοευαισθησία, ενώ η αυξημένη ενεργοποίησή του εμποδίζει την απόπτωση και ευνοεί την αποδιαφοροποίηση των κυττάρων, οδηγώντας σε πιο επιθετικές μορφές καρκίνου [291]. Ενεργεί συχνά μέσω mi-RNAs, σε αρχικά στάδια καρκινογένεσης εμφανίζονται υψηλά επίπεδα miR-34a που διατηρεί σε ισορροπία ακόμα, τον συμμετρικό και τον ασύμμετρο διαχωρισμό των κυττάρων, ενώ σε προχωρημένα στάδια τα επίπεδα του miR-34a, είναι πολύ χαμηλά [292].

29.Η ΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Το μικροπεριβάλλον διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των καρκινικών κυττάρων. Ορισμένοι υποστηρίζουν πως μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα μέχρι και σε επαναπρογραμματισμό, κάτι που προκύπτει από παρατηρήσεις όταν εμβρυικά καρκινικά κύτταρα ανέπτυξαν τερατοκαρκινώματα μόλις μεταφέρθηκαν σε ποντίκια, ενώ όταν μεταφέρθηκαν σε βλαστοκύστη ανέπτυξαν φυσιολογικά χιμαιρικά ποντίκια [293]. Ένας ακόμα παράγοντας που αναδεικνύει τη σημασία του μικροπεριβάλλοντος είναι το γεγονός ότι οι φλεγμονώδεις νόσοι ευνοούν την ανάπτυξη κακοήθειας στο παχύ έντερο. Το μικροπεριβάλλον του όγκου, λοιπόν, αποτελείται από μη κακοήθη κύτταρα, όπως τα ενδοθηλιακά, οι ινοβλάστες και ανοσοποιητικά κύτταρα, ενώ περιέχει και μη κυτταρικά συστατικά, όπως οι πρωτεογλυκάνες, υαλουρονικό οξύ και ινώδες. Όλα αυτά τα στοιχεία συνδυάζονται μεταξύ τους προς δημιουργία του κυτταρικού στρώματος του όγκου. Αυτό το στρώμα δεν είναι ένας σταθερός παράγοντας, αλλά μεταβλητός, όπου οι αλλαγές του έχουν αντίκτυπο στα κύτταρα του όγκου και στην χημειοευαισθησία του [294]. Το φυσιολογικό στρώμα που αφορά τα αρχέγονα κύτταρα αποτελείται από κύτταρα Paneth στο λεπτό έντερο και cKIT+ κύτταρα στο παχύ έντερο [295]. Κατά την καρκινογένεση τα κύτταρα της κρύπτης αλλάζουν οργάνωση, όπως συμβαίνει και με το μικροπεριβάλλον, που στέλνει μη φυσιολογικά μηνύματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και καταργείται ο ανασταλτικός του

χαρακτήρας. Ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας που παράγεται από καρκινο-εξαρτώμενους ινοβλάστες ενεργοποιεί μέσω της β-κατενίνης διαδικασίες μεταγραφής και αυτοανανέωσης των κυττάρων, ενώ επηρεάζει και τη διαφοροποίησή τους [266]. Επίσης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της οδού Notch και της λιγκάσης DLL1 ενισχύουν τις διεργασίες της καρκινικής μετατροπής [296]. Σε αυτήν την περίπτωση τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα κατοικούν σε περιαγγειακές περιοχές, κάτι που παρατηρείται και στο γλοιοβλάστωμα. Μεσεγχυματικά κύτταρα συμμετέχουν και αυτά στον καρκινικό φαινότυπο μέσω έκκρισης προσταγλανδίνης E2 και κυτταροκινών που ενισχύουν τη δράση της β-κατενίνης [297]. Ακόμα και ανοσοποιητικά κύτταρα, ιδίως τα CD4+ T-κύτταρα επηρεάζουν την ικανότητα αυτοανανέωσης των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων μέσω έκκρισης ιντερλευκίνης-22 και της ενεργοποίησης μιας μεθυλοτρανσφεράσης (DOT1L), που είναι υπεύθυνη για την μεταγραφή αρκετών γονιδίων των αρχέγονων κυττάρων [298]. Κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας οι καρκινικοί ινοβλάστες εκκρίνουν χυμοκίνες και κυτταροκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-17^A που αυξάνει το δυναμικό αυτοανανέωσης και διείσδυσης στους πέριξ ιστούς των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων [299]. Αυτό το στοιχείο μάλιστα δηλώνει τις αρνητικές συνέπειες που μπορεί να έχει η χορηγηθείσα χημειοθεραπεία στην οργάνωση του μικροπεριβάλλοντος και στην επιρροή του στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Σίγουρα, υπάρχουν ακόμα αρκετές μελέτες που ασχολούνται με τον τρόπο δράσης του μικροπεριβάλλοντος στον καρκινικό όγκο.

30.ΤΟ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ

Αρκετά έως τώρα στοιχεία αναδεικνύουν τη σχέση των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων με το μεταστατικό δυναμικό του όγκου. Μια μελέτη υποστηρίζει πως ένας υποπληθυσμός CD26 κυττάρων θα μπορούσε να φέρει μεγάλο μερίδιο ευθύνης για την δημιουργία όγκων σε απομακρυσμένες περιοχές [299].

Υπάρχει δηλαδή στον όγκο μια ιδιαίτερη κυτταρική ομάδα, η οποία αποτελείται από κύτταρα στην αρχή σε λανθάνουσα κατάσταση, που κάποιο ερέθισμα τα ενεργοποιεί, οδηγώντας σε συνεχή ανανέωση του πληθυσμού τους, ενώ ταυτόχρονα είναι ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία. Εδώ προκύπτει και το ερώτημα του κατά πόσο ένας αρχικός καρκινικός όγκος από το παχύ έντερο, μπορεί να αποικίσει διαφορετικά όργανα και με ποιόν τρόπο.

Αναφορές τονίζουν ότι καρκινικά βλαστικά κύτταρα που εκφράζουν το δείκτη CD110 δύναται να αποικίσουν το ήπαρ, ενώ αυτά που εκφράζουν το δείκτη

CD133+, μπορούν να μεταναστεύσουν στον πνεύμονα [300]. Η θρομβοποιητίνη που παράγεται στο ήπαρ ευνοεί τα αρχέγονα CD110+ κύτταρα να μεταναστεύουν στο ηπατικό παρέγχυμα, ενώ από την άλλη τα CD133+ κύτταρα ευνοούνται από το μικροαγγειακό ενδοθήλιο του πνεύμονα. Με αυτόν τον τρόπο συγκεκριμένες κυτταρικές ομάδες έχουν μεγαλύτερη ευκολία ανάπτυξης σε συγκεκριμένα όργανα-στόχους. Και οι δύο αυτοί πληθυσμοί συγκαταλέγονται στην ομάδα των CD133+ κυττάρων, έχουν αρνητική συσχέτιση με την πορεία και την έκβαση του ασθενούς και διατηρούν όλες τις ιδιότητες των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων.

Αν και φαίνεται ότι όλα τα κύτταρα ενός όγκου που θα οδηγήσουν στη μετάσταση είναι τα βλαστικά, εντούτοις δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα, αν όλα τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα της μετάστασης. Μελέτες σε πρῶιμους όγκους παχέος εντέρου και σε μεταστατικές εστίες δεν ανέδειξαν ιδιαίτερες μεταλλάξεις που να εξηγούν τι οδήγησε στη μετάσταση. Φαίνεται, ότι η τροποποίηση πρωτεϊνών ρυθμιστών ή η μετάλλαξη των γονιδίων τους, μεταλλάσσει τον τρόπο που τα καρκινικά κύτταρα αντιδρούν σε ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος. Αυτό ίσως να αποτελεί μια αρχική προετοιμασία του όγκου για τη μετάσταση [301]. Το μοριακό μονοπάτι TGF- β επηρεάζει την επικοινωνία των καρκινικών κυττάρων στις μεταστατικές θέσεις με το μικροπεριβάλλον. Αρχικά, γνωρίζουμε ότι δρα ογκοκατασταλτικά κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης, ενώ αργότερα όπου ο καρκινικός φαινότυπος αναπτύσσεται, δρα συνεργικά, μια αλλαγή που πιθανόν να οφείλεται και σε μεταλλάξεις στο p53 και SMAD4 [302]. Μάλιστα, σε προχωρημένα στάδια η ενεργοποίηση του μονοπατιού σχετίζεται με κακή πρόγνωση για τον άρρωστο, αφού ευνοείται η προοδευτική ανάπτυξη των μεταστατικών εστιών και ο μεγαλύτερος αποικισμός απομακρυσμένων οργάνων. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν από μόνα τους την ικανότητα να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι είτε με άμεση έκκριση TGF- β είτε ελκύνοντας κύτταρα που τον παράγουν, όπως τα μακροφάγα, τα αιμοπετάλια και οι καρκινικοί ινοβλάστες [303].

Μια ακόμα κυτταρική ομάδα που συμμετέχει στην έναρξη της μετάστασης είναι τα CD44v6+ κύτταρα, τα οποία ο οργανισμός προσπαθεί μέσω BMPs να αντιμετωπίσει προκαλώντας τη διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων, αλλά και την απαλοιφή του δείκτη CD44v6. Από την άλλη μεριά όμως, παράγοντες όπως ο HGF ενεργοποιούν το δείκτη PI3K και αυξάνουν την ενεργοποίηση της β -κατενίνης, προσθέτοντας στα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα το δυναμικό της μετάστασης, που μέχρι εκείνη την στιγμή δεν κατείχαν [264]. Η κατάληξη είναι τα CD44v6+ κύτταρα που έχουν υποστεί επαναπρογραμματισμό, να υποκινούν την επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή, όπου η δυνατότητα διείσδυσης στους πέριξ ιστούς οδηγεί στην δημιουργία μεταστάσεων.

Τέλος, μια περίεργη αντίθεση καθιστά αναγκαία τη διενέργεια και άλλων μελετών. Ο ανταγωνισμός που αναφέραμε νωρίτερα μεταξύ BMPs και PI3K/ β -

κατενίνης αναστρέφεται σε περιπτώσεις με μετάλλαξη στο γονίδιο SMAD4, όπου εκεί οι BMPs μπορούν να δράσουν θετικά για την ανάπτυξη του όγκου σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, μέσω ενεργοποίησης ενός μοριακού μονοπατιού ROCK [264]. Σε άλλες έρευνες όμως η BMP4 προωθεί τη διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων ανεξάρτητα των επιπέδων SMAD4 [304].

ΟΡΙΑ ΣΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Αρκετές μέθοδοι εφαρμόζονται για την απομόνωση και ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων από ασθενείς με διαγνωσμένο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με στόχο τη μελέτη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων. Κυρίως χρησιμοποιούνται πολυκυτταρικές *σφαιροειδείς και οργανοειδικές in vitro* καλλιέργειες. Με τις οργανοειδικές *in vitro* καλλιέργειες μπορούν να εμφυτευθούν τα κύτταρα σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια ή να δημιουργηθούν ξενομοσχεύματα και να μεταμοσχευθούν σε ποντίκια .

Οι *in vitro 3D οργανοειδικές καλλιέργειες* χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη φυσιολογικών και νεοπλασματικών αρχέγονων κυττάρων [305]. Τα οφέλη των οργανοειδικών καλλιέργειών προκύπτουν από την ανίχνευση των γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν στις διάφορες φάσεις της καρκινογένεσης, όπως για παράδειγμα το p53 και KRAS.

Η δημιουργία ξενομοσχευμάτων χρησιμοποιείται συχνά σε ερευνητικές μελέτες που αφορούν στην αποτελεσματικότητα διαφόρων χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων. Επίσης δίνεται η δυνατότητα αποσαφήνισης της γενετικής ετερογένειας και διερευνώνται πιο εύκολα οι μηχανισμοί που δρομολογούν τη διαδικασία της μετάστασης. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το μικροπεριβάλλον του ξενιστή είναι αρκετά διαφορετικό από το ανθρώπινο με αποτέλεσμα να αλλάζουν οι συνδυαστικές συνθήκες ανάπτυξης του όγκου μειώνοντας την αξία των προκλινικών μελετών. Στη διαφορετικότητα συμβάλλει και η παρουσία λεμφοκυττάρων και των παραγόμενων κυτταροκινών.

Ένας ακόμα περιοριστικός παράγοντας είναι ο αριθμός των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Ο υπολογιζόμενος αριθμός των καρκινικών αρχέγονων κυττάρων είναι περίπου 1 ανά 57000 κύτταρα, κάτι το οποίο δεν επιβεβαιώνεται σε όλες τις μελέτες ώστε να αποτελεί ακόμα ένα ερώτημα [262]. Μία τελευταία αρνητική παράμετρος είναι ότι η έκφραση των διαφόρων καρκινικών δεικτών επιφανείας, όπως το CD133, ποικίλλουν από δείγμα σε δείγμα, ώστε να μην μπορούν να θεωρηθούν πλήρως αξιόπιστα τα όποια αποτελέσματα [306].

Με τη μέθοδο των σφαιροειδών καλλιέργειών μπορεί να παραχθεί μεγάλος αριθμός καρκινικών αρχέγονων κυττάρων προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε διάφορα πειράματα ή να αποθηκευθούν για μελλοντική χρήση. Το μειονέκτημα είναι η *in vitro* ανάπτυξη αυτών των κυττάρων, που σημαίνει πως έχουν παρακαμφθεί αρκετά μοριακά μονοπάτια της καρκινογένεσης.

Επιπλέον, είναι πιθανόν ο πολλαπλασιασμός τους να επηρεάζεται από μεταλλάξεις, που οφείλονται στα χρησιμοποιούμενα καλλιεργητικά υλικά. Τέλος, τα κύτταρα των σφαιροειδών καλλιεργείων που προέρχονται από χειρουργικά παρασκευάσματα είναι αρκετά μικρά .

31.Η ΣΧΕΣΗ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Έως τώρα έχουμε αναλύσει τη σχέση των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων με την πορεία νόσου του ασθενούς. Παρ' όλα αυτά δεν είναι ακόμα πλήρως αποδεκτή η θεωρία, ότι η πρόγνωση μπορεί να αξιολογείται από τα επίπεδα ορισμένων δεικτών επιφανείας. Μια μετά-ανάλυση 15 μελετών ανέδειξε το δείκτη CD133 ως ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα, ενώ ο δείκτης LGR5 δεν φαίνεται να επηρεάζει την πρόγνωση των ασθενών [307,308]. Επίσης, πολυμορφισμοί σε γονίδια δεικτών όπως LGR5, CD44, ALDH1A1, σε ασθενείς σταδίου II και III, σχετίστηκαν με μικρότερο χρόνο εμφάνισης υποτροπής της νόσου, κάτι που θολώνει ακόμα περισσότερο το τοπίο [309].

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν πλέον έναν ακόμα στόχο για τα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα. Αρκετές μελέτες που έχουν αναφερθεί δείχνουν πως τα κύτταρα αυτά προσδίδουν σε πολλές περιπτώσεις αντοχή στον καρκινικό όγκο όσον αφορά τη χορηγηθείσα θεραπεία και ευθύνονται πιθανόν και για τυχόν υποτροπή. Η επίθεση σε αυτόν τον ιδιαίτερο πληθυσμό κυττάρων μπορεί να γίνει στοχεύοντας τα μοριακά μονοπάτια που ευνοούν την αυτοανανέωσή τους, αναστέλλοντας τα αντιαποπτωτικά σήματα, ενισχύοντας τις διαδικασίες διαφοροποίησης ή τροποποιώντας την λειτουργία των σημάτων του μικροπεριβάλλοντος. Σε παλαιότερες μελέτες φάνηκε πως η αναστολή της αυτοκρινούς έκκρισης IL-4 αύξησε τη χημειοευαισθησία των κυττάρων μέσω μείωσης της παραγωγής αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, ενώ η αναστολή του μονοπατιού Notch οδήγησε σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους [310,311]. Κλινικές δοκιμές δείχνουν θετικά αποτελέσματα όταν στοχεύονται παράγοντες του μονοπατιού WNT, προκαλώντας αποτέλεσμα παρόμοιο με το αναμενόμενο από τις BMPs, καθιστώντας την χημειοθεραπεία περισσότερο αποτελεσματική, κάτι που εξαρτάται όμως από τις ποσότητες των κυτταροκινών που εκκρίνονται από το μικροπεριβάλλον [264,304].

Σήμερα πολλές έρευνες αφορούν ασθενείς με μεταστατική νόσο για να βρεθεί τρόπος περιορισμού της καρκινικής διασποράς. Υπάρχουν αρκετές

δυσκολίες, καθώς οι εργαστηριακές μελέτες με τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να υιοθετήσουν πλήρως τις συνθήκες περιβάλλοντος. Για παράδειγμα υπάρχουν αρκετά στοιχεία που δείχνουν ότι η χορήγηση αναστολέων του PI3K μειώνει την πιθανότητα μετάστασης και μάλιστα η δραστηριότητα της β-κατενίνης εξαρτάται σημαντικά από το PI3K, που σημαίνει ότι μπορεί να υπάρξει επιπλέον θετικό αποτέλεσμα.

Στην πράξη η θεραπεία που χορηγείται πρέπει να στοχεύει τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα της αρχικής πηγής, καθώς η αρχική μείωση του όγκου μπορεί να οδηγήσει σε δεύτερο χρόνο στην εμφάνιση ενός ακόμα πιο επιθετικού όγκου. Οι μελέτες λοιπόν που αφορούν ασθενείς με μεταστατική νόσο δεν δύναται να προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για αυτήν την ομάδα κυττάρων, αφού στις βαριές αυτές περιπτώσεις η θεραπεία αποσκοπεί στη στόχευση κυρίως των μεταστατικών εστιών, ενώ πιθανόν να έχει καταστραφεί ήδη η αρχιτεκτονική της βλαστικής καρκινικής πηγής [265]. Χρειάζεται να υπολογίζεται κάπως ο αριθμός των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, λαμβάνοντας υπόψη όμως ότι ο χρόνος έκφρασης και το ποσοστό των δεικτών επιφανείας ποικίλλει από άτομο σε άτομο. Συνεπώς, η βιολογία των κυττάρων αυτών πρέπει να γίνει περισσότερο κατανοητή για να υπάρξει και καλύτερη αντιμετώπισή τους. Παράδειγμα ο δείκτης CD44 φυσιολογικά εκφράζεται στη βάση της υπό διαίρεση κρύπτης στη ζώνη πολλαπλασιασμού, ενώ σε συνθήκες νεοπλασματικής μετατροπής εκφράζεται στην επιφάνεια του αυλού. Ο δείκτης CD133 αφορά αδιαφοροποίητα καρκινικά κύτταρα, ο CD44 όταν στοχεύθηκε από μονοκλωνικά αντισώματα οδήγησε σε μείωση της εγκατάστασης καρκινικών κυττάρων στο μυελό των οστών και στο σπλήνα [312,313]. Η β2 σπεκτρίνη είναι μειωμένη σε καρκινικούς όγκους και έτσι προσφέρει τη δυνατότητα να ανιχνευθεί πρώιμα ή να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη καρκινικής εστίας. Η αναστολή του γονιδίου για CDK4, κάτι που κανονικά γίνεται από το μονοπάτι TGFβ, μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επίσης, μπορεί να επηρεαστεί ο συμμετρικός διαχωρισμός των βλαστικών κυττάρων που ευνοεί την ανάπτυξη του όγκου [314].

32.Η ΧΗΜΕΙΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Βασικά η θεραπεία της ορθοκολικής νεοπλασίας περιλαμβάνει συνδυασμό 5-φθοριουρακίλης, οξαλιπλατίνης με ή χωρίς λευκοβορίνη, ή 5-φθοριουρακίλη, λευκοβορίνη και ιρινοτεκάνη. Παρόλα αυτά η θεραπεία αποτυγχάνει στο 90% των περιπτώσεων μεταστατικής νόσου, λόγω αντοχής του όγκου, κάτι που οφείλεται στο μεταβολισμό της γλουταμίνης, στη σύνθεση λιπαρών οξέων, στην αερόβια γλυκόλυση, με αποτέλεσμα την αποφυγή της απόπτωσης [315]. Οι ουσίες που χορηγούνται προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στα καρκινικά κύτταρα, αυξάνοντας τη γλυκόλυση και εν συνεχεία τη συσσώρευση NADPH, γεγονός όμως που ενισχύει τη χημειοανθεκτικότητα. Αυξημένα επίπεδα ATP ενεργοποιούν τις μεταφορικές πρωτεΐνες του φαρμάκου αυξάνοντας την εκροή του, έτσι διεγείρεται ο παράγοντας της υποξίας HIF-1^α με αποτέλεσμα την αντοχή των καρκινικών κυττάρων στην υποξία [316]. Ο HIF-1α ενισχύει την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας μέσω αντι-αποπτωτικών ή άλλων μηχανισμών, επίσης μειώνει τα αποπτωτικά σήματα, μέσω έκκρισης υποδοχέων όπως ο DcR2, που ανταγωνίζεται τα αποπτωτικά σήματα (TNF), έτσι μειώνεται η δράση των μοριακών μονοπατιών που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο [317,318].

Ένας άλλος τρόπος όπου τα κύτταρα έχουν ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία, είναι η συνεχής παραγωγή παραγόντων που ενισχύουν την κυτταρική επιβίωση. Για παράδειγμα, όταν υαλουρονάνη συνδεθεί στον υποδοχέα CD44 ενεργοποιείται ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας. Αυτό ενεργοποιεί τις κινάσες MAP και άλλα μοριακά μονοπάτια που ευνοούν την κυτταρική επιβίωση έναντι ουσιών, όπως η μεθοτρεξάτη, η σισπλατίνη και η ανδριαμυκίνη [319-321]. Μάλιστα ενεργοποιούνται μηχανισμοί που απαιτούν κανονικά τον EGFR, χωρίς τη σύνδεση αυτού του παράγοντα κάτι που καθιστά τα αντι-EGFR σκευάσματα ανώφελα στη συγκεκριμένη περίπτωση [322].

Ο υποδοχέας CD47 όταν συνδεθεί με τη σηματοδοτική ρυθμιστική πρωτεΐνη α (SIRPα), παρέχει στο κύτταρο αντιφαγοκυτταρικές ιδιότητες, γι' αυτό τα καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένη έκφραση αυτού του υποδοχέα. Η έκφρασή του σχετίζεται με την ανάπτυξη του όγκου, την χημειοαντοχή και το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, ιδίως σε συμπαγείς όγκους, αλλά και νεοπλασίες του αιμοποιητικού συστήματος [323].

Τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα φαίνεται πως τελικά αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα κυττάρων στον όγκο, με διαφορετικές ικανότητες και είναι απαραίτητο θεραπευτικά να στοχεύονται συγκεκριμένα από φάρμακα που έχουν ιδιαίτερο προσανατολισμό, προς αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό.

Αρκετά φάρμακα έχουν ανακαλυφθεί για τη αντιμετώπιση των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων, με ουσίες που μεταφέρονται στον οργανισμό μέσω μικροβιακών παραγόντων [324,325]. Είναι μοριακοί αναστολείς εναντίον συγκεκριμένων παραγόντων των μοριακών μονοπατιών τους. Η μετφορμίνη, η τρανιλάστη, η θειοριδαζίνη, μονοκλωνικά αντισώματα και αντισώματα έναντι δεικτών επιφανείας (CD44, Cd47, EpCAM, CD123, GD2, LGR5), είναι ορισμένα από αυτά [324,326]. Επιπλέον, μελετώνται τεχνικές που θα αυξήσουν το χρόνο ημίσειας ζωής του φαρμάκου στον οργανισμό και θα βελτιώσουν την ειδικότητα του εναντίον των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων, αποφεύγοντας άλλες κυτταρικές ομάδες.

33.ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα που είναι ανθεκτικά στη δράση της 5-φθοριουρακίλης ή στην οξαλιπλατίνη, μπορούν να ευαισθητοποιηθούν με τη χορήγηση ενός αντισώματος που μπλοκάρει την ιντερλευκίνη-4. Η ρύθμιση της αυτοκρινούς έκκρισης της IL-4 επηρεάζει σημαντικά τη χημειοανθεκτικότητα του όγκου [327,328]. Σε άλλη μελέτη φαίνεται πως η χρήση αντισώματος έναντι του παράγοντα της οικογένειας των επιδερμικών αυξητικών παραγόντων, EREG (επιρεγκουλίνη), μειώνει το μεταστατικό δυναμικό του όγκου. Βέβαια, αυτό το αντίσωμα απαιτεί έγκαιρη χορήγηση σε πρώιμα στάδια της νόσου και όταν ο όγκος είναι πλούσιος σε βλαστικά καρκινικά κύτταρα [328].

Άλλοι προτείνουν η χορήγηση των αντισωμάτων να συνοδεύεται και από κυτταροστατικά φάρμακα. Αυτοί οι συνδυασμοί πιστεύεται ότι μπορούν να οδηγήσουν σε εκτεταμένη βλάβη στο σύνολο του όγκου, μαζί με την αρχική πηγή των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων, μειώνοντας δραστικά τον κίνδυνο υποτροπής [324, 329,330]. Αυτό που προσπαθούν πολλοί ερευνητές, όμως είναι αντισώματα να αναγνωρίζουν τους δείκτες επιφανείας που αφορούν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζουν τα αντίστοιχα φυσιολογικά [331].

34.Η ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Το πεδίο της νανοτεχνολογίας γνωρίζει συνεχή πρόοδο με αποτέλεσμα να απαιτούνται νέες τεχνικές αλληλεπίδρασης της βιοτεχνολογίας με πρωτεϊνικά μόρια ακόμα μικρότερου μεγέθους. Ένα επιθυμητό αποτέλεσμα είναι η υποβοήθηση της μεταφοράς του φαρμάκου στον συγκεκριμένο στόχο αποφεύγοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειες στους φυσιολογικούς ιστούς. Το σύστημα μεταφοράς λαμβάνει υπόψη τον τρόπο δράσης του φαρμάκου, την υδατοδιαλυτότητά του και τη μη ειδική τοξικότητα που πιθανόν έχει στους φυσιολογικούς ιστούς που επηρεάζει. Για παράδειγμα πολυμερή μικύλλια που σχηματίστηκαν από την συσσωμάτωση αμφίφιλων πολυμερών, μεταφέρθηκαν μαζί με την κυτταροτοξική χημειοθεραπευτική ουσία μετά από ενδοφλέβια χορήγηση στην περιοχή του όγκου. Εκεί παρατηρήθηκε αύξηση της διαπερατότητας και επιμήκυνση του χρόνου παραμονής του φαρμάκου στο σημείο-στόχο [332]. Σε άλλη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια ως υποβοηθητικά για την απελευθέρωση 5-φθοριο ουρακίλης σε συγκεκριμένη περιοχή του όγκου με πολύ καλά αποτελέσματα. Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση της χημειοευαισθησίας στην πακλιταξέλη μετά από μεταφορά στον όγκο si-RNAs μέσω νανομορίων με στόχο την αποσύνθεση της πρωτεΐνης MDR1, η οποία υπερεκφράζεται σε αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου [333].

Τέλος, πειραματικά μοντέλα έχουν δείξει τον επιπλέον ρόλο δύο κατηγοριών νανοσωματιδίων. Η πρώτη κατηγορία (nickel zinc ferrite) δρα κυτταροτοξικά στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα και η άλλη κατηγορία (silver) επάγει τον κυτταρικό θάνατο αναστέλλοντας την απόπτωση και επηρεάζοντας την έκφραση του γονιδίου p53 [334,335].

35.Ο ΔΕΙΚΤΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ LGR5

36.Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ GPCR

Οι G-πρωτεϊνικοί υποδοχείς, ανήκουν σε μια μεγάλη και πολυποίκιλη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών με πάνω από 800 γονίδια να ρυθμίζουν την έκφρασή τους [336]. Συμμετέχουν στη μεταφορά σημάτων για απαραίτητες λειτουργίες του κυττάρου, που αφορούν την ανοσιακή απάντηση, τη μεταφορά σημάτων σε νευρικές οδούς, τη μυϊκή ή καρδιακή σύσπασση, την έκκριση σημαντικών ενζύμων, τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσεως κ.α. Η οικογένεια αυτή υποδοχέων απαντά σε μια μεγάλη κλίμακα ερεθισμάτων, από φωτόνια μέχρι ιόντα, μικρά οργανικά μόρια, πεπτιδία και πρωτεΐνες [337]. Μόλις, συνδεθεί το ερέθισμα, ο υποδοχέας υφίσταται αλλαγές προκειμένου να προκαλέσει μέσα στο κυτοσόλιο την κατάλληλη απάντηση και δραστηριότητα.

Φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του άσθματος, της παλινδρόμησης, του καρκίνου, σε αλλεργίες, στην κατάθλιψη, έχουν ως βασικό τρόπο δράσης τους τις πρωτεΐνες GPCR. Μάλιστα, στο 50-60% του συνόλου των σύγχρονων θεραπειών συμμετέχουν είτε ως βασικά συστατικά είτε ως δευτερεύοντα [338]. Σε κάθε μία περίπτωση η αλλαγή στη στερεοδομή του υποδοχέα είναι συγκεκριμένη, που σημαίνει πως δύναται μελλοντικά να αναπτυχθούν στοχευμένα φάρμακα για συγκεκριμένες ασθένειες.

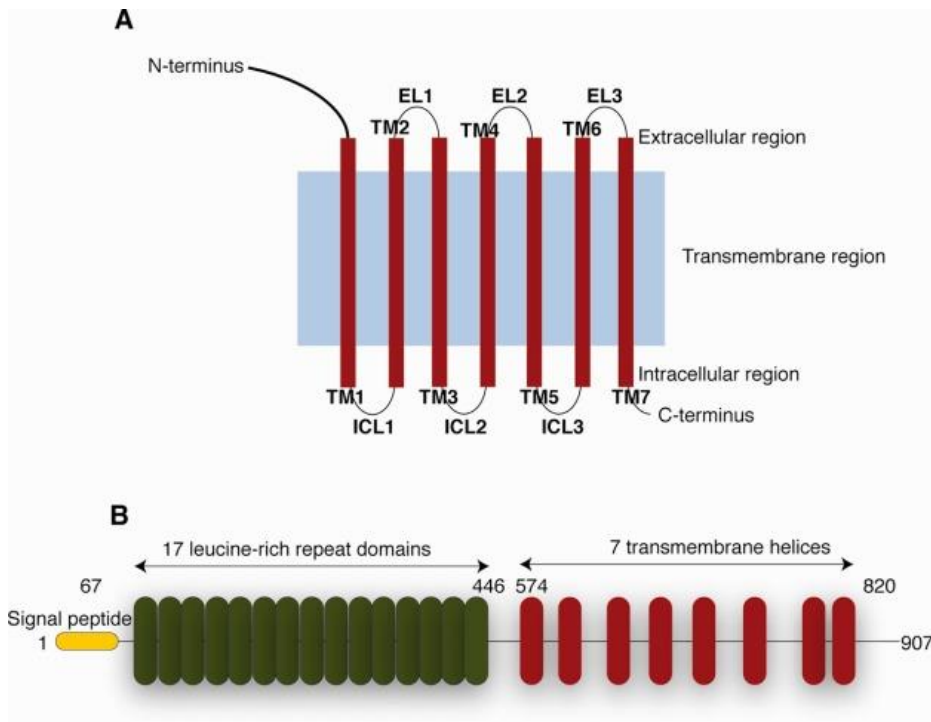
Ο προσδιορισμός της τροποποίησης της στερεοτακτικής δομής του υποδοχέα περιλαμβάνει την έκφραση ιδιαίτερων πρωτεϊνών, την απαλοιφή άλλων και την κρυσταλλοποίηση. Η μοριακή βιολογία έχει αναπτύξει μεθόδους που αποτυπώνει τα διάφορα στάδια από τα οποία περνάει ο υποδοχέας κατά την ενεργοποίησή του. Ορισμένες από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται είναι η χρήση T4 λυσοζύμης και αποκυτοχρώματος ως συνδετικά μόρια, η συνκρυσταλλοποίηση με μονοκλωνικά αντισώματα από καμήλες και η θερμοσταθεροποίηση [339-341]. Συνεχώς όμως νέες μέθοδοι μελετώνται και γίνεται προσπάθεια βελτίωσης των ήδη υπαρχόντων.

Μια πρωτεΐνη GPCR περιλαμβάνει τρεις ζώνες στη στερεοδομή της:

-μια εξωκυττάρια περιοχή με N-τελικό άκρο σχηματίζοντας 3 θηλιές (ECL1-ECL3)

-ένα διαμεμβρανικό τμήμα 7 α-ελίκων (TM1-TM7)

-ένα ενδοκυττάριο τμήμα που περιέχει τρεις θηλιές (ICL1-ICL3), μια αμφιπαθητική έλικα και το C-τελικό άκρο [342]



Σχηματική απεικόνιση GPCR και LGR5. (A) γενική αρχιτεκτονική GPCR (B) LGR5 περιέχει ένα πεπτίδιο που ακολουθείται από επαναλαμβανόμενα πεπτίδια λευκίνης. Περιέχει μια σύνδεση μεταξύ του τελευταίου πεπτιδίου και του πρώτου διαμεμβρανικού τμήματος, με 7 τέτοια τμήματα να ακολουθούν [343]

Σε κάθε στάδιο κατά την λειτουργία του υποδοχέα υπάρχουν ενεργά, ενδιάμεσα και ανενεργά σημεία, που όλα συμμετέχουν στην συνολική ενεργοποίησή του [344,345]. Η σύνδεση του εξωκυττάριου σήματος προκαλεί αλλαγές στο διαμεμβρανικό τμήμα, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί ακόμα μεγαλύτερες αναδιατάξεις ενδοκυττάρια [346].

37.ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ GPCR

Οι υποδοχείς GPCR διακρίνονται σε 4 μεγάλες κατηγορίες με την πρώτη να είναι και η πιο εκτεταμένη:

-τάξη Α: υποδοχείς με δράση ροδοψίνης(διαχωρίζονται σε 4 υποκατηγορίες)

-τάξη Β: υποδοχείς με δράση σεκρετίνης

-τάξη Γ: υποδοχείς γλουταμίνης/φερορμόνης

-τάξη Δ: υποδοχείς οικογενείας Frizzled [347]

38.Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΠΛΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΛΕΥΚΙΝΗ LGRs

Ο LGR5 υποδοχέας ανήκει στην τάξη Α και περιλαμβάνει μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία λευκίνης (LRR) εξωκυττάρια, ενώ συνδέει και μια περιοχή GPCR με δράση ροδοψίνης. Οι περιοχές αυτές περιέχουν υδρόφοβα αμινοξέα με επαναλήψεις λευκίνης σε συγκεκριμένες θέσεις [348]. Κατηγοριοποιούνται σε τρεις οικογένειες ανάλογα με τον πληθυσμό των LRR, τη παρουσία ενός υποδοχέα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης LDLα και το μήκος σύνδεσης ενός τμήματος που ενώνει την GPCR περιοχή με το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα [349,350].

Η οικογένεια Α χαρακτηρίζεται από μεγάλο μήκος του συνδετικού τμήματος και 7-9 αλληλουχίες LRRs. Αρκετοί ορμονικοί γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία, όπως ο TSHR, της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης. Η οικογένεια C αν και έχει ίδιο ρυθμό αλληλουχιών LRRs, όμως το συνδετικό τμήμα είναι πιο κοντό και περιέχουν υποδοχείς LDLα. Εδώ ανήκουν οι ορμονικοί υποδοχείς ρελαξίνης [348,351]. Τέλος, η οικογένεια Β (LGR4, LGR5, LGR6) χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη 13-18 αλληλουχιών LRRs.

Το ενδιαφέρον για τους υποδοχείς LGR προέκυψε όταν ανακαλύφθηκε η έκφρασή τους στην επιφάνεια αρχέγονων κυττάρων σε επιθηλιακά κύτταρα δέρματος, εντέρου και του μαστού [352-354].

39.ΤΙ ΕΙΝΑΙ Ο ΔΕΙΚΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ LGR5

Το γονίδιο LGR5 δρα συνεργικά με το γονίδιο του υποδοχέα WNT, εκφράζοντας μια οικογένεια αγωνιστών του μοριακού μονοπατιού WNT, με την ονομασία R-spondins. Ο δείκτης αυτός έχει ανευρεθεί σε ποντίκια σε αρχέγονα κύτταρα του στομάχου και του λεπτού εντέρου, ενώ αναγνωρίστηκε και σε βλαστικά εντερικά κύτταρα του ανθρώπου. Σε μελέτες με *in situ* υβριδισμό το mRNA του γονιδίου για τον LGR5 ευρέθη στη βάση της κρύπτης, ίδιο μοτίβο με αυτό που ανευρέθη στα ποντίκια [355-357].

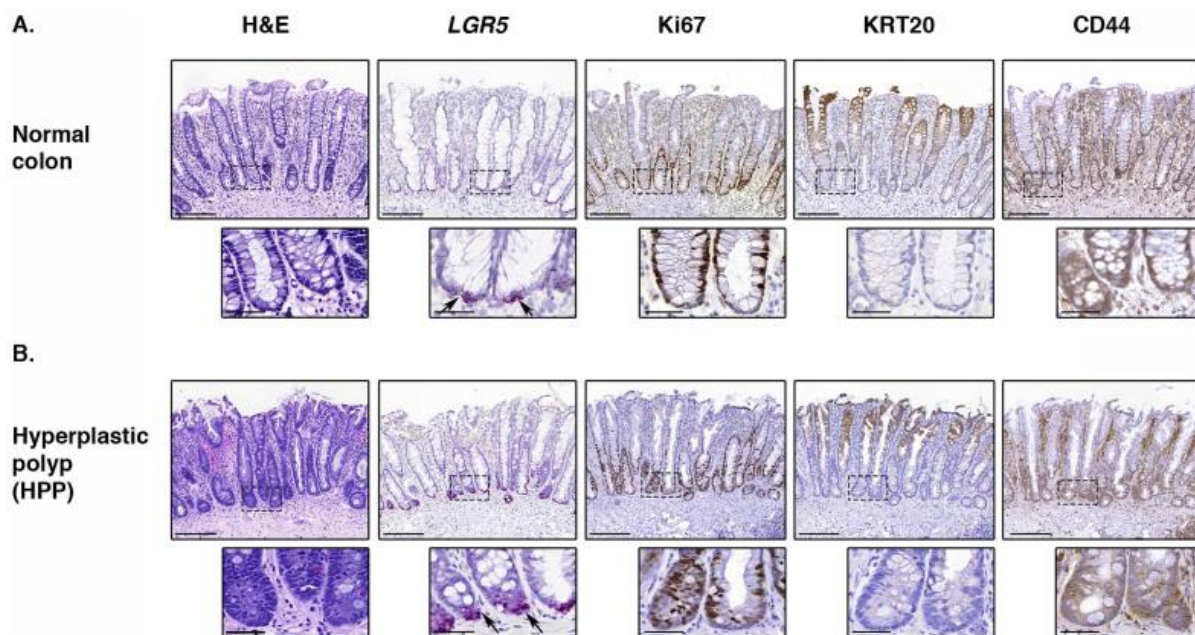
Σε ιστούς από αδενώματα του παχέος εντέρου απομονώθηκαν σε σημαντικό ποσοστό αρχέγονα κύτταρα LGR5+. Ενώ γνωρίζουμε ότι είναι αρκετά μεγάλος ο αριθμός των αρχέγονων κυττάρων εντούτοις ένα μόνο ποσοστό είναι ενεργά την κάθε στιγμή και άρα το ποσοστό έκφρασης του δείκτη αλλάζει σε κάθε χρονική στιγμή και ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν [358]. Το γεγονός λοιπόν ότι μικρό μέρος των βλαστικών κυττάρων είναι ενεργό κάθε δεδομένη χρονική περίοδο πιθανόν να εξηγεί και τον χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης ενός αδενώματος [359].

Σε μια μεγάλη μελέτη που αφορούσε συγκεκριμένα το δείκτη LGR5 σε αδενώματα, φάνηκε πως δεν εκφραζόταν μόνο στη βάση της κρύπτης, αλλά ακολουθούσε η έκφραση του μια ιδιαίτερη διαδρομή μέχρι τον αυλό του εντέρου [360].

Με ανοσοιστοχημεία έχουν καταλήξει ορισμένες έρευνες σε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού έκφρασης του LGR5 στην επιφάνεια των κυττάρων και στο στάδιο του όγκου [361]. Όμως η αξιοπιστία των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται παραμένει υπό αμφισβήτηση. Η εύρεση του δείκτη είναι αναμενόμενο να εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα στη βάση της κρύπτης, αλλά σε αδενοκαρκινώματα αλλάζει αυτή η κατανομή, χωρίς όμως να μπορεί ακόμα να σχηματισθεί κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο [357].

40.ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΤΕΡΟ ΚΑΙ ΣΕ ΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΟΥΣ ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ

Φαίνεται σε αρκετές μελέτες [363] ότι ο δείκτης επιφανείας LGR5 σε φυσιολογικές εντερικές κρύπτες εκφράζεται σε σχετικά μικρό ποσοστό των αρχέγονων κυττάρων και κυρίως στη βάση. Με τον ίδιο τρόπο και το αντίστοιχο mRNA ανιχνεύεται σε παρόμοιο ποσοστό, κάτι που υποδηλώνει ότι το γονίδιο του οδηγείται σε μεταγραφή σπάνια, υπό κανονικές συνθήκες .



Αρχιτεκτονική των αρχέγονων κυττάρων σε φυσιολογικά εντερικά κύτταρα και υπερπλαστικούς πολύποδες. Τα κουτάκια δείχνουν την εμφάνιση του δείκτη στη βάση της κρύπτης [362].

Στην ίδια μελέτη που αναφέρθηκε ανωτέρω [363] έγινε προσπάθεια ανίχνευσης του δείκτη σε υπερπλαστικούς πολύποδες, προκειμένου να διαπιστωθεί πως επηρεάζεται η έκφρασή του. Αν και απομονώθηκε ως επί τω πλείστων στη βάση της κρύπτης πάλι, αυτή τη φορά όμως η συχνότητα και η πυκνότητα των κυττάρων LGR5+ ήταν μεγαλύτερη. Επίσης, βρέθηκε και πιο συχνή εμφάνιση του CD44 σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κρύπτες.

41. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ LGR5

Η αναγνώριση του LGR5 σαν δείκτη επιφανείας των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων οδήγησε στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου των αρχέγονων κυττάρων στην καρκινογένεση. Η διατήρηση της ομοιοστασίας του εντερικού επιθηλίου είναι πολλή σημαντική στην σωστή λειτουργία του οργάνου. Βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς συγκεκριμένες ομάδες, ενώ δημιουργούνται νέα αδιαφοροποίητα σε αδρανή κατάσταση, έτοιμα υπό κατάλληλες συνθήκες να ενεργοποιηθούν. Με αυτόν τον τρόπο, πιθανές διαταραχές στις μοριακές οδούς, εύκολα οδηγούν σε ανεπιθύμητες καταστάσεις, όπως ο καρκίνος.

Συχνά τα αρχέγονα κύτταρα οδηγούνται σε ασύμμετρο διαχωρισμό προκειμένου να καλύψουν τις ανάγκες για νέα κύτταρα με ταυτόχρονη διατήρηση ενός αρχικού κυτταρικού πληθυσμού. Μελέτες σε αρχέγονα κύτταρα LGR5+, έδειξαν, ότι ο τρόπος διαχωρισμού τους είναι κατά βάση συμμετρικός και μάλιστα τα νέα κύτταρα σπάνια ακολουθούν διαφορετικές οδούς διαφοροποίησης. Καθημερινά τα LGR5+ διπλασιάζονται και οι ιδιότητες που θα έχουν τα νέα κύτταρα αποφασίζονται στοχαστικά. Κατά τη διάρκεια ιδίως της μίτωσης η συσσώρευση των χρωμοσωμάτων γίνεται με τυχαίο τρόπο [364,365].

Σε ομοζυγώτες με βλάβη στο γονίδιο του LGR5, το αποτέλεσμα είναι ο νεογνικός θάνατος καθώς προκαλούνται σημαντικές γαστρεντερικές διαταραχές, μη συμβατές με την ζωή [366]. Οι μελέτες αφορούν ποντίκια, στα οποία ανιχνεύθηκε στο μεγαλύτερο ποσοστό αγκυλογλωσσία. Αυτές ήταν και οι πρώτες ενδείξεις για τη σημασία του LGR5. Στα ίδια ποντίκια βρέθηκε επίσης, ότι στο αναπτυσσόμενο έντερο, τα κύτταρα Paneth εμφάνιζαν μεγαλύτερο ρυθμό ωρίμανσης, που σημαίνει πιθανόν, ότι η έκφραση του δείκτη σχετίζεται με αρνητική ρύθμιση του μοριακού μονοπατιού WNT κατά τη νεογνική περίοδο [367].

Μέσω μελέτης του RNA κατά την έκφραση του γονιδίου του LGR5 το ίδιο συμπέρασμα της αρνητικής ρύθμισης του WNT υπήρξε και σε ιστούς από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, όπου ο LGR5 εκφραζόταν περισσότερο ή λιγότερο του φυσιολογικού [368]. Η ίδια μελέτη, κατέληξε ότι η υπερέκφραση του LGR5 κατέστειλε το μονοπάτι WNT, ενώ επίσης οδηγούσε σε αυξημένη προσκόλληση των εντερικών κυττάρων, μείωση της κλωνογονικότητας και εξασθένηση του ογκογεννητικού δυναμικού [368]. Συνεπώς συμπεραίνουμε με πολλή προσοχή βέβαια, ότι η καταστολή της έκφρασης του LGR5 έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση του μοριακού μονοπατιού WNT, που συνεισφέρει

σε αυξημένη διεισδυτικότητα των κυττάρων, υπέρμετρη ανάπτυξή τους και αυξημένο δυναμικό καρκινικής μετατροπής.

42.ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΟΥ LGR5 ΩΣ ΔΕΙΚΤΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Είναι γνωστό από καιρό ότι το επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα ανανεώνεται συνεχώς και πως ένας συγκεκριμένος πληθυσμός βλαστικών κυττάρων στη βάση της κρύπττης οργανώνει τη διαδικασία δημιουργίας των νέων κυττάρων [352,369]. Η ομοιοστασία του επιθηλίου του γαστρεντερικού σωλήνα εξαρτάται από αρκετά μοριακά μονοπάτια, όπως του WNT, Notch, Hedgehog. Ο πολλαπλασιασμός ιδίως των επιθηλιακών κυττάρων επηρεάζεται κυρίως από το WNT [370]. Η υπερενεργοποίηση του WNT έχει παρόμοια αποτελέσματα με την έλλειψη λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου APC, που οδηγεί σε αδενωματώδη μετατροπή του φυσιολογικού επιθηλίου, κάτι που έχει αυξημένη πιθανότητα καρκινικής μετατροπής [371].

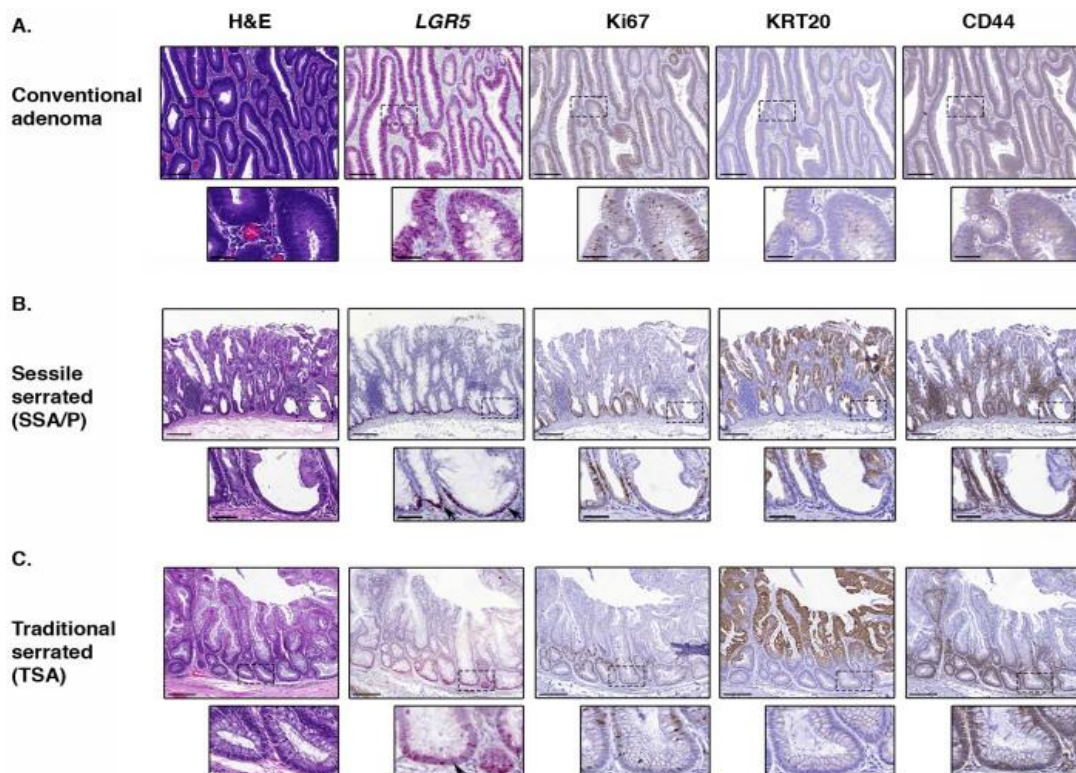
Έχει βρεθεί ένα γονιδιακό πρόγραμμα αποτελούμενο από περίπου 80 γονίδια τα οποία με ποικίλους τρόπους αλληλεπιδρούν ή εξαρτώνται από το μοριακό μονοπάτι WNT σε περιπτώσεις ορθοκολικής νεοπλασίας με μετάλλαξη του APC. Ενώ τα περισσότερα γονίδια που εμφάνιζαν αυξημένη έκφραση αφορούσαν την περιοχή πολλαπλασιασμού της κρύπττης, εντούτοις, τα γονίδια άμεσοι στόχοι του WNT εκφράζονταν σχεδόν αποκλειστικά στη βάση της κρύπττης, όπου εδρεύουν τα αρχέγονα κύτταρα [372]. Μάλιστα ο δείκτης LGR5 εκφραζόταν σε μια ιδιαίτερη ομάδα κυττάρων, τα CBC (crypt base columnar cells), που πρώτο αναγνωρίστηκαν το 1974, ως ανώριμα κύτταρα και σαν ένα εναλλακτικό πληθυσμό αρχέγονων κυττάρων [373]. Ο LGR5 πλέον έχει ανιχνευθεί και σε κύτταρα άλλων οργάνων, όπως στο δέρμα, στο στη γλώσσα, στο ήπαρ, στο ενδομήτριο και αλλού.

Η επικύρωση του LGR5 ως δείκτη επιφανείας των αρχέγονων κυττάρων του εντέρου απαιτούσε μελέτες σε ζωντανούς ιστούς, κάτι που έγινε σε έρευνες σε ποντίκια, όπου μελετήθηκε η διαδικασία της αυτοανανέωσης των κυττάρων και του τρόπου πολλαπλασιασμού τους [374]. Σε άλλη μελέτη, χορηγήθηκε ένα γονίδιο αναφοράς σε κύτταρα LGR5+ και αρχικά ανιχνεύθηκε η έκφραση του στη βάση της κρύπττης, ενώ αργότερα ακόμα και στο διάμεσο των λαχνών ιστό. Αυτό υποδηλώνει ότι τα κύτταρα που εκφράζουν τον δείκτη LGR5 είναι πολυδύναμα κύτταρα με δυνατότητα αυτοανανέωσης του πληθυσμού τους [375]. Πρόσφατα βρέθηκε ότι μαστικοί αδένες μπορούν να ανακατασκευασθούν από κύτταρα LGR5+ [376]. Ιστοί με μικρή δυνατότητα

αναγέννησης των κυττάρων τους, όπως το ήπαρ, απαντούν σε οξεία βλάβη με ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού WNT, που οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του LGR5, με αποτέλεσμα την αναπαραγωγή των κυττάρων [377,378].

43.Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ LGR5 ΣΕ ΑΔΕΝΩΜΑΤΑ

Μελέτες σε καλοήθεις νεοπλασίες που αφαιρέθηκαν από παχύ έντερο ασθενών βρέθηκε έκφραση του LGR5 σε διάφορες περιοχές της βλάβης, ακολουθώντας το πρότυπο που έχει αναφερθεί παραπάνω [379]. Μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις η έκφραση του LGR5 συνοδευόταν με μη έκφραση του δείκτη διαφοροποίησης –κερατίνη 20-, κάτι που υποδηλώνει ότι τα κύτταρα βρίσκονταν σε κατάσταση μη διαφοροποίησης, ενώ και ο δείκτης CD44 ανευρέθηκε σε μέτρια επίπεδα.



Αρχιτεκτονική αρχέγονων κυττάρων σε ανθρώπινα αδενώματα. Χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης, in situ υβριδισμός (LGR5), ανοσοιστοχημικές μέθοδοι (Ki67, Krt20, CD44). Απεικονίζεται η έλλειψη της κανονικής αρχιτεκτονικής των αρχέγονων κυττάρων σε ένα συμβατικό αδένωμα, η διατήρηση ενός σχεδόν φυσιολογικού μικροπεριβάλλοντος σε άμισχο οδοντωτό αδένωμα και ένα παραδοσιακό οδοντωτό αδένωμα. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τη θετικότητα για τον LGR5 στη βάση της κρύπτης [380].

Εντύπωση προκαλεί η διαφοροποίηση της έκφρασης του δείκτη κατά μήκος του αδενώματος, αλλά και η διαταραχή της κανονικής αρχιτεκτονικής των κρυπτών. Μάλιστα σε ορισμένα αρχιτεκτονικά πρότυπα αναγνωρίστηκε ο δείκτης σε όλο το μήκος, συμπεραίνοντας ότι αυτές οι δομές ευνοούσαν αρκετά την έκφρασή του. Αυτό αποδόθηκε εν μέρει στην διαταραχή της λειτουργίας του μικροπεριβάλλοντος. Σε αυτά τα αδενώματα πρόκειται ίσως για ένα πρώιμο στάδιο όπου έχει διαταραχθεί η αρχιτεκτονική των αρχέγονων κυττάρων, μέχρις ότου όλα τα κύτταρα εκφράζουν τον LGR5. Επίσης σε περιοχές με υψηλό βαθμό δυσπλασίας τα επίπεδα του LGR5 ήταν σαφώς μεγαλύτερα, από ότι σε περιοχές με χαμηλότερου βαθμό δυσπλασίας [381,382].

Τα οδοντωτά άμισχα αδενώματα οδηγούν σε καρκίνωμα σε ποσοστό 10-20% ακολουθώντας διαφορετική πορεία από ότι τα κλασσικά αδενώματα και έχουν ένα ιδιαίτερο γενετικό προφίλ. Υποστηρίζεται ότι η αναγνώρισή τους μπορεί να γίνει μέσω της έκφρασης συγκεκριμένων δεικτών επιφανείας [383]. Αρκετές μελέτες δίνουν έμφαση στο μικροπεριβάλλον αυτών των πολυπόδων, πιστεύοντας ότι υπάρχουν αξιολογές μεταβολές που επηρεάζουν σημαντικά την καρκινογένεση.

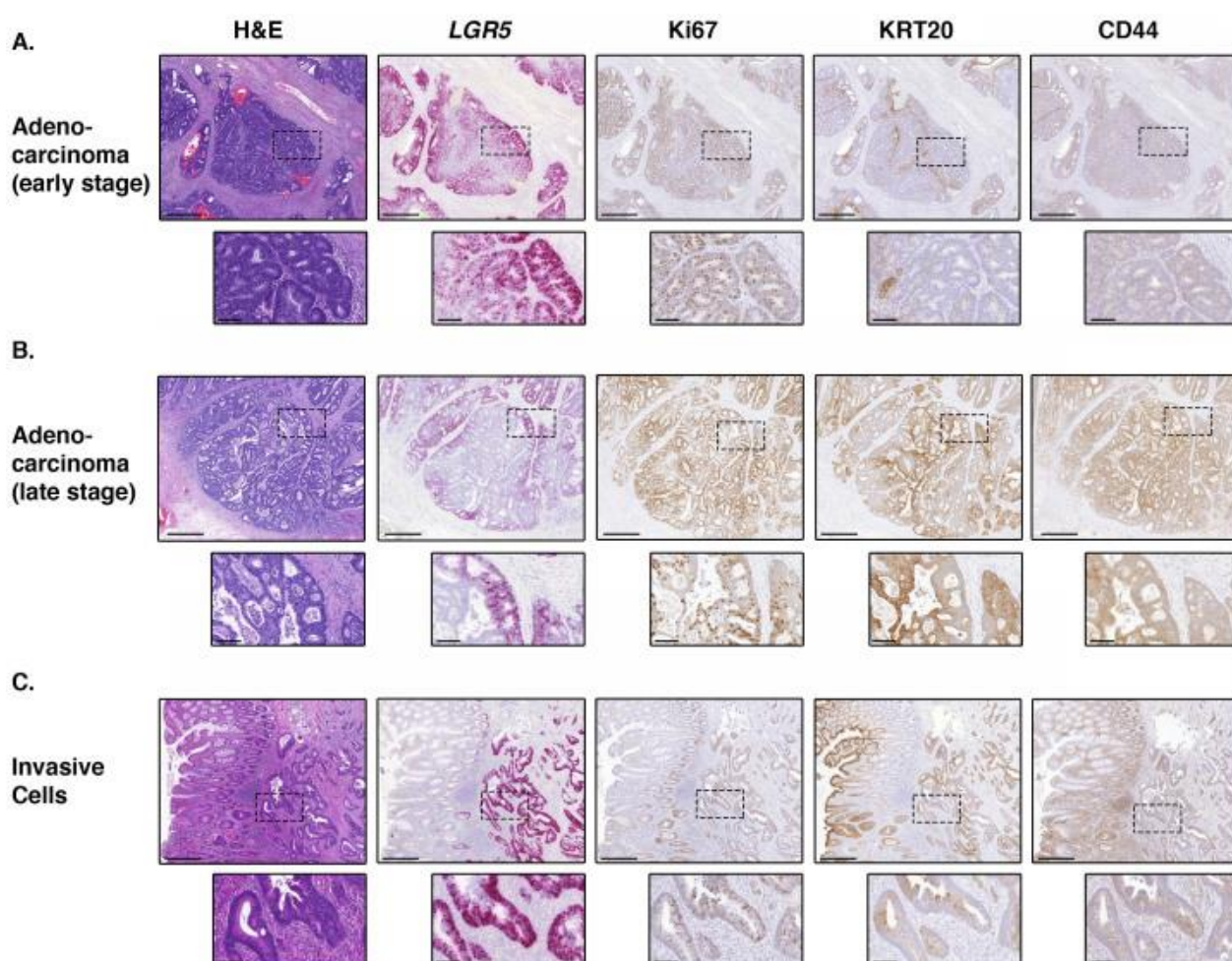
Η έκφραση του LGR5 στα αδενώματα αυτά ήταν σαφώς υψηλή, όμως σε αντίθεση με τα υπόλοιπα αδενώματα, εντοπιζόταν κυρίως στη βάση της κρύπτης. Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει και σε μελέτες για το δείκτη CD133, και τον CD44. Τα κύτταρα είχαν επίσης μεγαλύτερη έκφραση Ki67 από ότι οι φυσιολογικές κρύπτες [384].

Από την άλλη μεριά, τα παραδοσιακά οδοντωτά αδενώματα διατηρούσαν ένα παρόμοιο πρότυπο αρχιτεκτονικής των αρχέγονων κυττάρων, με επίσης όμως υψηλή έκφραση του LGR5 στη βάση της κρύπτης.

Συνεπώς, ο LGR5 φαίνεται να εκφράζεται με παρόμοιο τρόπο στα αδενώματα και αυτό που αλλάζει είναι η αρχιτεκτονική δομή των βλαστικών κυττάρων.

44. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ LGR5 ΣΤΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Έχουμε αναφέρει σε προηγούμενες παραγράφους ότι τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα στη βάση της κρύπτης εκφράζουν το δείκτη LGR5. Αναφέρεται σε μελέτη πρόσφατη, ότι η έκφραση του δείκτη δεν τροποποιείται στα διάφορα στάδια TNM του όγκου, αν και η ίδια η μελέτη θέτει μια αμφιβολία στο αποτέλεσμα, όσον αφορά στον μικρό αριθμό δειγμάτων που μελετήθηκαν [363].



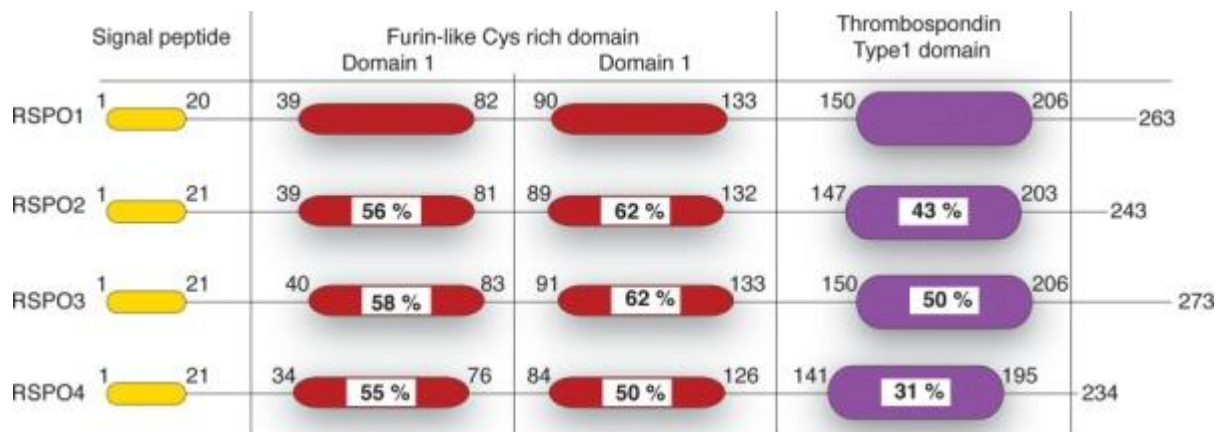
Η έκφραση του LGR5 στα διάφορα στάδια αδενοκαρκινώματος. Η έκφραση του LGR5 στο στάδιο της διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων είναι αρκετά υψηλή [385].

Σε αυτήν την εικόνα βλέπουμε πως τα επίπεδα του LGR5 είναι ανάλογα με το στάδιο του όγκου και ιδίως στη φάση της διείσδυσης και της μετάστασης, αρκετά αυξημένα. Δηλαδή σε κυτταρικούς πληθυσμούς στη θέση της διείσδυσης εκφράζεται περισσότερο, κάτι που αναπαριστά και τον αντίστοιχο πληθυσμό των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων στο σημείο αυτό. Η κερατίνη 20, σαν δείκτης διαφοροποίησης βρίσκεται μειωμένος, ενώ ο CD44 αυξημένος. Αυτό είναι αναμενόμενο, λόγω του γεγονότος πως το αδενοκαρκίνωμα σε αυτήν την χρονική στιγμή είναι σε στάδιο χαμηλής διαφοροποίησης [363].

Σε όλες αυτές τις μελέτες είναι πιθανόν τα αποτελέσματα να διαφέρουν, αφού επηρεάζονται αρχικά από τον αριθμό των υπό μελέτη δειγμάτων, αλλά και από τον τρόπο επεξεργασίας των παρασκευασμάτων. Πρόσθετες έρευνες, έχουν πραγματοποιηθεί και πολλές ακόμα απαιτούνται για να επιβεβαιωθούν τα ευρήματα ή και να προταθούν άλλα συμπεράσματα.

45.Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΩΝ R-SPONDINS ΣΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ LGR5

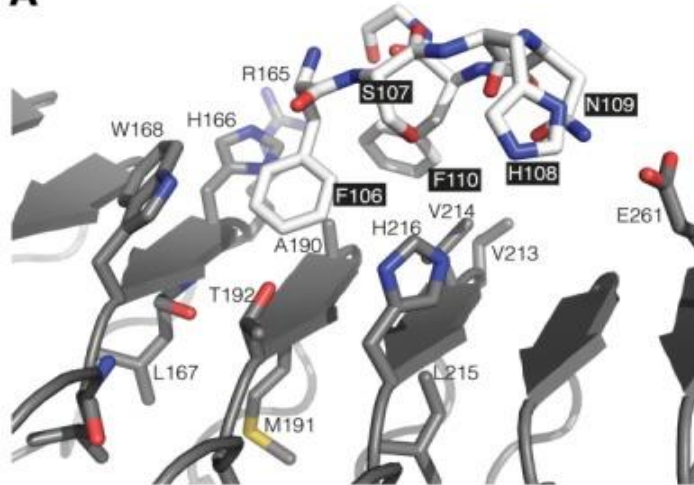
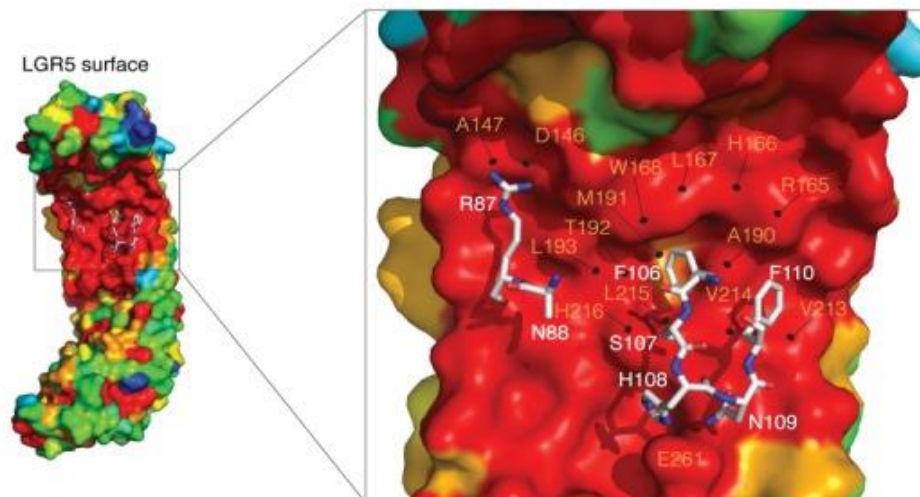
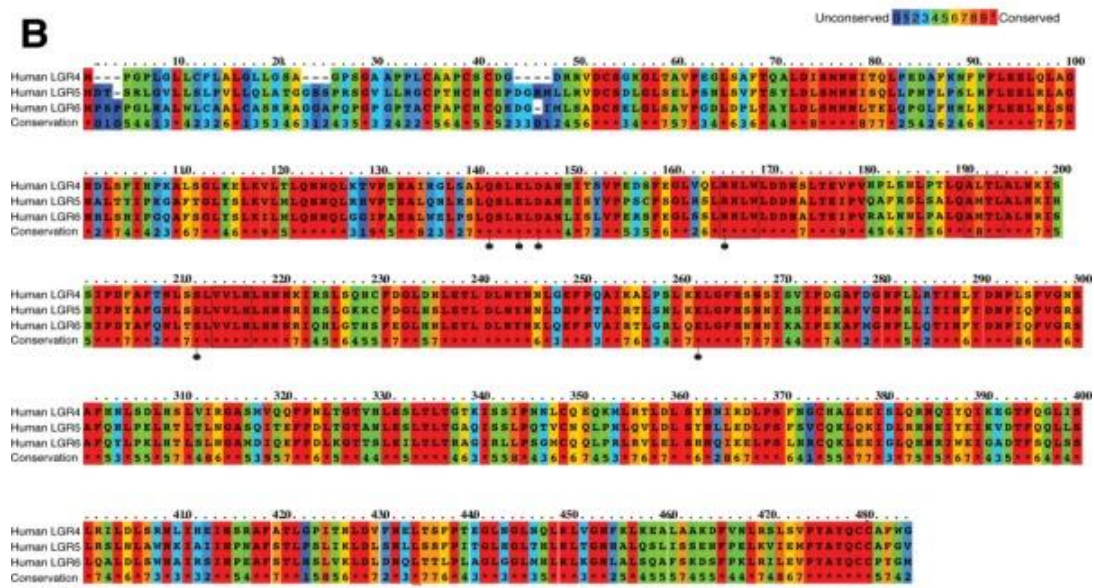
Το 2011 ανακαλύφθηκαν οι πρωτείνες R-spondins (RSPO), οι οποίες συνδέονται στον υποδοχέα LGR5 [386,387]. Οι πρωτείνες αυτές σε *in vivo* μελέτες είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη και το σχηματισμό της κρύπτης, ενώ έχουν και μιτογόνο δράση στα κύτταρα που είναι LGR5+ [388,389]. Οι RSPOs είναι εκκριτικές πρωτείνες βάρους περίπου 35kD, διακρίνονται σε 4 διαφορετικές πρωτείνες, που όμως έχουν μια ομοιότητα στην αλληλουχία αμινοξέων τους της τάξης του 40-60%. Στον άνθρωπο ποικίλλουν σε μήκος από 234-272 αμινοξέα. Έχουν ένα υδροφοβικό N-αμινοτελικό άκρο, μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη που ονομάζεται FU τμήμα (furin like domain), μια περιοχή θρομβοσποντίνης τύπου I, που συνδέει γλυκοζαμινογλυκάνες ή/και πρωτεογλυκάνες, και ένα C-αμινοτελικό άκρο, το μήκος του οποίου ποικίλλει [387,390-392].



Σχηματική αναπαράσταση των RSPOs, που περιλαμβάνει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία FU τμημάτων, την περιοχή θρομβοσποντίνης τύπου I και το C-τελικό άκρο του οποίου το μήκος ποικίλλει. Οι αριθμοί δείχνουν τον αριθμό των αμινοξέων, ενώ τα ποσοστά φανερώνουν το βαθμό ομοιότητας των υπολοίπων RSPO με την RSPO1 [393].

46.Η ΕΠΑΦΗ ΤΩΝ RSPOs ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ LGR5

Τα τμήματα FU1 και FU2 της RSPO1 συνδέονται στον LGR5, ενώ γενικά η RSPO1 συνδέεται και στους υποδοχείς LGR4 και LGR6 με παρόμοιο τρόπο. Οι περιοχές R87, F106, F110 είναι ίδιες σε όλες τις πρωτεΐνες στην επιφάνειά τους και αποτελούν τα βασικά σημεία πρόσδεσης στον υποδοχέα. Μελέτες έχουν δείξει ότι διαταραχή σε αυτά τα τμήματα τροποποιούν τη σύνδεση της RSPO1 στον LGR4, με αποτέλεσμα διαταραχή στον φυσιολογικό τρόπο ενεργοποίησης του μοριακού μονοπατιού WNT [394].

A**B**

A: οι περιοχές R165 έως W168 συνδέονται με τα τμήματα F106 έως F110 της RSPO1. B: οι υποδοχείς LGR4-6. Οι μαύρες παύλες δηλώνουν τα σημεία σύνδεσης της RSPO1, ενώ από κάτω βλέπουμε με λευκό χρώμα τα σημεία αυτά πρόσδεσης [395].

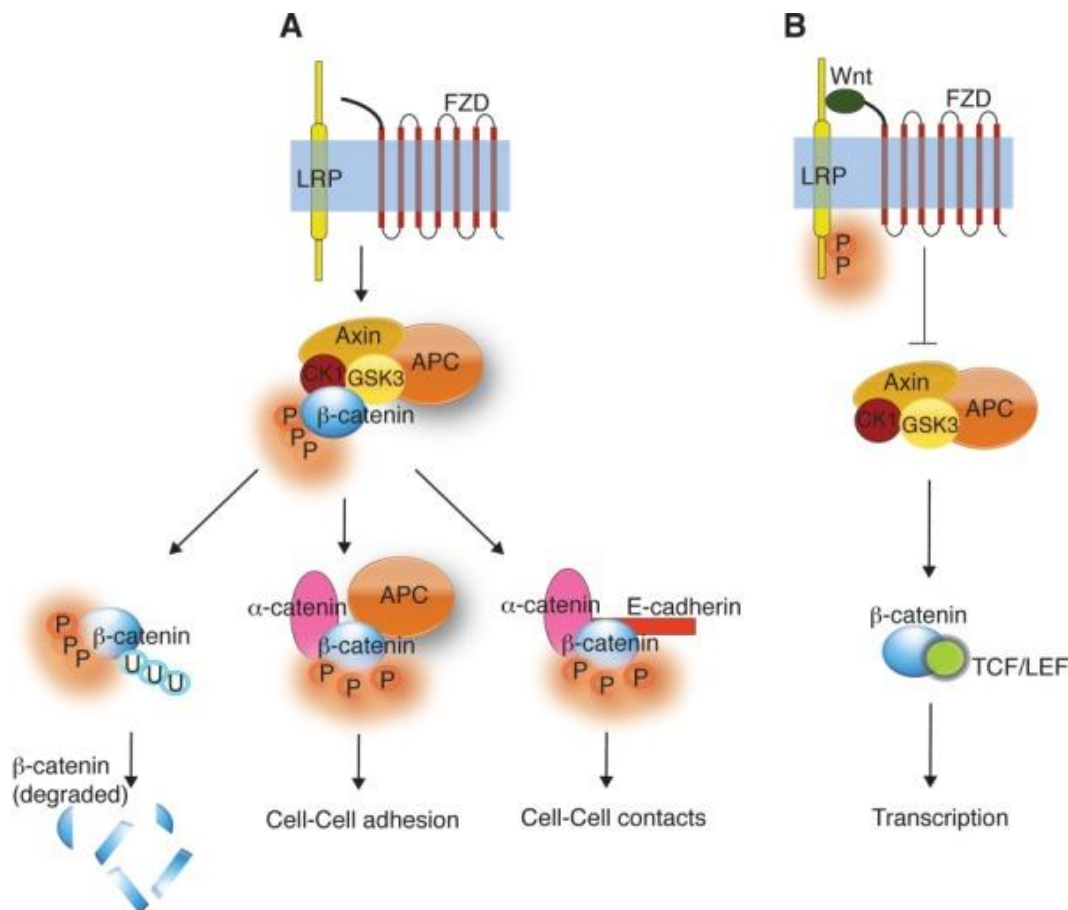
Το 2013 αναγνωρίστηκε το τριμερές σύμπλοκο LGR5, με τα τμήματα FU1:FU2 της RSPO1 και την πρωτεΐνη RNF43 (λιγκάση με δράση ουμπικουιλίνης) [396]. Βασικά η RNF43 δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τον υποδοχέα, αλλά αλληλεπιδρά με την FU2 περιοχή, καθώς ο LGR5 με την FU1. Μάλιστα η ικανότητα σύνδεσης της RNF43 για το σύμπλοκο LGR5/RSPO1 είναι 10 φορές μεγαλύτερη από ότι για την ελεύθερη RSPO1 [396].

Η RSPO όταν συνδέεται στον υποδοχέα LGR5 δεν προκαλεί ιδιαίτερες αλλαγές, ενώ στον LGR4 επηρεάζει την ολιγομεροποίησή του. Σε αυτή τη βάση χρειάζεται να επιβεβαιωθεί ότι αυτό το αποτέλεσμα δεν αφορά τον LGR5, αν ισχύει βέβαια και να μελετηθεί πως η διαταραχή στην ολιγομεροποίηση του υποδοχέα, αλλάζει την μεταβίβαση σημάτων με τελικό αποδέκτη το μονοπάτι WNT [397-399]. Η αντικατάσταση του διαμεμβρανικού τμήματος του υποδοχέα με ένα διαφορετικό πεπτιδίο οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του WNT σε αρχικό επίπεδο, κάτι που υποδηλώνει ότι οι RSPO δεν μπορούν από μόνες τους συνδεόμενες στον LGR5 να επηρεάσουν το μονοπάτι WNT [400]. Για να γίνουν κατανοητές οι δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στον υποδοχέα, ερευνήθηκαν υποδοχείς που δρουν παρόμοια με τους LGR και συγκεκριμένα ο β2 αδρενεργικός υποδοχέας και ο υποδοχέας A2 αδενোসίνης [345,346,401].

Το 2013 έλαβαν μέρος μελέτες που έδειξαν πως ο LGR5 ενεργοποιεί το μονοπάτι Gα-Rho GTPase, με τρόπο που όμως είναι ανεξάρτητος της πρόσδεσης RSPO. Σε αυτές όμως τις περιπτώσεις η αυτοκρινή έκκριση RSPO δεν ελήφθη υπόψη. Παρόλα αυτά άνοιξε το δρόμο για νέες μελέτες προκειμένου να καθοριστεί ο παράγοντας που ουσιαστικά καθιστά τον υποδοχέα, μεταδότη σήματος για τη λειτουργία του μονοπατιού WNT [402].

Τα τελευταία χρόνια μελετώνται λιγκάσες για άλλους πέραν του LGR5 υποδοχείς σε άλλα όργανα του σώματος, που ενεργούν μέσω G πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, ένας αγωνιστής (TRV120027) του υποδοχέα τύπου I της αγγειοτενσίνης II, που προκαλεί μείωση του καρδιακού όγκου παλμού και αύξηση της αρτηριακής πίεσης [403]. Με παρόμοιες μεθόδους αναμένουμε αγωνιστές του LGR5 που θα δώσουν απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα.

47.Η ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ LGR5, RSPO ΚΑΙ WNT ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ



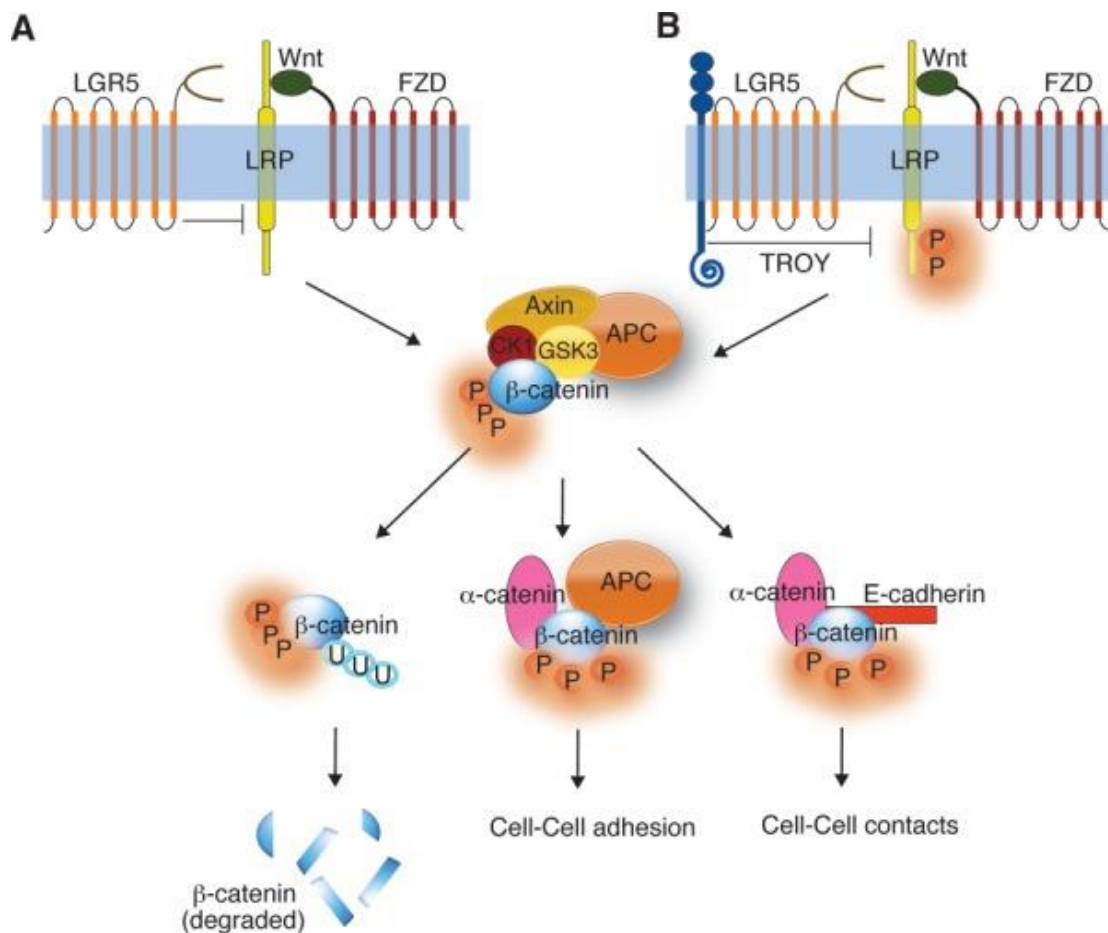
Το μοριακό μονοπάτι WNT . A: Σε μη ενεργοποίηση του, ένα ειδικό σύμπλοκο φωσφορυλιώνει τη β-κατενίνη. Η φωσφορυλιωμένη β-κατενίνη επηρεάζει τη σύνδεση μεταξύ των κυττάρων. B: Όταν το μονοπάτι είναι ενεργοποιημένο, σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τα FZD, LRP που αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, η οποία μετατοπίζεται στον πυρήνα και επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση [404].

Ο τρόπος λειτουργίας του μοριακού μονοπατιού αρχικά μελετήθηκε στη *Drosophila* και αργότερα σε ζωικούς οργανισμούς. Το σύμπλοκο που φωσφορυλιώνει τη β-κατενίνη σε απουσία του WNT αποτελείται από αξίνη, APC, συνθετική κινάση γλυκογόνου-3 και κινάση-1α κασεινης. Αυτό φωσφορυλιώνει και οδηγεί τη β-κατενίνη σε ουμπικουιτίνωση, με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή της στο πρωτεόσωμα [405]. Μάλιστα το πιο σημαντικό στοιχείο του συμπλόκου θεωρείται η αξίνη [406]. Παρόλα αυτά δεν

προκύπτει το ίδιο αποτέλεσμα σε όλες τις περιπτώσεις φωσφορυλίωσης της β-κατενίνης και διάφορα σύμπλοκα σε περιοχές του κυττάρου έχουν διαφορετική λειτουργία, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με τη φωσφορυλιωμένη β-κατενίνη που συμμετέχει στην αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων στο κεντρόσωμα και στις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων [406-408].

Το WNT ξεκινά τη δράση του συνδεόμενο σε ένα σύμπλοκο που αποτελείται από την πρωτεΐνη Frizzled (FZD) και τον υποδοχέα λιποπρωτεΐνης 5/6 (LRP5/6). Αυτό το σύμπλοκο τότε αναστέλλει την αποικοδόμηση της β-κατενίνης. Η οικογένεια υποδοχέων FZD περιλαμβάνει 10 μέλη που ανήκουν στην υπεροικογένεια GPCR [409]. Οι υποδοχείς 5/6 είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπου το εξωκυττάριο τμήμα τους περιέχει επαναλήψεις του παράγοντα EGF [405]. Η διαδικασία αυτή τελικώς επηρεάζει τη κυτταρική σύνδεση, αλλά και τη γονιδιακή μεταγραφή [410].

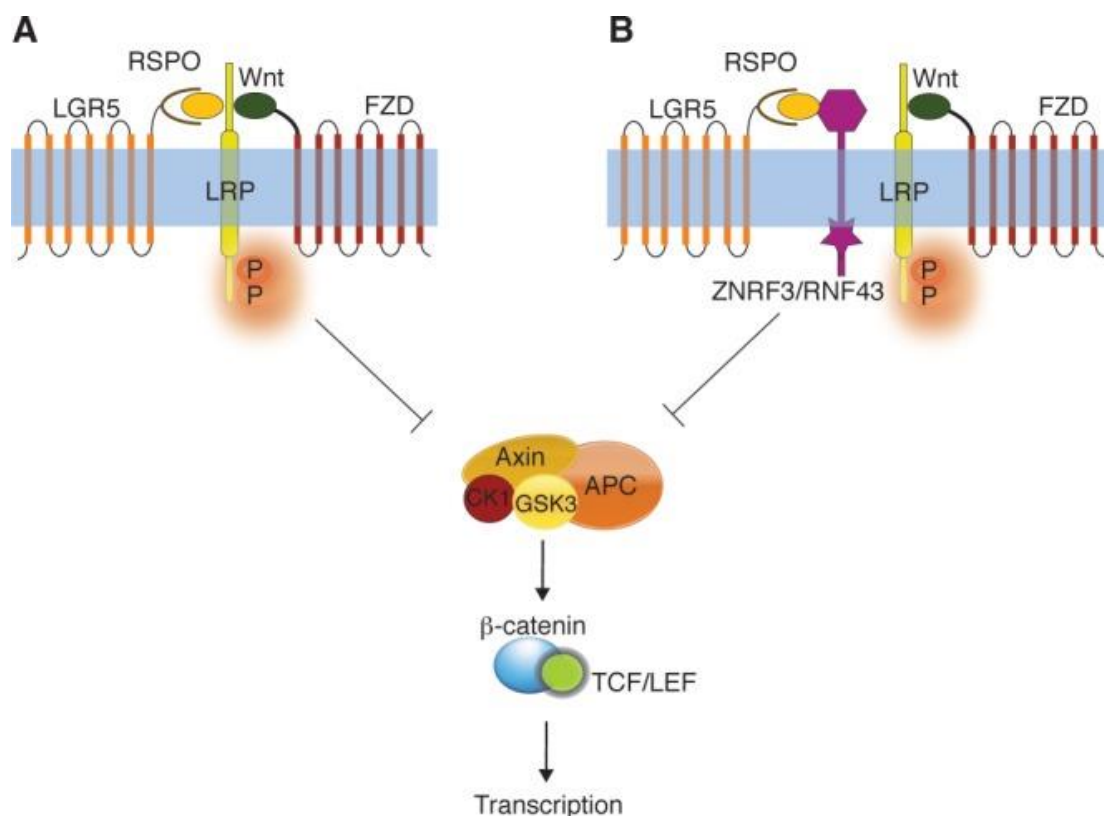
Υπερέκφραση του LGR5 ανταγωνίζεται τη δράση του WNT, μειώνοντας την επαφή του WNT/FZD με τους LRP5/6. Εν συνεχεία αυτό θα οδηγήσει στη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης.



Αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του LGR5. A: Απομονώνοντας τους LRP5/6, οδηγεί σε φωσφορυλίωση της β-κατενίνης. B: Ενεργοποιώντας τον παράγοντα TROY αναστέλλει τους LRP5/6, με ίδιο πάλι αποτέλεσμα. Και στις δύο περιπτώσεις ενισχύεται η διακυτταρική σύνδεση και επαφή [411].

Ο LGR5 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα καταστολής όγκου TROY (tumor necrosis factor receptor), ο οποίος υποδοχέας συνδέεται με το σύμπλεγμα WNT/FZD και μαζί με τον LGR5 αποσταθεροποιεί το σύμπλοκο WNT/FZD/LRP5/6, όπου τελικώς μειώνονται τα αποτελέσματα του μοριακού μονοπατιού [412].

Παρουσία των RSPO η λειτουργία του LGR5 στο WNT φαίνεται να καταργείται, αφού το σύμπλεγμα RSPO/LGR5 ενισχύει τα αποτελέσματα του WNT, με μηχανισμό που δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός [386]. Αρχικά πιστεύεται πως απευθείας αλληλεπίδραση του RSPO/LGR5 με το σύμπλοκο WNT/FZD/LRP5/6 ευθύνεται γι' αυτό. Αυτό έχει σαν συνέπεια το σχηματισμό μιας αλληλουχίας LGR5/RSPO/WNT/FZD/LRP5/6 στην κυτταρική επιφάνεια. Η φωσφορυλίωση σε μια θέση σερίνης του LRP είναι ένα πρώιμο γεγονός κατά την ενεργοποίηση του WNT, που ενισχύει την ενδοκύττωση των υποδοχέων LGR5/LRP/FZD και λιγκασών RSPO/WNT [413].



Επίδραση του συμπλέγματος RSPO/LGR5 στη σηματοδότηση του WNT. A: Αλληλεπίδραση LGR5/RSPO με FZD, LRP, WNT, για να οδηγήσει σε αναστολή της φωσφορυλίωσης της β-κατενίνης, με συνέπειες στη γονιδιακή έκφραση. B: Το LGR5/RSPO σύμπλεγμα με τον αρνητικό του WNT ρυθμιστή, ZNRF3/RNF43, που ενισχύει το WNT [414].

Υπάρχουν διαφορούμενες απόψεις στο κατά πόσο η ενδοκύττωση των LGR5 και LRP6 επηρεάζει τη σηματοδότηση WNT, με άλλους να πιστεύουν πως ισχύει η επιρροή και άλλους να θεωρούν πως δεν σχετίζεται [390,413]. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι το σύμπλοκο LGR5/RSPO ενισχύει τη δραστηριότητα του WNT μέσω αλληλεπίδρασης με επιφανειακές διαμεμβρανικές λιγκάσες με δράση ουμπικουιλίνης, όπως οι zinc, ZNRF3 (ring finger 3), και RNF43 (ring finger 43) [415]. Αυτές οι λιγκάσες οδηγούν σε ουμπικουιλίνωση των FZD και LRP6 στην κυτταρική επιφάνεια [415,416]. Όσον αφορά τους LRP5/6, αλληλεπίδραση του LGR5/RSPO με τις ZNRF3/RNF43, έχει σαν αποτέλεσμα τη μετακίνησή τους από την πλασματική μεμβράνη και αύξηση των επιπέδων των FZD και LRP5/6 ενισχύοντας το μονοπάτι WNT [415].

48.ΣΥΓΚΡΙΣΗ LGR5 ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ LGRs

Ο LGR5 εμφανίζει ομοιότητα με τους LGR4,5 κατά περίπου 50% και μόλις 33% με άλλους γλυκοπρωτεϊνικούς ορμονικούς υποδοχείς. Οι LGR4,5 έχουν 17 LRR σε αντίθεση με 13 για τον LGR6, και 9 για τους υπόλοιπους [349].

Κάθε FU τμήμα της RSPO1 δημιουργεί μια θηλιά που κρατιέται σταθερή μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Όταν έρχεται σε επαφή με τον LGR5 υφίσταται μια σειρά δομικών αλλαγών που της επιτρέπουν τη σύνδεση [417].

49.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ LGR5

Η αναγνώριση του LGR5 σαν δείκτη αρχέγονων κυττάρων αποτελεί πλέον ένα αξιόπιστο στοιχείο. Αυτό που μένει ακόμα μη κατανοητό είναι η τοποθέτησή του στην κρύπτη σε πολύποδες. Αρχικά πιστευόταν πως η αρχιτεκτονική των κυττάρων της κρύπτης δεν εμφάνιζε μεγάλες διαφορές μεταξύ αδενωματοδών πολύποδων και φυσιολογικού εντέρου. Όμως ήρθαν στο φως αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν το αντίθετο, ότι δηλαδή η δομή των κυττάρων μεταβάλλεται.

Βρέθηκε ότι σε οδοντωτούς πολύποδες που ανευρίσκεται αυξημένο mRNA του LGR5, υπήρχε και αύξηση της έκφρασης του Kι67 και κερατίνης-20. Η έκφραση του LGR5 στη βάση της κρύπτης δεν εμφάνιζε διακυμάνσεις, κάτι που υποδήλωνε ένα υπάρχον και λειτουργικό μικροπεριβάλλον. Σε περιπτώσεις που βρέθηκαν έκτοπες κρύπτες, πάλι ο LGR5 αφορούσε κυρίως τη βάση της κρύπτης, που σημαίνει πως και εκεί δημιουργούταν με κάποιο τρόπο ένα τοπικό μικροπεριβάλλον.

Ο LGR5, λοιπόν, επηρεάζει θετικά τη διείσδυση και την ικανότητα μετάστασης του όγκου, μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τις MMP2 [418]. Σε όγκους δηλαδή πλούσιους σε LGR5+ αρχέγονα καρκινικά κύτταρα, ανιχνεύεται συχνά μεγάλος αριθμός κυττάρων στη φάση της διείσδυσης.

Ο LGR5 επηρεάζει αρνητικά το μοριακό μονοπάτι WNT, με σημαντικό ρόλο, να διαδραματίζουν οι RSPO πρωτεΐνες, αν και φαίνεται ότι συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες. Το τελικό αποτέλεσμα αφορά τη συνεκτικότητα και την ανταλλαγή μηνυμάτων μεταξύ των κυττάρων.

50.ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ HEDGEHOG

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ HEDGEHOG

Το μοριακό μονοπάτι Hedgehog (Hh) είναι πολύ σημαντικό κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Αργότερα στη ζωή μπορεί να ευνοήσει τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Τα περισσότερα βασικοκυτταρικά καρκινώματα χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις που οδηγούν σε αυτόνομη ενεργοποίηση του μονοπατιού [419]. Από την άλλη μεριά σε συμπαγείς όγκους, σε λίγες μόνο περιπτώσεις έως τώρα έχουν ανευρεθεί μεταλλάξεις σε αντίστοιχα γονίδια [420]. Συγκεκριμένα σε καρκίνο παχέος εντέρου προτείνονται 2 τρόποι επιρροής του μονοπατιού, είτε με έναν παρακρινή ρόλο, όπου δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον ευνοϊκό για την καρκινογένεση, είτε με αυτοκρινή ενεργοποίησή του, προωθώντας τη μετάσταση [421].

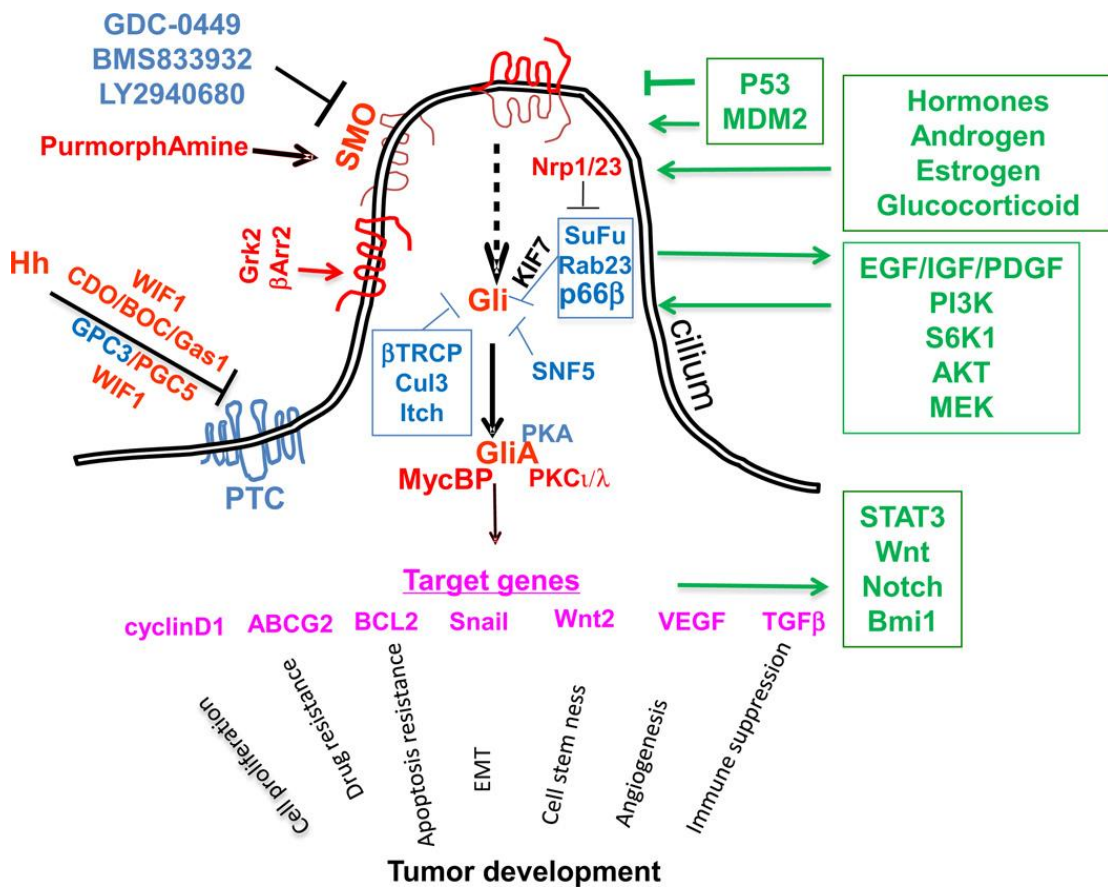
Διαφοροποιημένα εντεροκύτταρα εκκρίνουν τη λιγκάση Indian Hedgehog (Ihh), η οποία συνδέεται στον ανασταλτικό υποδοχέα Patched 1 (Ptch1), που οδηγεί σε μείωση της δράσης του υποδοχέα Smoothed (Smo), με αποτέλεσμα την εκκίνηση μιας σηματοδοτικής αλληλουχίας που ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες Glioma-associated oncogene (Gli). Η έκφραση αυτών των πρωτεϊνών αποτελεί τον πιο αξιόπιστο δείκτη ενεργότητας του μοριακού μονοπατιού [422].

Ανταγωνιστές των Smo πρόσφατα έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων [423]. Σε έως τώρα δοκιμές που αφορούσαν ασθενείς με καρκίνο παγκρέατος και παχέος εντέρου, τα αποτελέσματα ήταν κατώτερα του αναμενόμενου [424,425]. Η απάντηση του στρώματος στην ενεργοποίηση του μονοπατιού, είναι συνέπεια και μιας παρακρινής δραστηριότητας του μονοπατιού που επηρεάζει τη διαφοροποίηση του εντερικού επιθηλίου. Μείωση του μονοπατιού οδηγεί σε ελάττωση της διαφοροποίησης των εντεροκυττάρων, όπως συμβαίνει και με την ενεργοποίηση του WNT [426-428].

Στα θηλαστικά η σηματοδότηση Hh περιλαμβάνει 3 λιγκάσες (Sonic hedgehog, Indian Hedgehog, Desert Hedgehog), 2 υποδοχείς (PTCH1,2) και 3 μεταγραφικούς παράγοντες (Gli1,2,3). Σε απουσία των λιγκασών, ο Smo αναστέλλεται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Όταν, λοιπόν το μονοπάτι ενεργοποιηθεί, αντιστοίχως ενεργοποιούνται οι παράγοντες Gli [429].

Την τελευταία 5ετία έχουν δημοσιευθεί και οι περισσότερες μελέτες που αφορούν το μονοπάτι Hh. Αυτό οφείλεται σε 5 στοιχεία:

- καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού σηματοδότησης
- Πιο αξιόπιστες μελέτες σε ποντίκια
- καλύτερη κατανόηση της ενεργότητας του σε περιπτώσεις διαγνωσμένου καρκίνου
- αυξημένος αριθμός περιπτώσεων όπου στη θεραπεία χρησιμοποιείται ανασταλτής του Hh
- σε χημειοανθεκτικούς όγκους, συνδράμει η υπερενεργοποίηση του Hh



Διάγραμμα του μονοπατιού Hh στα θηλαστικά. Οι Smo αποτελούν το κλειδί στη μεταγωγή σήματος. Σε απουσία των λιγκασών, ο υποδοχέας PTC τοποθετείται σε ειδικές προεκβολές του ευκαρυωτικού κυττάρου, όπου αναστέλλει τις SMO. Συνυποδοχείς του Hh είναι οι CDO (cell adhesion molecule), Gas1, Glypican 3 και 5. Ο ανασταλτικός του WNT παράγοντας (WINF1) ρυθμίζει επίσης τη σηματοδότηση Hh μέσω των συνυποδοχέων. Οι πρωτεΐνες Gli, μέσω άλλων παραγόντων (Su/Fu/KIF7) λαμβάνουν μια μορφή

που οδηγεί σε καταστολή του μονοπατιού. Υπάρχουν αρκετοί αρνητικοί ρυθμιστές των Gli, όπως (Rab23, πρωτεϊνική κινάση A, ογκοκατασταλτικός παράγοντας SNF5, Culin3, p66β, Itchy E3 λιγκάση ουμπικουιτίνης). Παρουσία Hh οι PTC δεν μπορούν να αναστείλουν τις SMO. Η αρχική τοποθέτηση των SMO απαιτεί β-αρρεστίνη 2 και έναν υποδοχέα με δράση κινάσης μέσω G πρωτεΐνης. Μόλις οι Gli λάβουν την ενεργό τους μορφή, θα ενεργοποιήσουν συγκεκριμένα γονίδια-στόχους. Οι KIF, SuFu παράγοντες μπορούν να καταστείλουν αυτήν την αλληλουχία. Με κόκκινο χρώμα είναι οι θετικοί και με μπλε οι αρνητικοί ρυθμιστές. Τα μονοπάτια που αλληλεπιδρούν με το Hh είναι με πράσινο. Η έλλειψη των βλεφαρίδων (που τοποθετούνται οι SMO στα κύτταρα) στα ποντίκια τα προστατεύει από την ανάπτυξη βασικοκυτταρικού καρκίνου, ενώ σε πολλές περιπτώσεις απουσιάζουν και από καρκινικά κύτταρα ανθρώπου [430].

51.Η ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ HEDGEHOG

Όλες οι πρωτεΐνες Hh εκκρίνονται και δρουν είτε τοπικά είτε σε απομακρυσμένες περιοχές, ενώ για να λάβουν την ενεργό τους μορφή χάνουν τμήμα από το N-τελικό άκρο και συνδέουν μόριο χοληστερόλης στο C-άκρο. Η σχέση του Hh με λιποπρωτεΐνες αυξάνει τη δραστηριότητα του μονοπατιού [431]. Κατά τη μεταγωγή του σήματος αρκετές πρωτεΐνες λαμβάνουν μέρος, όπως οι MMP, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Disp και οι πρωτεογλυκάνες Dally [432-434].

Οι PTC δεσμεύουν τις Hh λιγκάσες και με αυτόν τον τρόπο αναστέλλονται οι SMO. Άλλοι υποδοχείς που δρουν συνεργικά είναι τα προϊόντα των γονιδίων CDO, GAS1, GPC3. Δεν είναι πλήρως κατανοητό πως η σύνδεση Hh στον PTC οδηγεί σε μείωση των SMO, αν και πιστεύεται ότι συμμετέχουν αρκετοί παράγοντες όπως λιποπρωτεΐνες, PI4K και η προβιταμίνη D3 [435-437].

Τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν τις SMO μέσω επιρροής στη θέση που τοποθετούνται [438]. Τα βασικά γεγονότα που συμβαίνουν στις SMO είναι αρχικά η αλλαγή στο σχήμα μέσω πιθανόν ουμπικουιτίνωσης, που αναστέλλεται από την πρωτεΐνη USP8 (υδρολάση ουμπικουιτίνης) και μετά η αλλαγή της θέσης στο κύτταρο [439-441]. Η ενεργοποίηση και η καταστολή των SMO μπορούν να προκληθούν από αρκετούς παράγοντες. Μάλιστα δεν συνδέονται όλοι οι αναστολείς στην ίδια θέση των SMO, κάτι που εξηγεί και τα διαφορετικά αποτελέσματα από τη χρήση και διαφορετικών αναστολέων [442].

Το τελικό αποτέλεσμα του μοριακού μονοπατιού Hh είναι η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων Gli σε συγκεκριμένα γονίδια στόχους. Αυτή η ενεργοποίηση επηρεάζεται σε διάφορα στάδια. Αρχικά η πυρηνική τοποθέτησή τους βρίσκεται υπό στενό έλεγχο. Η πρωτεϊνική κινάση A μπορεί να διατηρήσει τις Gli στο κυτταρόπλασμα, όπου οι ενεργείς πρωτεΐνες Ras εκκινούν τη μετακίνησή τους στον πυρήνα [443-445]. Δεύτερον, υφίστανται τις διεργασίες της ουμπικουιλίνωσης και της ακετυλίωσης σε συγκεκριμένες περιοχές τους [446]. Επίσης, ο παράγοντας SuFu όχι μόνο εμποδίζει την πυρηνική μετακίνηση των Gli, αλλά και αναστέλλει τη μεταγραφική τους δραστηριότητα [447]. Οι υποδοχείς PTC δέχονται αρνητική ρύθμιση από τα τελικά τους προϊόντα, τις Gli.

Έως τώρα φαίνεται ότι το μονοπάτι Hh σχετίζεται με την ανάπτυξη των ιστών στην εμβρυική περίοδο, αργότερα την επιδιόρθωση σε φυσιολογικούς ιστούς και τέλος την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή. Η έναρξη του μοριακού μονοπατιού μέσω των SMO καταλήγει στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων Gli, των οποίων τα γονίδια στόχοι ευνοούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αγγειογένεση [448]. Καθώς υπάρχουν αρκετά στάδια, συμπεραίνουμε εύκολα, ότι μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε σημεία θα καταλήξουν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού που δεν υπόκεινται σε αναστολή από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς. Μεταλλάξεις στον PTCH1 ανιχνεύονται σε >90% όλων των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων και σε >30% σε γλοιοβλάστωμα παιδιών [449].

Σε διαταραχές του μονοπατιού το πιο βασικό χαρακτηριστικό είναι η δραστηριοποίηση του ανεξάρτητα των SMO [448]. Αυτό σημαίνει ότι παράγοντες μπορούν να ενεργοποιήσουν τις Gli πρωτεΐνες, όπως οι TGF- β , KRAS, PI3K, TNF- α [450-452]. Κατανοώντας τον τρόπο που δρουν οι ανωτέρω παράγοντες, θα είναι και πιο εύκολη η καταστολή τους, ως θεραπευτικό μέσον.

52.ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ BMP ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ Hh

Σε μελέτη έχει φανεί ότι η ενεργοποίηση του Hh σχετίζεται με μείωση της έκφρασης αρκετών δεικτών επιφανείας, όπως ο LGR5, Cdk6, που αφορούν κύτταρα στη βάση της κρύπτης [454]. Αυτό αποδόθηκε στην μειωμένη έκφραση αναστολέων του BMP. Άλλες αλλαγές που αφορούν την ενεργοποίηση του μονοπατιού είναι η αύξηση του μεσεγχυματικού παράγοντα Fox11, που ελέγχεται άμεσα από την Gli1, και έχει βρεθεί να ευνοεί την ανάπτυξη πολυπόδων στο λεπτό έντερο [453]. Συνεπώς, η στρωματική ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού, οδηγεί σε γονιδιακές διαταραχές

μέσω διαφόρων μηχανισμών, ένας εκ των οποίων είναι η αύξηση των ισομορφών BMP, λόγω έλλειψης των ανασταλτών.

Ένα σημαντικό αποτέλεσμα της ίδιας μελέτης αφορούσε την περίπτωση ενεργοποίησης του μονοπατιού σε ήδη εγκατεστημένους όγκους. Αυτό βασίστηκε στο γεγονός ότι το μονοπάτι WNT είναι απαραίτητο στη διατήρηση ενός όγκου και στο γεγονός ότι όταν τα επίπεδα του WNT έρχονταν σε αρχικές φυσιολογικές τιμές, παρατηρήθηκε υποχώρηση του όγκου [455]. Βρέθηκε, λοιπόν, πως η ενεργοποίηση του Hh, όταν υπήρχε ήδη όγκος, οδηγούσε σε μια φάση σταθερότητας του μεγέθους του και σε λιγότερες περιπτώσεις ακόμα και υποχώρηση του.

53.ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ Hh ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Η ίδια μελέτη [454] ερεύνησε τα επίπεδα του Hh σε ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο παχέος εντέρου. Βρέθηκε λοιπόν ότι η παρουσία των Hh λιγκασών δεν ήταν ανάλογη των επιπέδων των Gli πρωτεϊνών. Σε αρκετές περιπτώσεις με μετάλλαξη KRAS, υπήρξε αύξηση της Gli1 [456]. Παρόλα αυτά δεν αποδείχθηκε κάποια σχέση μεταξύ μεταλλαγμένων KRAS και mRNA Gli1. Υπήρξε όμως μια ασθενή σχέση μεταξύ μετάλλαξης APC και χαμηλών επιπέδων Gli1.

Το σύνδρομο Gorlin αφορά την ανάπτυξη βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων σε διάφορες περιοχές του σώματος. Σε περιπτώσεις ασθενών με αυτό το σύνδρομο βρέθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων στόχων του Hh χωρίς να ανιχνευθούν μεταλλάξεις. Μάλιστα η αυξημένη ενεργότητα του μονοπατιού αφορούσε είτε τον όγκο άμεσα, είτε το στρώμα [457]. Έχει επίσης βρεθεί σε μελέτη με απαλοιφή του PTCH1 αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στρωματικών όγκων του γαστρεντερικού, δηλώνοντας συσχέτιση μεταξύ Hh και GIST [458]. Υπάρχουν βέβαια και περιπτώσεις που έρχονται σε αντίθεση με τα έως τώρα δεδομένα, όπως για παράδειγμα μελέτη όπου η έκφραση του ογκογενετικού μορίου SmoM2 δεν είχε καμία επίδραση στην επαγόμενη από KRAS καρκινογένεση σε πάγκρεας και προστάτη [459,460]. Αυτά τα δεδομένα όμως δεν αντιστρέφουν το γεγονός ότι το μονοπάτι Hh συμμετέχει στη μετάσταση, μια διαδικασία που τροποποιεί σημαντικά την πρόγνωση των ασθενών.

54.ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ Ηh ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Ολοένα και περισσότερες αποδείξεις έρχονται να ενισχύσουν την άποψη για τη σημασία του Hh στη λειτουργία των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα η επέκταση των λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων εξαρτάται άμεσα από το Hh [461]. Από την άλλη η επίδραση του μοριακού μονοπατιού στα αρχέγονα κύτταρα του αιμοποιητικού δεν έχει ακόμα αποσαφηνισθεί και υπάρχει αντίθεση στις επιστημονικές γνώμες [461,462]. Σύμφωνα με το μοντέλο των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων, η ενεργοποίηση του μονοπατιού προσδίδει χημειοανθεκτικότητα και αντοχή στην ακτινοβολία στον όγκο [463]. Σε μελέτη για τον καρκίνο παγκρέατος, βρέθηκε πως η χρήση ενός αναστολέυ του Hh ενίσχυσε τη μεταφορά του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου [464]. Παρόλα αυτά δεν έχει αποδειχθεί αν η ενεργοποίηση του μονοπατιού ασκεί θετική ή αρνητική δράση στον καρκίνο παγκρέατος, καθώς υπάρχουν μελέτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα [465,466].

Σαν γενικό συμπέρασμα μπορούμε να πούμε ότι επηρεάζει το μονοπάτι τα βλαστικά κύτταρα που είναι ήδη ανθεκτικά στη θεραπεία. Αρκετοί δείκτες επιφανείας των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων εξαρτώνται από το Hh, όπως ALDH1, Bmi1, snail, Wnt2, CD44 [467-469]. Τα επίπεδα του Hh ανευρίσκονται συχνά αυξημένα σχεδόν σε όλα τα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα. Άρα, θεωρείται αρκετά σημαντικό να επιτευχθεί η αναστολή του Hh, για να οδηγήσει σε μείωση του αριθμού των βλαστικών καρκινικών κυττάρων.

Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία αποτελούν τις βασικές θεραπευτικές μεθόδους για τον καρκίνο. Η ανθεκτικότητα όμως του όγκου στις ανωτέρω μεθόδους, είναι ίσως και το βασικότερο εμπόδιο στην επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος. Η χρήση αναστολέων του μονοπατιού, μαζί με άλλα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα μελετάται ενδελεχώς [470,471]. Χρειάζεται να καθορισθούν οι μεσολαβητές του μονοπατιού, που οδηγούν στα συγκεκριμένα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της MAP3K10, ενισχύει το δυναμικό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος και μειώνει την ευαισθησία του όγκου στη χημειοθεραπεία, μέσω της αυξημένης έκφρασης των Gli1,2 [472]. Διασταύρωση των μονοπατιών Hh και PI3K/AKT, έχει αναφερθεί σε καρκίνο προστάτη και πνεύμονα, ενώ έχει δοκιμαστεί και συνδυασμός αναστολέων Hh και Notch [473,474]. Αυξημένα επίπεδα Hh οδηγούν σε αύξηση του Bcl2, με αποτέλεσμα αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και αντοχή στους μηχανισμούς απόπτωσης [475]. Συνεπώς, η δράση του μονοπατιού στην

χημειοανθεκτικότητα, ποικίλλει σε διάφορους καρκινικούς τύπους και σχετίζεται με τη λειτουργία και τα επίπεδα και άλλων μοριακών μονοπατιών.

55.Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ Ηh ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΩΘΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ

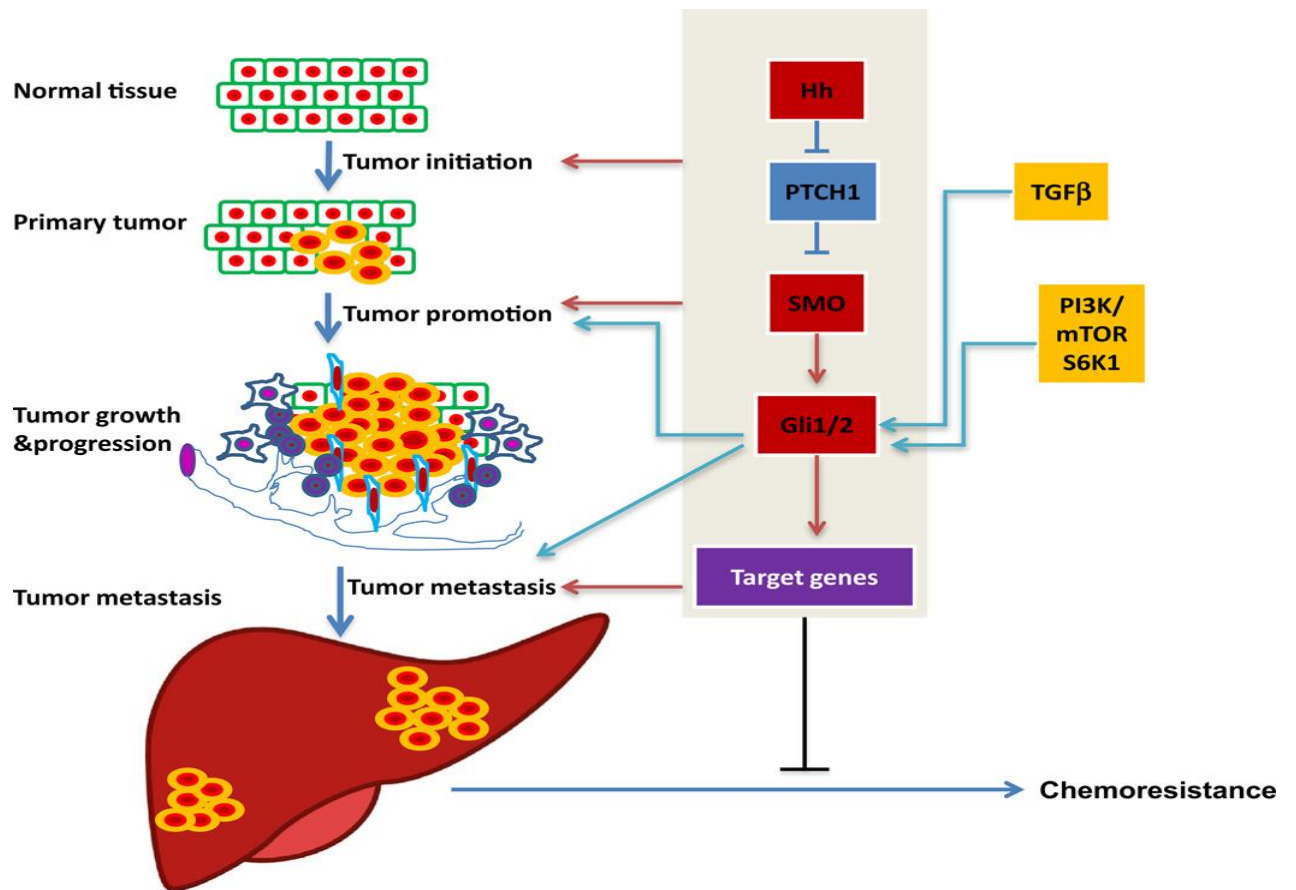
Φαίνεται ότι η επιρροή του μονοπατιού στον καρκίνο αφορά σε τρία στάδια.

-συμμετέχει στις εναρκτήριες διαδικασίες της καρκινογένεσης

-ενισχύει το καρκινικό δυναμικό

-ρυθμίζει τη λειτουργία των καρκινικών κυττάρων, που επιβιώνουν μετά από χημειοθεραπεία

Για παράδειγμα, στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα η ενεργοποίηση του, ενώ ενισχύει την καρκινική μετατροπή των κυττάρων, εντούτοις δεν επηρεάζει τη θέση που θα βρεθούν τα καρκινικά κύτταρα [476]. Σε άλλους τύπους, όπως στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και στη λευχαιμία, η δράση του αφορά στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, ίσως να μην έχει τόση σημασία [461,477].



Ο ρόλος του Hh στον καρκίνο. Τριπλή δράση, ως οδηγός των καρκινικών κυττάρων, ως προωθητής της καρκινικής μετατροπής και ως παράγοντας ανθεκτικότητας στη θεραπεία. Βασιλοκυτταρικά καρκινώματα, ραβδομυοσαρκώματα, μυελοβλάστωμα, προκαλούνται σε πειράματα ποντικών από την ενεργοποίηση του. Στις ίδιες περιπτώσεις ευρίσκονται αυξημένα επίπεδα Hh στον άνθρωπο, ενώ στο μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, η μόνη ενεργοποίηση του δεν επαρκεί για την έναρξη της νόσου. Απαλοιφή των Rbl/p53, οδηγεί σε υπερέκφραση των SMO με επιτάχυνση του καρκινώματος, ενώ αναστολή των SMO μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων [483].

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Hh, λοιπόν δεν αρκεί από μόνη της για την καρκινογένεση. Ποντίκια στα οποία έγινε απαλοιφή του p53, όλα ανέπτυξαν μυελοβλάστωμα [478]. Ισχυρή σχέση υπάρχει μεταξύ του Hh και των σηματοδοτικών μοριακών μονοπατιών αυξητικών παραγόντων. Ο PDGFRα ρυθμίζεται από το Hh και είναι υπεύθυνος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε βασιλοκυτταρικό καρκίνωμα [479].

Το μονοπάτι Hh διαδραματίζει όμως ρόλο και στο μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων. Μάλιστα, η χρήση αναστολέων του σε παγκρεατικό καρκίνο φαίνεται να μειώνει την πιθανότητα μετάστασης [467,480]. Σε μεταστατική νόσο το μονοπάτι Hh είναι ενεργό όχι μόνο στον ίδιο τον όγκο, αλλά και στο στρώμα. Ακόμα δεν είναι γνωστοί οι παράγοντες του μονοπατιού που είναι κυρίως υπεύθυνοι για τη μετάσταση, αν και υπάρχουν έως τώρα αρκετές ενδείξεις, πχ snail, TGFβ, wnt, HGF [467,481,482].

56.Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ Hh ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΛΩΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αρχικά το γονίδιο για τον Hedgehog απομονώθηκε στη Δροσόφιλα, ως μέσο ρύθμισης της πολικότητας των κυττάρων. Κατά την εμβρυονική ανάπτυξη τα κύτταρα κατευθύνονται με συγκεκριμένη αυστηρή πορεία. Μάλιστα έχει ιδιαίτερη σημασία στη διαφοροποίηση των κυττάρων για το σχηματισμό των νευρώνων [484]. Επίσης, χρειάζεται για την επικοινωνία των κυττάρων στο μεσέγγυμα και στη δημιουργία αρκετών αδενικών σχηματισμών. Τα αναπτυσσόμενα άκρα των θηλαστικών αποτελούν το καλύτερο πρότυπο μελέτης της πολικότητας των κυττάρων. Καθώς τα κύτταρα 'πολώνονται' στην αρχική φάση τα επίπεδα του Hh είναι χαμηλά και στη τελική φάση είναι υψηλά [485].

Σε κύτταρα της παρεγκεφαλίδας έχει μελετηθεί αρκετά η επιρροή του Hh στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με την παρουσία της πρωτεΐνης Shh [486]. Αρκετές in vivo μελέτες επιβεβαιώνουν αυτή τη θεωρία. Γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επηρεάζονται από τον παράγοντα Hh, όπως της κυκλίνης D2 και το γονίδιο N-myc. Γνωρίζουμε όμως, ότι οι μηχανισμοί διαφέρουν σε κάθε κυτταρικό τύπο, ενώ και τα αποτελέσματα επίσης ποικίλλουν.

57.ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΟΥ Hh

Είτε με αυτοκρινή είτε με παρακρινή μηχανισμό έχουν αναπτυχθεί αρκετοί παράγοντες που στοχεύουν το μονοπάτι Hh. Ο πιο αξιόπιστος που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη είναι το vismodegib, που εγκρίθηκε το 2012 στην Αμερική και το 2013 στην Ευρώπη, για τη θεραπεία μεταστατικών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων ή σε τοπικά εκτεταμένες νόσους που δεν δύναται χειρουργείο ή ακτινοβολία [487,488]. Είναι ανταγωνιστής των SMO και σε μελέτες που οδήγησαν στην έγκρισή του φαίνεται να παρέχει μια συνολική αύξηση της επιβίωσης κατά 0,8 χρόνια [489].

Το όφελος της μεγαλύτερης επιβίωσης ήταν αναμενόμενο για τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα, καθώς σε πάνω από 95% των περιπτώσεων, το μονοπάτι σχετιζόταν με τη νόσο. Μελετάται επίσης σε ασθενείς με υποτροπή γλοιοβλαστώματος, όταν η χειρουργική αφαίρεση ενέχει πολλούς κινδύνους [490]. Επιλέχθηκαν ασθενείς οι οποίοι ελάμβαναν για μια εβδομάδα καθημερινά το φάρμακο, σε αντίθεση με μια ομάδα ελέγχου και τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά. Αν και δεν υπήρξε εξεζητημένη διαφορά στην επιβίωση, εντούτοις υπήρξε μείωση των αρχέγονων CD133+ καρκινικών κυττάρων στον όγκο.

Αρκετοί ακόμα SMO αναστολείς δοκιμάζονται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες σε γαστρεντερικό καρκίνο, όπου προστέθηκε vismodegib στη κλασσική χημειοθεραπεία, τα αποτελέσματα ήταν απογοητευτικά, αφού δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση των ασθενών [491,492]. Ιδιαίτερα, μελέτη με 199 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου, όπου προστέθηκε vismodegib σε φλουουρακίλη-5, φολινικό οξύ και οξαλιπλατίνη ή ιρινοτεκάνη, δεν υπήρξε διαφορά στην συνολική επιβίωση. Αυτό δυστυχώς είχε σαν συνέπεια την μη επιβεβαίωση της θεωρίας, πως η διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ καρκινικών κυττάρων και κυττάρων του στρώματος που επιτελείται από το μονοπάτι Hh, σε συνδυασμό με την κλασσική χημειοθεραπεία, θα οδηγούσε σε καλύτερο αντικαρκινικό αποτέλεσμα [493].

Ένας άλλος παράγοντας που έχει δοκιμαστεί είναι ο saridegib. Τρεις διαφορετικές έρευνες που αφορούσαν αντιστοίχως καρκίνο παγκρέατος, χονδροσάρκωμα και μυελοϊνώση, οδηγήθηκαν σε πρόωρη διακοπή λόγω έλλειψης κλινικής βελτίωσης [494,495]. Από την άλλη μεριά όμως, σε μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, η χρήση αναστολέα SMO μαζί με ετοποσιδίδη και σισπλατίνη, βρέθηκε να έχει θετικά αποτελέσματα, αν και υπάρχει και εδώ άλλη μελέτη όπου η προσθήκη vismodegib σε θεραπεία μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα, δεν είχε στατιστικά σημαντικό

αποτέλεσμα σε σύγκριση με ομάδα ασθενών που δεν ελάμβαναν αναστολέα [491,496].

Τα έως τώρα δεδομένα, συνεπώς δεν διαφωτίζουν το πεδίο της θεραπευτικής παρέμβασης. Πολλές και αντικρουόμενες είναι οι μελέτες και δεν γίνεται να βγουν ασφαλή συμπεράσματα. Η σημασία του Hh στη δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων, σε καμία περίπτωση δεν τίθεται υπό αμφισβήτηση. Αυτό που έχει όμως προτεραιότητα είναι ο τρόπος που θα ανασταλεί το μονοπάτι, αλλά και ο κατάλληλος συνδυασμός και άλλων παραγόντων, που θα επηρεάσουν συνολικά τη νόσο, με θετικά για τον ασθενή αποτελέσματα.

58.ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ Hh

Η ανεύρεση βιοδεικτών είναι απαραίτητη, καθώς θα μπορεί να υπάρξει καλύτερος θεραπευτικός σχεδιασμός, σε διάφορους τύπους καρκίνου, εκτός των βασικοκυτταρικών. Στο μυελοβλάστωμα, γενετικές μεταλλάξεις ανιχνεύονται σε ποσοστό 15-30%, κάτι που εξαρτάται και από την ηλικία του ασθενούς [497]. Η έκφραση mRNA χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα σαν βιοδείκτης, αφού δεν έχουν ακόμα αναπτυχθεί συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα που να αφορούν το μοριακό μονοπάτι Hh [498]. Υπάρχει όμως μελέτη που κατηγοριοποιεί τα μυελοβλαστώματα σε τρεις κατηγορίες, τα SHH, WNT και τα μη-SHH/WNT, με αντισώματα εναντίον τεσσάρων πρωτεϊνών [499]. Σε άλλη μελέτη σε 50 ασθενείς με μυελοβλάστωμα μελετήθηκε η αναστολή τεσσάρων γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι Hh, μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής. Από αυτούς τα άτομα που είχαν ανενεργό το μονοπάτι, είχαν γενικά καλύτερη πορεία νόσου, ενώ από τους υπόλοιπους, μεγάλο ποσοστό είχε ανταπόκριση στη θεραπεία με αναστολείς [500].

Οι παράγοντες GLI1, GLI2, ως σημαντικά στελέχη του μονοπατιού Hh θεωρείται σημαντικό να μπορούν να αναγνωρίζονται μέσω αντισωμάτων, προκειμένου να λειτουργούν ως βιοδείκτες που θα δίνουν πληροφορίες σχετικά με την ενεργότητα του Hh. Έτσι, θα αναπτυχθούν και στοχευμένοι αναστολείς με καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα.

59.ΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ Hh

Αναστολείς SMO χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια SMO και PTCH1 που σχετίζονται άμεσα με την ενεργότητα του Hh [501]. Ένας από τους λόγους αποτυχίας της χρήσης των αναστολέων σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, είναι και η μη καλή συγκέντρωση της ουσίας στο στρώμα. Σε μελέτη για την vismodegib και τη φαρμακοκινητική του φαρμάκου, επιβεβαιώνεται αυτή η άποψη [502]. Ένας άλλος λόγος θεωρείται η ενεργοποίηση του μονοπατιού με διαφορετικό τρόπο, παρακάμπτοντας τους παράγοντες για τους οποίους χορηγείται ο αναστολέας [503].

Αναφέρεται μια περίπτωση όπου ασθενής με μυελοβλάστωμα έλαβε θεραπεία με vismodegib και τρεις μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας ανιχνεύθηκε μετάλλαξη στο γονίδιο για SMO, ενώ αρχικά είχε βρεθεί μετάλλαξη στο PTCH1. Η νέα αυτή μετάλλαξη αφορούσε τον όγκο σε δεύτερο χρόνο και όχι από την αρχή της νόσου και έτσι εξηγήθηκε η αντοχή στη θεραπεία [504]. Μια ακόμα εκδοχή της αντίστασης στη θεραπεία, είναι η διαφορετική ενεργοποίηση της έκφρασης του GLI1 παράγοντα ή εναλλακτικός τρόπος δράσης [503,505-506]. Η διασταύρωση σε διάφορα σημεία των μοριακών μηχανισμών καθιστά δύσκολο το έργο της στόχευσης σε συγκεκριμένους παράγοντες, που θα οδηγήσουν σε διακοπή του μονοπατιού. Γι' αυτό και είναι αναγκαίο να βελτιστοποιηθούν οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε ποντίκια, προκειμένου να υπάρξουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Μικρές GTPάσες, το μονοπάτι PI3K, οι κινάσες της οικογένειας Src και μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, έχουν βρεθεί έως τώρα να επηρεάζουν τον τρόπο ενεργοποίησης και λειτουργίας του Hh [507]. Προκλινικές για το μυελοβλάστωμα μελέτες προτείνουν την ταυτόχρονη χορήγηση αναστολέων SMO και αναστολέων PI3K/AKT [505]. Το vismodegib δεν είχε αποτέλεσμα στη θεραπεία καρκίνου οισοφάγου με υπερενεργοποίηση του mTOR S6K1 (στόχος του μονοπατιού PI3K), λόγω της ανεξάρτητα των SMO ενεργοποίησης του GLI1. Η προσθήκη στη θεραπεία ενός αναστολέα mTOR βελτίωσε τα αποτελέσματα [508]. Σε άλλη περίπτωση η χρήση αναστολέα του PI3K μείωσε τα επίπεδα των SMO και GLI1 κατά 50% [503].

Δεν έχει ακόμα αποδειχθεί αν η χρήση άλλου αναστολέα SMO θα μπορούσε να έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα, καθώς όλοι οι έως τώρα γνωστοί αναστολείς δρουν με σχεδόν ίδιο τρόπο. Η ιντρακοναζόλη αν και αντιμυκητιασικό σκευάσμα, δρα σαν αναστολέας SMO σε διαφορετική θέση και θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπεία δεύτερης γραμμής. Βέβαια, δεν είναι σαφές αν στις περιπτώσεις με μεταλλάξεις στα γονίδια των SMO θα έχει πάλι την ίδια δραστηριότητα. Υπάρχουν μελέτες που δηλώνουν ότι όταν

χορηγήθηκε σαν δεύτερη γραμμή μετά vismodegib είχε σημαντική μείωση στα επίπεδα του GLI1-mRNA [509,510].

Η αναστολή απευθείας του GLI1 είναι υπό μελέτη. Το αρσενικό αναστέλλει τους μεταγραφικούς παράγοντες του GLI1 και θα ήταν ίσως ελπιδοφόρο να συνδυασθεί με ιντρακοναζόλη, στις περιπτώσεις που ο όγκος εμφάνιζε αντοχή στην vismodegib [511].

Οι αναστολείς του Hh θα προσθέσουν ένα ακόμα χέρι βοήθειας στη θεραπεία νεοπλασματικών παθήσεων. Δεν είναι όμως εύκολη ανάπτυξη τους και απαιτείται προσεκτική μελέτη, αλλά και ο κατάλληλος συνδυασμός θεραπευτικών φαρμάκων.

60.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ Hh

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Hh στο γαστρεντερικό επιθήλιο, αλλά και στους υπολοίπους ιστούς προκύπτει από την επικοινωνία με παράγοντες του στρώματος. Αυτό είναι και ένα από τα βασικά στοιχεία που αλλάζουν στον καρκίνο παχέος εντέρου όπου το μονοπάτι ενεργοποιείται ανεξάρτητα από τους παράγοντες του στρώματος. Όταν συμβαίνει αυτό προκαλείται υπερενεργοποίηση του μονοπατιού με αρνητικά βέβαια αποτελέσματα. Μάλιστα, αλλάζει και ο τρόπος λειτουργίας, αλλά και οι πρωτεΐνες στόχοι του, συνεπώς δεν μπορούν να προβλεφθούν οι συνέπειες. Τα κύτταρα αποκτούν νέα χαρακτηριστικά και αποφεύγουν τα αποπτωτικά σήματα.

Οι λιγκάσες που εκφράζονται κατά την ενεργοποίηση του Hh δεν φθάνουν σε επίπεδα που να καταστείλουν το μονοπάτι και αυτό παραμένει ενεργό, κάτι που μπορεί να δικαιολογηθεί από τη διαταραχή της επικοινωνίας με τα στρωματικά κύτταρα. Η φλεγμονή στο παχύ έντερο ευνοεί την ανάπτυξη καρκίνου σποραδικού τύπου, γι' αυτό και σε μελέτες σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, η συχνότητα εμφάνισης σποραδικού καρκίνου ήταν μειωμένη. Δεν έχει αποδειχθεί όμως η χρήση ανταγωνιστών του Hh σε φλεγμονώδης νόσο του εντέρου να προστατεύει από την ανάπτυξη καρκίνου.

Ο τρόπος που ενεργοποιείται το μονοπάτι στον καρκίνο, η διαφοροποίηση της σχέσης μεταξύ καρκινικών κυττάρων και στρώματος, αποτελούν τα βασικά σημεία των μελετών και αναμένεται τα αποτελέσματα να βοηθήσουν την ιατρική κοινότητα στην ανάπτυξη παραγόντων με καλά θεραπευτικά αποτελέσματα.

61.ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην μελέτη αυτή θα εστιάσουμε στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Μια νόσο που επηρεάζει και τα δύο φύλα και έχει μάλιστα υψηλό δυναμικό μεταστάσεων. Από την WHO ως καρκίνωμα παχέος εντέρου ορίζεται το κακόηθες επιθηλιακό νεόπλασμα του παχέος εντέρου. Κακόηθες θεωρείται το νεόπλασμα που διηθεί την βλεννογόνια μυϊκή στοιβάδα. Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου εντοπίζονται κυρίως στο σιγμοειδές και το ορθό αν και τα τελευταία χρόνια καταγράφεται αύξηση των καρκινωμάτων που εντοπίζονται δεξιά. Η μακροσκοπική τους εικόνα είναι ποικίλη και εξαρτάται από τον τύπο του καρκινώματος, τη φυσική του ιστορία, και το χρόνο της διάγνωσης. Αναγνωρίζονται δύο κυρίως τύποι ο εξωφυτικός και ο πινακειοειδής, με τον πρώτο συχνότερο στο δεξιό κόλον. Το καρκίνωμα του παχέος εντέρου σχηματίζει κυρίως αδενικούς σχηματισμούς διαφόρου μεγέθους και σχήματος, που καλύπτονται από ένα ή περισσότερους στοίχους κυττάρων με ή χωρίς παραγωγή βλέννης. Ο τύπος και το ποσοστό των αδενικών σχηματισμών καθώς και η ατυπία των κυττάρων που τους επενδύουν καθορίζουν το βαθμό διαφοροποίησης. Εκτός από τον συνήθη τύπο αναγνωρίζονται αρκετές υποποικιλίες Η συχνότερη από τις οποίες είναι ο βλεννώδης τύπος.

Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου επεκτείνονται τοπικά δια μέσου του τοιχώματος του οργάνου στον υποβλεννογόνιο (T1) και τον μυϊκό (T2) ιστό , εξέρχονται στο περικολικό λίπος (T3) και στη συνέχεια διασπούν τον ορογόνο (T4). Λεμφαδενικές μεταστάσεις δίνουν μόνο όταν διηθήσουν τον υποβλεννογόνο χιτώνα. Επεκτείνονται αιματογενώς μέσα από την πυλαία και την κάτω κοίλη φλέβα, γι αυτό και αρκετά συχνά η αιτία εισαγωγής ενός ασθενούς είναι η τυχαία εύρεση δευτεροπαθών μεταστάσεων στο ήπαρ που χρειάζεται διερεύνηση της πρωτοπαθούς εστίας.

Από την εποχή του Dukes αναδείχθηκε ως ισχυρός προγνωστικός δείκτης η ανατομική επέκταση του όγκου και συγκεκριμένα , η τοπική επέκταση της νόσου στο τοίχωμα του εντέρου (T) , η λεμφαδενική διασπορά (N) και η μετάσταση (M) . Έκτοτε Πολυάριθμοι παράμετροι έχουν μελετηθεί σαν προγνωστικοί δείκτες και οι πολυκεντρικές μελέτες ανέδειξαν πέντε ομάδες: τους Ισχυρούς, τους Στατιστικά Σημαντικούς, τους υπό διερεύνηση και αυτούς χωρίς αξία . Ισχυροί είναι: η Τοπική επέκταση του όγκου (T), οι Λεμφαδενικές μεταστάσεις, (N) οι Απομακρυσμένες μεταστάσεις(M), η Αγγειακή Διασπορά (V) και η Πλήρης Εξαίρεση του όγκου(R). Στατιστικά Σημαντικοί είναι η Διαφοροποίηση του όγκου , η απόσταση από το Περιφερικό Εγχειρητικό Όριο και η επέκταση του υπολειπόμενου καρκινώματος μετά από θεραπεία (ypTNM), ο Ιστολογικός τύπος, οι Ιστολογικές αλλοιώσεις που συσχετίζονται με την Υψηλή Μικροδορυφορική Αστάθεια (MSI-H) και ο τύπος της Διηθητικής Παρυφής του νεοπλασματος.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Μπαίνοντας πια στην μοριακή ιατρική, τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει έντονο ενδιαφέρον για τις τοποισομεράσες. Οι τοποισομεράσες του DNA αποτελούν μια ομάδα ενζύμων, που υπάρχουν τόσο στα ευκαρυωτικά όσο και στα προκαρυωτικά κύτταρα, δρώντας στην τοπολογία του DNA, προκαλώντας ή καταργώντας ρήγματα των ελίκων του. Είναι απαραίτητα ένζυμα στις διαδικασίες της αναπαραγωγής, της αντιγραφής, της μίτωσης και του γενετικού ανασυνδυασμού. Έχουν απομονωθεί έξι τοποισομεράσες, η IA που διακρίνεται σε 3α και 3β, ακολουθεί η IB που περιέχει την 1 και την 1mt, και τέλος είναι η IIA που περιέχει την 2α και 2β. Οι καμπθοθεκίνες και τα ανάλογα αυτών η ετοποσίδη και η τενιποσίδη είναι φάρμακα που δρουν σε διαφορετική τοποισομεράση, αναστέλλοντας την λειτουργία της. Παρόλα αυτά μόλις το 2015 οριστικοποιήθηκαν τα 6 είδη τοποισομερασών, ενώ δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως η δράση της κάθε μιας.

Έχει βρεθεί πως υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα της τοποισομεράσης I, σε καρκινικά κύτταρα από ότι σε φυσιολογικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, ενώ επίσης έχουν μετρηθεί υψηλότερα επίπεδα των τοποισομερασών I και IIA σε υποτροπιάζοντες όγκους από ότι στους αρχικούς όγκους. Οι αναστολείς τοποισομερασών στοχεύουν να προκαλέσουν διαταραχή της τρισδιάστατης δομής του DNA, οδηγώντας έτσι το κύτταρο σε απόπτωση. Βρέθηκε λοιπόν ότι η μη επαρκής ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία ίσως οφείλεται στην αστάθεια του γενετικού υλικού, αλλά και στους διαταραγμένους αποπτωτικούς μηχανισμούς. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι η τοποισομεράση IIA επηρεάζεται από την ηλικία του ατόμου, εν αντιθέσει με την τοποισομεράση I.

Το υπόλοιπο τμήμα της συγκεκριμένης μελέτης αφορά τα βλαστοκύτταρα (stem cells). Τα ογκογενετικώς τροποποιημένα βλαστοκύτταρα (oncogenically transformed cancer stem cells), χαρακτηρίζονται από την ικανότητα της αναγεννητικής δραστηριότητας που διαθέτουν, αλλά και από την πολυδυναμικότητά τους. Αποτελούν μικρό πληθυσμό κυττάρων εντός του όγκου, ο ταχύς όμως πολλαπλασιασμός τους τα καθιστά σημαντικά στοιχεία στην ανάπτυξη του όγκου. Τα διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα φαίνεται από μελέτες να αυξάνονται ταχύτερα από τα κλασσικά βλαστικά και πιθανών να προσδίδουν στον όγκο χημειοανθεκτικότητα. Έχει βρεθεί ότι βλαστικά κύτταρα που μεταφέρθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα πειραματόζωα, οδήγησαν στην εμφάνιση νέων όγκων. Παρόλα αυτά, τα στοιχεία για τον τρόπο δράσης τους στον συγκεκριμένο τομέα χαίρουν σε αρκετές περιπτώσεις, αμφισβήτησης και χρειάζονται επιπλέον μελέτες.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η συγκεκριμένη μελέτη λαμβάνει χώρα στο εργαστήριο παθολογοανατομίας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ. Θα μελετηθούν τομές από ιστούς που έχουν αφαιρεθεί χειρουργικά από ασθενείς που διεγνώσθησαν με καρκίνο παχέος εντέρου, και στους οποίους η βιοψία επιβεβαίωσε την αρχική υπόθεση. Πρόκειται λοιπόν για αρχαιακό υλικό, ενώ ουδεμία παρέμβαση θα γίνει στα υπό μελέτη άτομα.

Τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη συνεπώς είναι, άτομα και των δύο φύλων με ιστολογικά διαγνωσμένο καρκίνο παχέος εντέρου, ενώ δεν θα ισχύσουν οποιαδήποτε κριτήρια αποκλεισμού.

Αφού αρχικά ληφθούν νέες τομές από τους υπάρχοντες ιστούς υπάρχει πρόθεση να μελετηθούν τα επίπεδα των δεικτών LGR5 και Hedgehog με ειδικές ανοσοιστοχημικές μεθόδους.

Τα επίπεδα των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων θετικών για τους συγκεκριμένους δείκτες θα συσχετιστούν με την εντόπιση του όγκου, την ηλικία, το φύλο και την επιθετικότητα του όγκου, ενώ οι μεταστάσεις αφορούν εστίες στο ήπαρ.

62.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά στατιστικής επεξεργασίας Jamovi (έκδοση 0.9.5.16) και R (έκδοση 3.5.2). Για τη μελέτη της συσχέτισης μεταξύ της θέσης του καρκινώματος και έκφρασης των δεικτών LGR5 και ihh εφαρμόστηκε η δοκιμασία Mann-Whitney U Test. Η ίδια δοκιμασία εφαρμόστηκε και στην αναζήτηση συσχέτισης μεταξύ του φύλου και της έκφρασης των δεικτών. Ως κριτήριο στατιστικής σημαντικότητας και στις δύο περιπτώσεις ορίστηκε τιμή p μικρότερη από 0.05 για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Για τον έλεγχο της συσχέτισης μεταξύ του επιπέδου έκφρασης των δεικτών LGR5 και ihh εφαρμόστηκε η δοκιμασία Spearman Rho. Με την ίδια δοκιμασία αξιολογήθηκε στατιστικά η σχέση ανάμεσα στην ηλικία και την έκφραση των δεικτών LGR5 και ihh. Τέλος, για τη μελέτη της συσχέτισης ανάμεσα στην έκφραση των δεικτών LGR5 και ihh και την παρουσία μεταστάσεων, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Fisher's exact test. Ως κριτήριο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε και πάλι τιμή p μικρότερη από 0.05, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

63.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΘΕΣΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LGR5 ΚΑΙ IHH

Η στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U Test ελέγχει την ισότητα δύο μέσων μεταξύ ανεξάρτητων δειγμάτων. Ως μη παραμετρική δοκιμασία, ελέγχει τη συσχέτιση σε πληθυσμούς στους οποίους δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η κανονικότητα.

Ως ανεξάρτητη μεταβλητή ορίστηκε η θέση εντόπισης του καρκίνου. Καθώς ο αριθμός των περιπτώσεων καρκίνου με εντόπιση στο κατιόν κόλον ήταν μικρός (n=7), δημιουργήθηκαν δύο ομάδες, η πρώτη με εντόπιση καρκίνου στο ορθοσιγμοειδές και η δεύτερη με εντόπιση στο κόλον (ανιόν ή κατιόν) (Πίνακες 1 και 2).

Η έκφραση των δεικτών LGR5 και ihh αποτέλεσε την εξαρτημένη μεταβλητή σε κάθε περίπτωση. Δημιουργήθηκαν 4 διαβαθμίσεις έκφρασης του κάθε δείκτη, ανάλογα με την ένταση σήματος των καρκινικών κυττάρων (Πίνακας 3).

Για το δείκτη LGR5 οι διάμεσες τιμές στις ομάδες του ορθοσιγμοειδούς και κόλον ήταν 1 και 3.5 αντίστοιχα. Οι κατανομές στις δύο ομάδες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά (Mann-Whitney U=255, $n_1=21$ $n_2=32$ και $p=0.132$). Αντίστοιχα, για το δείκτη ihh, οι διάμεσες τιμές στις ομάδες του ορθοσιγμοειδούς και κόλον ήταν 2 και 2.5. Οι κατανομές στις δύο ομάδες και πάλι δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά (Mann-Whitney U=320, $n_1=21$ $n_2=32$ και $p=0.767$).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LGR5 ΚΑΙ IHH

Ο συντελεστής Spearman Rho ελέγχει την ισχύ καθώς και την κατεύθυνση της συσχέτισης (θετική ή αρνητική) μεταξύ δύο διαβαθμισμένων μεταβλητών. Για την εφαρμογή της δοκιμασίας, χρησιμοποιήθηκε η ίδια διαβάθμιση για την έκφραση των δεικτών LGR5 και ihh, όπως και κατά τον έλεγχο της σχέσης ανάμεσα στη θέση του καρκινώματος και την έκφραση των δεικτών (Πίνακας 1).

Ο συντελεστής Rho έδειξε την ύπαρξη **μέτριας θετικής συσχέτισης** ανάμεσα στην έκφραση των δεικτών LGR5 και ihh, $\rho=0.515$, $p<0.001$. Η σχέση μεταξύ των δύο δεικτών παρουσιάζεται στο διάγραμμα διασποράς. (Διάγραμμα 1).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΗΛΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LGR5 ΚΑΙ IHH

Η δοκιμασία Spearman Rho δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ηλικία και την έκφραση των δεικτών LGR5 και IHH. Πιο

συγκεκριμένα, για το δείκτη LGR5 , οι στατιστικοί δείκτες είναι $\rho=-0.172$ $\rho=0.219$ και για το δείκτη IHH $\rho=-0.104$ $\rho=0.460$ (Διαγράμματα 2 και 3).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LGR5 ΚΑΙ IHH

Η δοκιμασία Mann-Whitney U Test δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των δεικτών LGR5 και ihh και του φύλου. Για το LGR5 οι διάμεσες τιμές στις ομάδες του αρσενικού και θηλυκού φύλου ήταν 3 και στις δύο περιπτώσεις, με Mann-Whitney $U=334$, $n_1=28$ $n_2=25$ και $\rho=0.778$. Παράλληλα, για τον ihh οι διάμεσες τιμές στις ομάδες του αρσενικού και θηλυκού φύλου ήταν 3 και 2 αντίστοιχα, με Mann-Whitney $U=311$, $n_1=28$ $n_2=25$ και $\rho=0.466$.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LGR5 ΚΑΙ IHH

Η δοκιμασία Fisher's exact test χρησιμοποιείται για την αναζήτηση συσχέτισης ανάμεσα σε κατηγορικές μεταβλητές, όταν το πλήθος των παρατηρήσεων είναι μικρό (<1000). Η δοκιμασία έδειξε ότι η παρουσία μεταστάσεων είναι στατιστικά πιο πιθανή όταν εντοπίζεται έκφραση του δείκτη LGR5 ($\rho=0.025$, Διάγραμμα 4). Παράλληλα, η παρουσία μεταστάσεων είναι στατιστικά πιο πιθανή όταν εκφράζεται ο δείκτης ihh ($\rho=0.004$, Διάγραμμα 5).

64.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η θέση ανάπτυξης του καρκίνου δε φαίνεται να σχετίζεται με το βαθμό έκφρασης των LGR5 και ihh από τα καρκινικά κύτταρα. Αυτό πιθανόν να προκύπτει από το γεγονός ότι τα αρχέγονα κύτταρα του παχέος εντέρου και του ορθού, από τα οποία θεωρείται ότι προκύπτουν οι νεοπλασίες του εντέρου, προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό εμβρυικών κυττάρων [512]. Κατά την εμβρυογένεση, ο οισοφάγος, ο στόμαχος, το λεπτό και παχύ έντερο καθώς και τα σχετιζόμενα με αυτά όργανα, αναπτύσσονται από το ενδόδερμα. Αυτό γίνεται μέσω ενεργοποίησης ενός πολύπλοκου δικτύου μεταγραφικών παραγόντων και μέσω αλληλεπίδρασης του ενδοδέρματος με το μεσόδερμα. Μελέτες στη *Drosophila*, έδειξαν ότι από το ενδόδερμα προέρχονται και τα αρχέγονα εντερικά κύτταρα[513]. Πρόσφατη μελέτη σε εμβρυικά προγονικά κύτταρα έδειξε ότι όλα τα LGR5+ προγονικά εντερικά κύτταρα έχουν τα ίδια μεταγραφικά προφίλ, ανεξάρτητα της εντόπισης τους [514]. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας φαίνεται να επιβεβαιώνει το παραπάνω εύρημα.

Η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στους δείκτες LGR5 και ihh έχει αναδειχθεί ξανά [454]. Η ανεύρεση μέτριας συσχέτισης ($\rho=0.515$), συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης επιπρόσθετων παραγόντων που επηρεάζουν την έκφραση των LGR5 και ihh σε κάθε περίπτωση. Είναι γνωστό μέχρι στιγμής ότι ο παράγοντας LGR5 επηρεάζει θετικά τη διεύθυνση και το μεταστατικό δυναμικό του όγκου. Παράλληλα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού ihh σχετίζεται με τη χημειοανθεκτικότητα του όγκου. Η πιθανή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων μέσω ενός κοινού σηματοδοτικού μονοπατιού θα μπορούσε να επιτρέψει την κοινή στόχευση τους για την ανεύρεση ενός δραστικού θεραπευτικού μέσου για τον εντερικό καρκίνο. Υπενθυμίζεται ότι η στόχευση

μόνο του μονοπατιού HEDGEHOG στη θεραπεία του καρκίνου του εντέρου μέσω αναστολής της λιγκάσης ihh, είχε μέχρι στιγμής αποθαρρυντικά αποτελέσματα.

Η έκφραση των δεικτών LGR5 και ihh δε φαίνεται να επηρεάζεται από το φύλο. Το γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη LGR5 εδράζεται στο χρωμόσωμα 12, ενώ το γονίδιο που εκφράζει τη λιγκάση ihh στο χρωμόσωμα 7. Μελέτη σε LGR5+ κύτταρα ενδομητρίου ανέδειξε μια αύξηση της έκφρασης του LGR5 μετά από επίδραση της προγεστερόνης [515]. Εντούτοις, αντίστοιχη συσχέτιση επίδρασης φυλετικών ορμονών σε εντερικά κύτταρα LGR5+ δεν έχει μέχρι στιγμής αποδειχθεί. Παράλληλα, το μονοπάτι Hedgehog, βρέθηκε να εμπλέκεται στη φυλετική διαφοροποίηση κατά την εμβρυογένεση. Συσχέτιση του μονοπατιού Hedgehog με φυλετικές διεργασίες στην ενήλικη ζωή δεν έχει μέχρι στιγμής ερευνηθεί.

Η σχέση της ηλικίας με την επίπτωση του ορθοκολικού καρκίνου έχει μελετηθεί εκτενώς [516-518]. Η ηλικία θεωρείται ως ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου. Εντούτοις, η επίδραση της ηλικίας σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο στους εντερικούς ιστούς δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Πρόσφατη μελέτη [519] κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το ποσοστό των LGR5+ αρχέγονων εντερικών κυττάρων δεν μειώνεται με την πρόοδο της ηλικίας. Αντ' αυτού, η μείωση του αναγεννητικού δυναμικού του εντερικού επιθηλίου που παρατηρείται σε αυξημένες ηλικίες, φαίνεται να οφείλεται σε μικρότερη ενεργοποίηση του μονοπατιού WNT. Μετά από τη στατιστική ανάλυση των παρατηρήσεων, η παρούσα έρευνα καταλήγει στη μη ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της ηλικίας και του ποσοστού έκφρασης LGR5 στα καρκινικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται σύμφωνα με τις επικρατούσες θεωρίες για την εντερική καρκινογένεση, από τα αρχέγονα εντερικά κύτταρα. Απομένει να ερευνηθεί η ύπαρξη διαφοράς στην έκφραση του υποδοχέα LGR5 ανάμεσα σε καρκινικά και φυσιολογικά αρχέγονα εντερικά κύτταρα, σε σχέση με την ηλικία.

Το μονοπάτι Hedgehog διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης [514,520,521]. Στην ενήλικη ζωή, η δράση του στο έντερο περιορίζεται στην ομοίωση της γαστρεντερικής οδού [522]. Η αλλοίωση της λειτουργίας του μονοπατιού Hedgehog έχει συνδεθεί με ασθένειες σχετιζόμενες με την ηλικία, όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης και η Αθηροσκλήρωση [523]. Σύμφωνα με τα στατιστικά δεδομένα της παρούσας έρευνας, δεν υφίσταται αντίστοιχη συσχέτιση της ηλικίας με την ενεργότητα του μονοπατιού Hedgehog. Η παθογένεια του εντερικού καρκίνου περιλαμβάνει την υπέρμετρη ενεργοποίηση του μονοπατιού Hedgehog, αλλά ο βαθμός ενεργότητας του μονοπατιού δε φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από την ηλικία.

Τέλος, σύμφωνα και με την ανασκόπηση που προηγήθηκε τα αποτελέσματα μας είναι συμβατά με πολλών άλλων μελετών, όσον αφορά το μεταστατικό δυναμικό και αν αυτό επηρεάζεται από την έκφραση των ανωτέρω δεικτών. Η ισχυρή έκφραση των δεικτών των αρχέγονων κυττάρων LGR5 και ihh διαδραματίζει ρόλο στο μεταστατικό δυναμικό του όγκου και φαίνεται πως οι ιστοί που εκφράζουν τους δείκτες έχουν και πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα

ανάπτυξης απομακρυσμένων μεταστάσεων. Άρα σε μια αρχική αφαίρεση πρωτοπαθούς εστίας, οι δείκτες αυτοί θα μπορούσαν να μας οδηγήσουν πιο σωστά στην περαιτέρω παρακολούθηση του ασθενούς για την ανεύρεση σε δεύτερο χρόνο μετάστασης.

65.ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

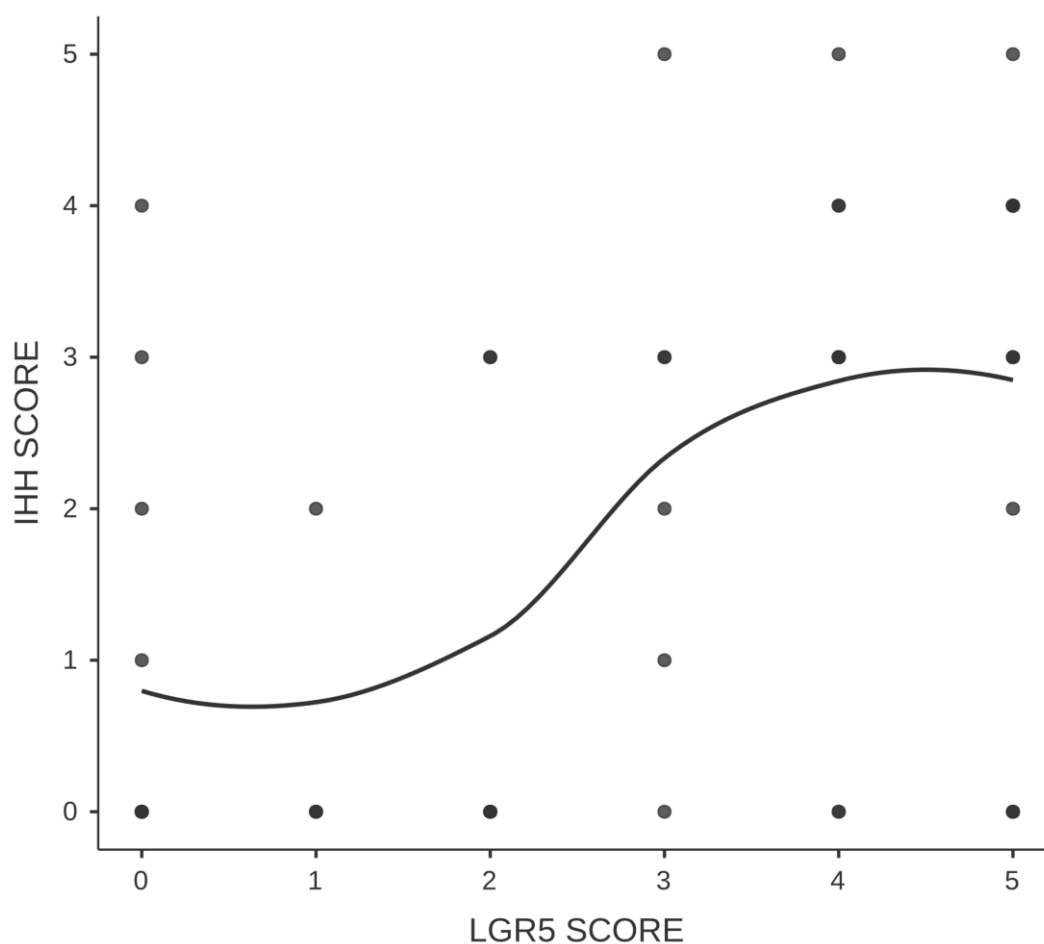
Πίνακες 1 και 2. Συχνότητες παρατηρήσεων ανά τοποθεσία καρκίνου.

Frequencies of LGR5 SCORE		
	LOCATION	
LGR5 SCORE	ORTHOSIGMOID	COLON
0	8	5
1	3	1
2	1	5
3	1	5
4	3	7
5	5	9

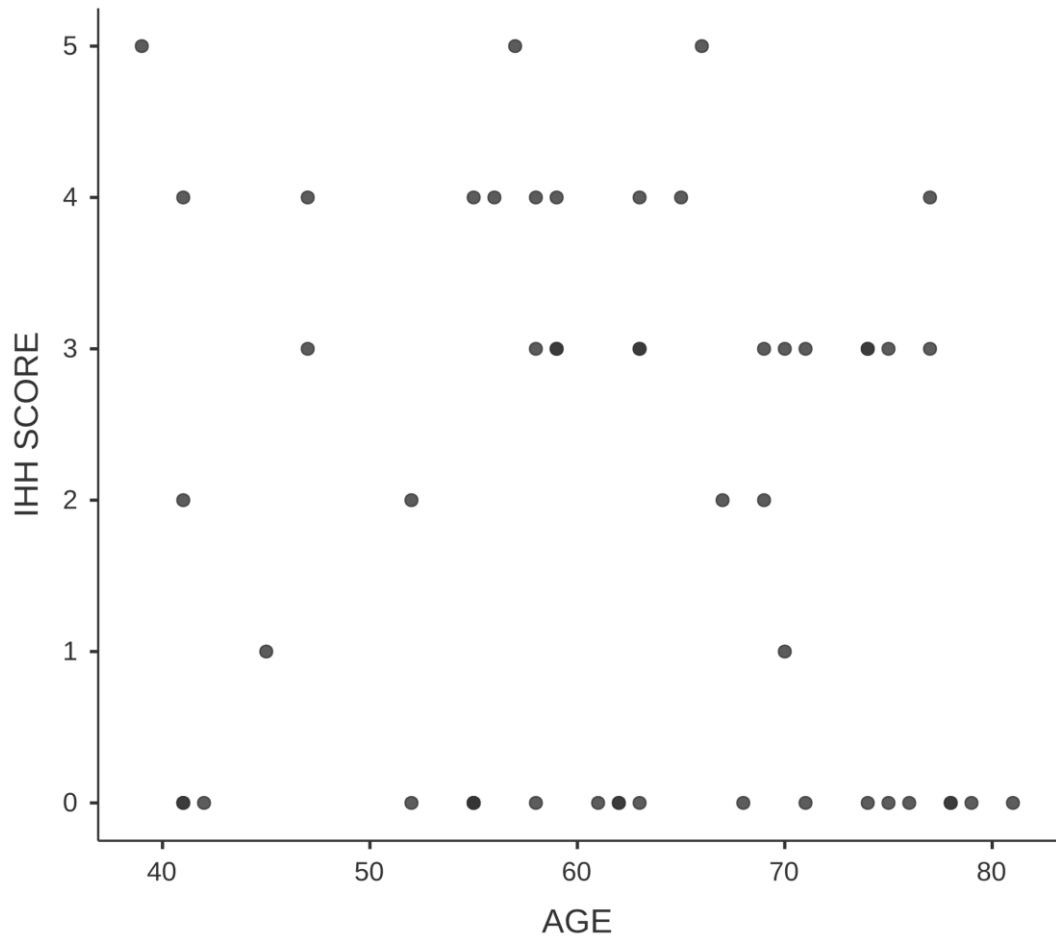
Frequencies of IHH SCORE		
	LOCATION	
IHH SCORE	ORTHOSIGMOID	COLON
0	8	14
1	2	0
2	2	2
3	5	8
4	4	5
5	0	3

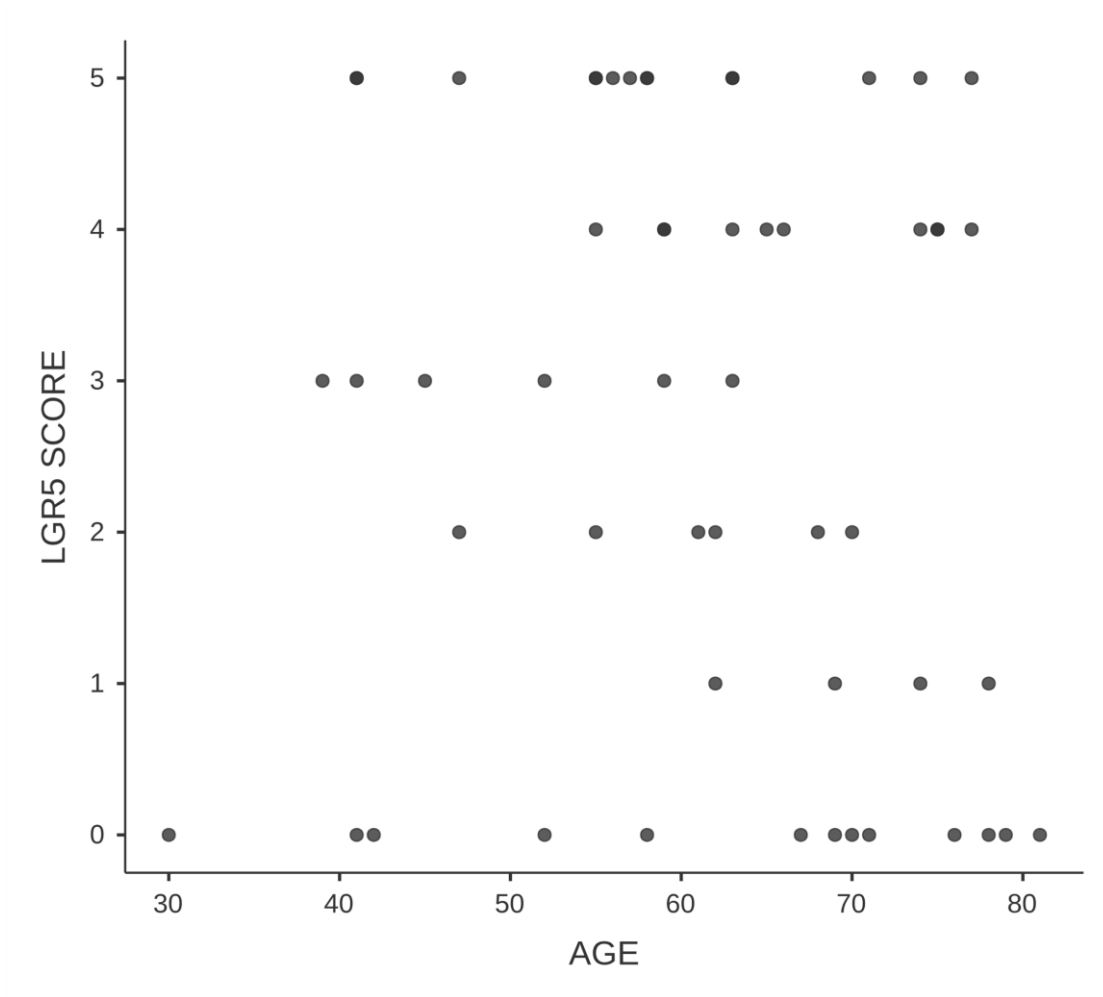
Πίνακας 3. Διαβάθμιση έκφρασης των δεικτών LGR5 και ihh ανάλογα με το ποσοστό έκφρασης τους επί του συνόλου των καρκινικών κυττάρων.

Ποσοστό Έκφρασης δείκτη επί του συνόλου των καρκινικών κυττάρων	Διαβάθμιση
0	0
<5%	1
5-25%	2
25-50%	3
50-75%	4
>75%	5

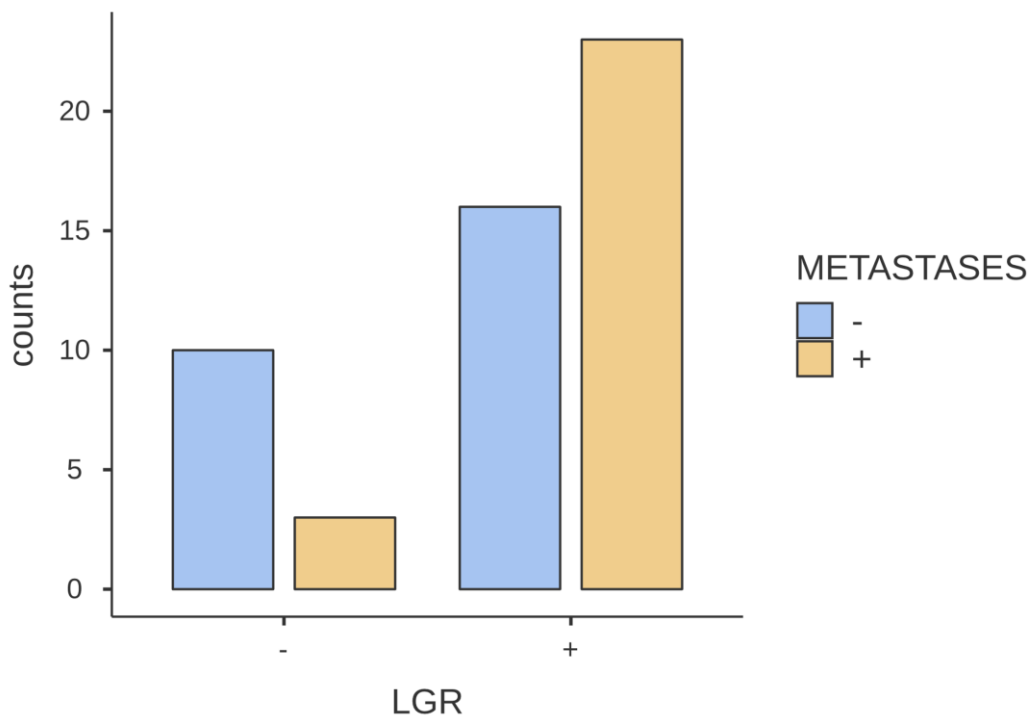
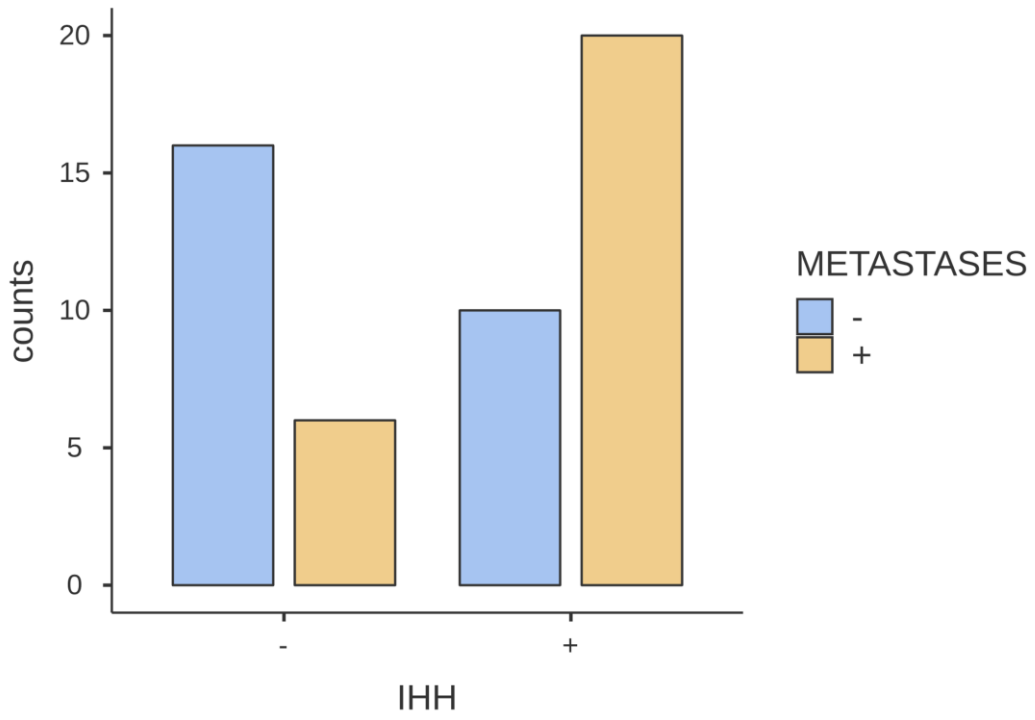


Διαγραμμα 1. Διάγραμμα Διασποράς των δεικτών LGR5 και ihh, n=53. Οι παρατηρήσεις σημειώνονται στο διάγραμμα με κουκκίδες. Η θετική συσχέτιση ανάμεσα στους δύο δείκτες απεικονίζεται από την τάση που ακολουθούν οι κουκκίδες, από κάτω αριστερά προς τα πάνω δεξιά. Σε περίπτωση συσχέτισης υψηλής ισχύος, οι παρατηρήσεις θα τοποθετούνταν ομοιογενώς επί ή σε μικρή απόσταση από τη γραμμή τάσης.





Διαγράμματα 2 και 3. Διαγράμματα διασποράς της ηλικίας σε σχέση με την έκφραση των δεικτών ihh και LGR5. Στα διαγράμματα αυτά η τάση των παρατηρήσεων (κουκκίδες) δεν προσδιορίζει κάποια θετική ή αρνητική συσχέτιση.



Διαγράμματα 4 και 5: Ιστογράμματα παρουσίας μεταστάσεων και έκφρασης δεικτών LGR5 και ihh. Με το σύμβολο (+) δηλώνεται η παρουσία μεταστάσεων και με το σύμβολο (-) απουσία μεταστάσεων. Για τους δείκτες, το σύμβολο (+) δηλώνει έκφραση και το (-) μη έκφραση. Στον κάθετο άξονα δηλώνεται ο αριθμός των παρατηρήσεων ανά περίπτωση.

66.ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- Apaf1 apoptotic protease activating factor-1
- APC/C anaphase promoting complex
- APTX gene aprataxine
- CBC crypt base columnar cells
- Cdk cyclin dependent kinases
- DISC death inducing signaling complex
- GLI1 glioma-associated oncogene
- MAP mitogen activated protein kinases
- MDC1 mediator to DNA damage checkpoint
- MMR mismatch repair genes
- ORC origin recognition complex
- PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase
- PNKP polynucleotide kinase 3-phosphatase
- snRNPs small nuclear ribonucleo proteins
- TDP1 Tyrosyl-DNA phosphodiesterase
- TNF tumor necrosis factor
- XRCC1 x ray repair cross complementing 1
- TROY tumor necrosis factor receptor
- TSH thyroid hormone

67.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
2. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Fearon, E.R. and Vogelstein, B. *Cell*. 1990; 61: 759–767
3. Aleksandrova K, Boeing H, Jenab M. Total and high-molecular weight adiponectin and risk of colorectal cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Carcinogenesis* 2012;33:1211-8.
4. Wong HL, Koh WP, Probst-Hensch NM, Van den Berg D, Yu MC, Ingles SA. Insulin-like growth factor-1 promoter polymorphisms and colorectal cancer: a functional genomics approach. *Gut* 2008;57:1090
5. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors, Fatima A. Haggar, M.P.H.^{1,2} and Robin P. Boushey, M.D., Ph.D.¹ *Clin Colon Rectal Surg.* 2009 Nov; 22(4): 191–197. doi: [10.1055/s-0029-1242458](https://doi.org/10.1055/s-0029-1242458)
6. Arthur JC, Perez-Chanona E. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012;338:120-3.
7. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-10.
8. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5.
9. J.C. Wang Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (2002), pp. 430–440
10. Rich A, Norheim A, Wang AH (1984). "The chemistry and biology of left-handed Z-DNA". *Annual Review of Biochemistry*. 53: 791–846. doi:10.1146/annurev.bi.53.070184.004043. PMID 6383204
11. Sinden, Richard R (1994-01-15). *DNA structure and function (1st ed.)*. Academic Press. p. 398. ISBN 0-12-645750-6
12. Champoux J (2001). "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism". *Annu Rev Biochem*. 70: 369–413. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.369. PMID 113954
13. Chu W.K., Hickson I.D. RecQ helicases: Multifunctional genome caretakers. *Nat. Rev. Cancer*. 2009;9:644–654. doi: 10.1038/nrc2682. [PubMed]
14. Pommier Y. Drugging topoisomerases: Lessons and challenges. *ACS Chem. Biol.* 2013;8:82–95. doi: 10.1021/cb300648v [PubMed]
15. A. Khobta, F. Ferri, L. Lotito, A. Montecucco, R. Rossi, G. Capranico Early effects of topoisomerase I inhibition on RNA polymerase II along transcribed genes in human cells *J Mol Biol*, 357 (2006), pp. 127–138

16. F. Rossi, E. Labourier, T. Forne, G. Divita, J. Derancourt, J.F. Riou, et al. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I *Nature*, 381 (1996), pp. 80–82
17. Patel, Abhijit A.; [Joan A. Steitz](#) (December 2003). "[Splicing double: insights from the second spliceosome](#)". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4 (12): 960–970. doi:10.1038/nrm1259. ISSN 1471-0072. PMID 14685174. Retrieved 2013-07-24
18. Abdurashidova G., Radulescu S., Sandoval O. Functional interactions of DNA topoisomerases with a human replication origin. *EMBO J*. 2007;26:998–1009. doi: 10.1038/sj.emboj.7601578. [[PubMed](#)]
19. Merino A., Madden K.R., Lane W.S., Champoux J.J., Reinberg D. DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature*. 1993;365:227–232. doi: 10.1038/365227a0. [[PubMed](#)]
20. Kharbanda S., Rubin E., Gunji H., Hinz H., Giovanella B., Pantazis P., Kufe D. Camptothecin and its derivatives induce expression of the c-Jun protooncogene in human myeloid leukemia cells. *Cancer Res*. 1991;51:6636–6642. [[PubMed](#)]
21. Zhang H., Zhang Y.W., Yasukawa T., Dalla Rosa I., Khiati S., Pommier Y. Increased negative supercoiling of mtDNA in TOP1mt knockout mice and presence of topoisomerases IIalpha and IIbeta in vertebrate mitochondria. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:7259–7267. doi: 10.1093/nar/gku384.
22. El-Khamisy SF, Saifi GM, Weinfeld M, Johansson F, Helleday T, Lupski JR, Caldecott KW. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature*. 2005;434:108–113. [[PubMed](#)]
23. Zhang YW, Regairaz M, Seiler JA, Agama KK, Doroshow JH, Pommier Y. Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2011;39 (9):3607–3620. [[PubMed](#)]
24. Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, Mendonca P, Costa M, Barros J, Yanagisawa T, Watanabe M, Ikeda Y, Aoki M, Nagata T, Coutinho P, Sequeiros J, Koenig M. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet*. 2001;29 (2):189–193. [[PubMed](#)]
25. El-Khamisy SF, Katyal S, Patel P, Ju L, McKinnon PJ, Caldecott KW. Synergistic decrease of DNA single-strand break repair rates in mouse neural cells lacking both Tdp1 and aprataxin. *DNA Repair (Amst)* 2009;8:760–766 [[PubMed](#)]
26. B.B. Das, S. Antony, S. Gupta, T.S. Dexheimer, C.E. Redon, S. Garfield, et al. Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK *EMBO J*, 28 (2009), pp. 3667–3680
27. Y. Shiloh, G. Rotman Ataxia-telangiectasia and the ATM gene: linking neurodegeneration, immunodeficiency, and cancer to cell cycle checkpoints *J Clin Immunol*, 16 (1996), pp. 254–260
28. H. Takashima, C.F. Boerkoel, J. John, G.M. Saifi, M.A. Salih, D. Armstrong, et al. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy *Nat Genet*, 32 (2002), pp. 267–272

29. P.Q. Hu, N. Fertig, T.A. Medsger Jr., T.M. Wright
Molecular recognition patterns of serum anti-DNA topoisomerase I antibody in systemic sclerosis *J Immunol*, 173 (2004), pp. 2834–2841
30. L. Chung, P.J. Utz Antibodies in scleroderma: direct pathogenicity and phenotypic associations *Curr Rheumatol Rep*, 6 (2004), pp. 156–163
31. G.R. Harvey, A.L. Rands, N.J. McHugh Anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis (SSc): association with anti-topoisomerase I antibodies and identification of autoreactive subunits of RNA polymerase II
Clin Exp Immunol, 105 (1996), pp. 468–474
32. I.F. King, C.N. Yandava, A.M. Mabb, J.S. Hsiao, H.S. Huang, B.L. Pearson, et al.
Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism *Nature*, 501 (2013), pp. 58–62
33. H.S. Huang, J.A. Allen, A.M. Mabb, I.F. King, J. Miriyala, B. Taylor-Blake, et al.
Topoisomerase inhibitors unsilence the dormant allele of Ube3a in neurons *Nature*, 481 (2012), pp. 185–189
34. S. Solier, M.C. Ryan, S.E. Martin, S. Varma, K.W. Kohn, H. Liu, et al.
Transcription poisoning by topoisomerase I is controlled by gene length, splice sites, and miR-142-3p *Cancer Res*, 73 (2013), pp. 4830–4839
35. Y.H. Hsiang, L.F. Liu Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin
Cancer Res, 48 (1988), pp. 1722–1726
36. J. Stenvang, I. Kumler, S.B. Nygard, D.H. Smith, D. Nielsen, N. Brunner, et al.
Biomarker-guided repurposing of chemotherapeutic drugs for cancer therapy: a novel strategy in drug development *Front Oncol*, 3 (2013), p. 313
37. J. Garst Safety of topotecan in the treatment of recurrent small-cell lung cancer and ovarian cancer *Expert Opin Drug Saf*, 6 (2007), pp. 53–62
38. S. Tuduri, L. Crabbe, C. Conti, H. Tourriere, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, et al.
Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription *Nat Cell Biol*, 11 (2009), pp. 1315–1324
39. X. Li, J.L. Manley Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability *Cell*, 122 (2005), pp. 365–378
40. J.F. Gui, H. Tronchere, S.D. Chandler, X.D. Fu Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors
Proc Natl Acad Sci U S A, 91 (1994), pp. 10824–10828
41. T. Takahashi, G. Burguiere-Slezak, P.A. Van der Kemp, S. Boiteux
Topoisomerase 1 provokes the formation of short deletions in repeated sequences upon high transcription in *Saccharomyces cerevisiae*
Proc Natl Acad Sci U S A, 108 (2011), pp. 692–697
42. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer*. 2006;6:789–802. doi: 10.1038/nrc1977. [PubMed]
43. Pommier Y. DNA topoisomerase I inhibitors: Chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem. Rev.* 2009;109:2894–2902. doi: 10.1021/cr900097c [PubMed]
44. ClinicalTrials.gov: A service of the U.S. National Institutes of Health. [(accessed on 20 June 2015)]; Available online: <http://www.clinicaltrials.gov>

45. Saulnier M.G., Balasubramanian B.N., Long B.H., Frennesson D.B., Ruediger E., Zimmermann K., Eummer J.T., St. Laurent D.R., Stoffan K.M., Naidu B.N., et al. Discovery of a fluoroindolo[2,3-a]carbazole clinical candidate with broad spectrum antitumor activity in preclinical tumor models superior to the marketed oncology drug, CPT-11. *J. Med. Chem.* 2005;48:2258–2261. doi: 10.1021/jm049090z. [\[PubMed\]](#)
46. Ciomei M., Croci V., Ciavolella A., Ballinari D., Pesenti E. Antitumor efficacy of edotecarin as a single agent and in combination with chemotherapy agents in a xenograft model. *Clin. Cancer Res.* 2006;12:2856–2861. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1859. [\[PubMed\]](#)
47. Dexheimer T.S., Pommier Y. DNA cleavage assay for the identification of topoisomerase I inhibitors. *Nat. Protoc.* 2008;3:1736–1750. doi: 10.1038/nprot.2008.174. [\[PubMed\]](#)
48. Li T.K., Houghton P.J., Desai S.D., Daroui P., Liu A.A., Hars E.S., Ruchelman A.L., LaVoie E.J., Liu L.F. Characterization of ARC-111 as a novel topoisomerase I-targeting anticancer drug. *Cancer Res.* 2003;63:8400–8407. [\[PubMed\]](#)
49. Kurtzberg L.S., Battle T., Rouleau C., Bagley R.G., Agata N., Yao M., Schmid S., Roth S., Crawford J., Krumbholz R., et al. Bone marrow and tumor cell colony-forming units and human tumor xenograft efficacy of noncamptothecin and camptothecin topoisomerase I inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 2008;7:3212–3222. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0568. [\[PubMed\]](#)
50. Pommier Y. Drugging topoisomerases: Lessons and challenges. *ACS Chem. Biol.* 2013;8:82–95. doi: 10.1021/cb300648v. [\[PubMed\]](#)
51. Pommier Y., Cushman M. The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: Update and perspectives. *Mol. Cancer Ther.* 2009;8:1008–1014. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0706. [\[PubMed\]](#)
52. Samol J., Ranson M., Scott E., Macpherson E., Carmichael J., Thomas A., Cassidy J. Safety and tolerability of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, olaparib (AZD2281) in combination with topotecan for the treatment of patients with advanced solid tumors: A phase I study. *Investig. New Drugs.* 2012;30:1493–1500. doi: 10.1007/s10637-011-9682-9. [\[PubMed\]](#)
53. Josse R., Martin S.E., Guha R., Ormanoglu P., Pfister T.D., Reaper P.M., Barnes C.S., Jones J., Charlton P., Pollard J.R., et al. ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res.* 2014;74:6968–6979. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3369. [\[PubMed\]](#)
54. Ransom M., Dennehey B.K., Tyler J.K. Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell.* 2010;140:183–195. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.004. [\[PubMed\]](#)
55. Josse R., Martin S.E., Guha R., Ormanoglu P., Pfister T.D., Reaper P.M., Barnes C.S., Jones J., Charlton P., Pollard J.R., et al. ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res.* 2014;74:6968–6989. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3369. [\[PubMed\]](#)
56. Pearl L.H., Schierz A.C., Ward S.E., Al-Lazikani B., Pearl F.M. Therapeutic opportunities within the DNA damage response. *Nat. Rev. Cancer.* 2015;15:166–180. doi: 10.1038/nrc3891. [\[PubMed\]](#)
57. Farmer H., McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., et al. Targeting the DNA

- repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434:917–921. doi: 10.1038/nature03445. [[PubMed](#)]
58. Gongora C, Vezzio-Vie N, Tuduri S, Denis V, Causse A, Auzanneau C, Collod-Beroud G, Coquelle A, Pasero P, Pourquier P, Martineau P, Del Rio M. New topoisomerase I mutations are associated with resistance to camptothecin. *Mol Cancer*. 2011;10:64. [[PubMed](#)]
59. Hochster H, Liebes L, Speyer J, Sorich J, Taubes B, Oratz R, Wernz J, Chachoua A, Blum RH, Zeleniuch-Jacquotte A. Effect of prolonged topotecan infusion on topoisomerase 1 levels: a phase I and pharmacodynamic study. *Clin Cancer Res*. 1997;3:1245–1252. [[PubMed](#)]
60. Horisberger K, Erben P, Muessle B, Woernle C, Stroebel P, Kaehler G, Wenz F, Hochhaus A, Post S, Willeke F, Hofheinz RD. Topoisomerase I expression correlates to response to neoadjuvant irinotecan-based chemoradiation in rectal cancer. *Anticancer Drugs*. 2009;20:519–524. [[PubMed](#)]
61. Braun MS, Richman SD, Quirke P, Daly C, Adlard JW, Elliott F, Barrett JH, Selby P, Meade AM, Stephens RJ, Parmar MK, Seymour MT. Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2008;26:2690–2698. [[PubMed](#)]
62. Koopman M, Antonini NF, Douma J. Sequential vs combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370 (9582):135–142. [[PubMed](#)]
63. Hoskins JM, Marcuello E, Altes A, Marsh S, Maxwell T, Van Booven DJ, Pare L, Culverhouse R, McLeod HL, Baiget M. Irinotecan pharmacogenetics: influence of pharmacodynamic genes. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1788–1796. [[PubMed](#)]
64. Yu J, Shannon WD, Watson MA, McLeod HL. Gene expression profiling of the irinotecan pathway in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2053–2062. [[PubMed](#)]
65. El-Khamisy SF, Hartsuiker E, Caldecott KW. TDP1 facilitates repair of ionizing radiation-induced DNA single-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2007;6:1485–1495. [[PubMed](#)]
66. Katyal S, el-Khamisy SF, Russell HR, Li Y, Ju L, Caldecott KW, McKinnon PJ. TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective *in vivo*. *EMBO J*. 2007;26:4720–4731. [[PubMed](#)]
67. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C, Aranes MJ, Lesser M, Schwartz EL, Augenlicht LH. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res*. 2003;63:8791–8812. [[PubMed](#)]
68. Dopeso H, Mateo-Lozano S, Elez E, Landolfi S, Ramos Pascual FJ, Hernandez-Losa J, Mazzolini R, Rodrigues P, Bazzocco S, Carreras MJ, Espin E, Armengol M, Wilson AJ, Mariadason JM, Ramon YCS, Tabernero J, Schwartz S, Jr, Arango D. Aprataxin tumor levels predict response of colorectal cancer patients to irinotecan-based treatment. *Clin Cancer Res*. 2010;16:2375–2382. [[PubMed](#)]
69. Bertagnoli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, Jewell SD, Mayer RJ, Goldberg RM, Saltz LB, Warren RS, Redston M. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: cancer and

- leukemia group B protocol 89803. *J Clin Oncol.* 2009;27:1814–1821. [\[PubMed\]](#)
70. Caldecott K.W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* 2008;9:619–631. [\[PubMed\]](#)
71. Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R., 3rd, Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 2007;316:1160–1166. doi: 10.1126/science.1140321. [\[PubMed\]](#)
72. Xu Y., Wu X., Her C. hMSH5 facilitates the repair of camptothecin-induced double-strand breaks through an interaction with FANCD1. *J. Biol. Chem.* 2015 doi: 10.1074/jbc.M115.642884. [\[PubMed\]](#)
73. Rao V.A., Fan A.M., Meng L., Doe C.F., North P.S., Hickson I.D., Pommier Y. Phosphorylation of BLM, dissociation from topoisomerase III α , and colocalization with gamma-H2AX after topoisomerase I-induced replication damage. *Mol. Cell Biol.* 2005;25:8925–8937. doi: 10.1128/MCB.25.20.8925-8937.2005. [\[PubMed\]](#)
74. Singh T.R., Bakker S.T., Agarwal S., Jansen M., Grassman E., Godthelp B.C., Ali A.M., Du C.H., Rooimans M.A., Fan Q., et al. Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M. *Blood.* 2009;114:174–180. doi: 10.1182/blood-2009-02-207811. [\[PubMed\]](#)
75. Repair of Topoisomerase I-Mediated DNA Damage Yves Pommier, Juana Barcelo, V. Ashutosh Rao, Christophe Redon Laboratory of Molecular Pharmacology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, DHHS Repair of Topoisomerase I-Mediated DNA Damage (PDF Download Available). Available from: https://www.researchgate.net/publication/6896107_Repair_of_Topoisomerase_I_Mediated_DNA_Damage [accessed May 14, 2017]. Published in final edited form as: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 ; 81: 179–229. doi:10.1016/S0079-6603(06)81005-6
76. Apoptosis: a review of programmed cell death. Elmore S¹. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516.
77. *Molecular Biology of the Cell*, Alberts, sixth edition, part II, p. 1021-1031
78. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646–674. [\[PubMed\]](#)
79. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998;396:643–649. [\[PubMed\]](#)
80. Topoisomerase II α in Chromosome Instability and Personalized Cancer Therapy, *Oncogene.* Author manuscript; available in PMC 2016 Jan 30. Published in final edited form as: *Oncogene.* 2015 Jul 30; 34(31): 4019–4031. Published online 2014 Oct 20. doi: [10.1038/onc.2014.332](https://doi.org/10.1038/onc.2014.332), figure 2
81. Geigl JB, Obenaus AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. Defining 'chromosomal instability'. *Trends Genet.* 2008;24:64–69. [\[PubMed\]](#)
82. Topoisomerase II α in Chromosome Instability and Personalized Cancer Therapy, *Oncogene.* Author manuscript; available in PMC 2016 Jan 30. Published in final edited form as: *Oncogene.* 2015 Jul 30; 34(31): 4019–4031. Published online 2014 Oct 20. doi: [10.1038/onc.2014.332](https://doi.org/10.1038/onc.2014.332), figure 1

83. Michor F, Iwasa Y, Vogelstein B, Lengauer C, Nowak MA. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? *Semin Cancer Biol.* 2005;15:43–49. [PubMed]
84. Chen J, Fu L, Zhang LY, Kwong DL, Yan L, Guan XY. Tumor suppressor genes on frequently deleted chromosome 3p in nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer.* 2012;31(5):215–222. [PubMed]
85. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:773–785. [PubMed]
86. Duijf PH, Benezra R. The cancer biology of whole-chromosome instability. *Oncogene.* 2013;32:4727–4736. [PubMed]
87. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, et al. Chromosomal instability (CIN) phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30:2256–2264. [PubMed]
88. Wang X. Discovery of molecular associations among aging, stem cells, and cancer based on gene expression profiling. *Chin J Cancer.* 2013;32:155–161. [PubMed]
89. Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* 2002;9:931–943. [PubMed]
90. Topoisomerase II α in Chromosome Instability and Personalized Cancer Therapy, *Oncogene*. Author manuscript; available in PMC 2016 Jan 30. Published in final edited form as: *Oncogene.* 2015 Jul 30; 34(31): 4019–4031. Published online 2014 Oct 20. doi: [10.1038/onc.2014.332](https://doi.org/10.1038/onc.2014.332), table 1
91. Wang JD, Levin PA (November 2009). "Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle". *Nature Reviews. Microbiology.* 7 (11): 822–7. doi:[10.1038/nrmicro2202](https://doi.org/10.1038/nrmicro2202). [PMC 2887316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19806155/) . [PMID 19806155](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19806155/).
92. *Maton A, Lahart D, Hopkins J, Warner MQ, Johnson S, Wright JD (1997). Cells: Building Blocks of Life. New Jersey: Prentice Hall. pp. 70–4. ISBN 0-13-423476-6*
93. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (December 1998). "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization". *Molecular Biology of the Cell.* 9 (12): 3273–97. doi:[10.1091/mbc.9.12.3273](https://doi.org/10.1091/mbc.9.12.3273). [PMC 25624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9843569/) . [PMID 9843569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9843569/)
94. Robbins SL, Cotran RS (2004). Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds. *Pathological Basis of Disease. Elsevier. ISBN 81-8147-528-3.*
95. Mahmoudi M, Azadmanesh K, Shokrgozar MA, Journeay WS, Laurent S (May 2011). "Effect of nanoparticles on the cell life cycle". *Chemical Reviews.* 111 (5): 3407–32. doi:[10.1021/cr1003166](https://doi.org/10.1021/cr1003166). [PMID 21401073](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21401073/)
96. Mitosis picture Wikipedia
97. <http://photodentro.edu.gr/lor/r/8521/6238>, web
98. *Molecular Biology of the Cell*, Alberts, sixth edition, part II, p. 1010-1016
99. McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat. Res.* 2007;623:83–97. [PubMed]
100. Dewese JE, Osheroff N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:738–748
101. Liu Z, Deibler RW, Chan HS, Zechiedrich L. The why and how of DNA unlinking. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:661–671. [PubMed]
102. McClendon AK, Gentry AC, Dickey JS, Brinch M, Bendtsen S, Andersen AH, Osheroff N. Bimodal recognition of DNA geometry by human topoisomerase

- II α : preferential relaxation of positively supercoiled DNA requires elements in the C-terminal domain. *Biochemistry*. 2008;47:13169–13178. [\[PubMed\]](#)
103. Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH. Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ.* 1991;2:209–214. [\[PubMed\]](#)
104. Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F, Mielke C. Dynamics of human DNA topoisomerases II α and II β in living cells. *J. Cell Biol.* 2002;157:31–44. [\[PubMed\]](#)
105. Gentry AC. In: *DNA Topoisomerases: Type II*, in *The Encyclopedia of Biological Chemistry*. Lennarz WJ, a LMD, editors. Waltham, MA: Academic Press; 2013. pp. 163–168.
106. Austin CA, Marsh KL. Eukaryotic DNA topoisomerase II β *Bioessays*. 1998;20:215–226. [\[PubMed\]](#)
107. Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F, Mielke C. Dynamics of human DNA topoisomerases II α and II β in living cells. *J. Cell Biol.* 2002;157:31–44. [\[PubMed\]](#)
108. Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science*. 2006;312:1798–1802. [\[PubMed\]](#)
109. Cowell IG, Sondka Z, Smith K, Lee KC, Manville CM, Sidorczuk-Lesthurge M, Rance HA, Padgett K, Jackson GH, Adachi N, Austin CA. Model for MLL translocations in therapy-related leukemia involving topoisomerase II β -mediated DNA strand breaks and gene proximity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109:8989–8994. [\[PubMed\]](#)
110. Schmidt BH, Burgin AB, Deweese JE, Osheroff N, Berger JM. A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases. *Nature*. 2010;465:641–644 [\[PubMed\]](#)
111. Schmidt BH, Osheroff N, Berger JM. Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012;19:1147–1154. [\[PubMed\]](#)
112. Lee S, Jung SR, Heo K, Byl JA, Deweese JE, Osheroff N, Hohng S. DNA cleavage and opening reactions of human topoisomerase II α are regulated via Mg²⁺-mediated dynamic bending of gate-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109:2925–2930. [\[PubMed\]](#)
113. Sander M, Hsieh T. Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 1983;258:8421–8428. [\[PubMed\]](#)
114. Zechiedrich EL, Christiansen K, Andersen AH, Westergaard O, Osheroff N. Double-stranded DNA cleavage/re-ligation reaction of eukaryotic topoisomerase II: evidence for a nicked DNA intermediate. *Biochemistry*. 1989;28:6229–6236. [\[PubMed\]](#)
115. Schoeffler AJ, Berger JM. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q. Rev. Biophys.* 2008;41:41–101. [\[PubMed\]](#)
116. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2009;9:338–350 [\[PubMed\]](#)

117. Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem. Biol.* 2013;8:82–95 [PubMed]
118. Topoisomerase II and leukemia, *Ann N Y Acad Sci*. Author manuscript; available in PMC 2015 Mar 1. Published in final edited form as: *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Mar; 1310(1): 98–110. Published online 2014 Feb 3. doi: [10.1111/nyas.12358](https://doi.org/10.1111/nyas.12358), figure 1
119. Pommier Y, Marchand C. Interfacial inhibitors of protein-nucleic acid interactions. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents.* 2005;5:421–429. [PubMed]
120. Deweese JE, Osheroff MA, Osheroff N. DNA topology and topoisomerases: teaching a “knotty” subject. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2008;37:2–10. [PubMed]
121. Pommier Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem. Rev.* 2009;109:2894–2902. [PubMed]
122. Joannides M, Grimwade D. Molecular biology of therapy-related leukaemias. *Clin. Transl. Oncol.* 2010;12:8–14. [PubMed]
123. Cowell IG, Austin CA. Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2012;9:2075–2091. [PubMed]
124. Rashidi A, Fisher SI. Therapy-related acute promyelocytic leukemia: a systematic review. *Med. Oncol.* 2013;30:625. [PubMed]
125. Pommier Y, Marchand C. Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012;11:25–36. [PubMed]
126. Wu CC, Li TK, Farh L, Lin LY, Lin TS, Yu YJ, Yen TJ, Chiang CW, Chan NL. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science.* 2011;333:459–462. [PubMed]
127. Wang H, Mao Y, Chen AY, Zhou N, LaVoie EJ, Liu LF. Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA damage via a mechanism involving protein thiolation. *Biochemistry.* 2001;40:3316–3323. [PubMed]
128. Bender RP, Lehmler HJ, Robertson LW, Ludewig G, Osheroff N. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites poison human topoisomerase II α : altering enzyme function by blocking the N-terminal protein gate. *Biochemistry.* 2006;45:10140–10152. [PubMed]
129. Bender RP, Osheroff N. Mutation of cysteine residue 455 to alanine in human topoisomerase II α confers hypersensitivity to quinones: enhancing DNA scission by closing the N-terminal protein gate. *Chem. Res. Toxicol.* 2007;20:975–981. [PubMed]
130. Lin RK, Zhou N, Lyu YL, Tsai YC, Lu CH, Kerrigan J, Chen YT, Guan Z, Hsieh TS, Liu LF. Dietary isothiocyanate-induced apoptosis *via* thiol modification of DNA topoisomerase II α . *J. Biol. Chem.* 2011;286:33591–33600. [PubMed]
131. Errington F, Willmore E, Tilby MJ, Li L, Li G, Li W, Baguley BC, Austin CA. Murine transgenic cells lacking DNA topoisomerase II β are resistant to acridines and mitoxantrone: analysis of cytotoxicity and cleavable complex formation. *Mol. Pharmacol.* 1999;56:1309–1316. [PubMed]
132. Lopez-Lazaro M, Willmore E, Austin CA. Cells lacking DNA topoisomerase II β are resistant to genistein. *J. Nat. Prod.* 2007;70:763–767. [PubMed]
133. Toyoda E, Kagaya S, Cowell IG, Kurosawa A, Kamoshita K, Nishikawa K, Iizumi S, Koyama H, Austin CA, Adachi N. NK314, a topoisomerase II

- inhibitor that specifically targets the alpha isoform. *J. Biol. Chem.* 2008;283:23711–23720. [[PubMed](#)]
134. Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;53:2231–2247. [[PubMed](#)]
 135. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 1998;339:900–905. [[PubMed](#)]
 136. Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, Doroshow J, Epstein S. A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin. Oncol.* 1983;10:53–55. [[PubMed](#)]
 137. Deming PB, Cistulli CA, Zhao H, Graves PR, Piwnicka-Worms H, Paules RS, et al. The human decatenation checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:12044–12049. [[PubMed](#)]
 138. Downes CS, Clarke DJ, Mullinger AM, Giménez-Abián JF, Creighton AM, Johnson RT. A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature.* 1994;372:467–470. [[PubMed](#)]
 139. Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell.* 1997;88:315–321. [[PubMed](#)]
 140. Wang LH, Schwarzbraun T, Speicher MR, Nigg EA. Persistence of DNA threads in human anaphase cells suggests late completion of sister chromatid decatenation. *Chromosoma.* 2008;117:123–135. [[PubMed](#)]
 141. Kallio M, Lahdetie J. Effects of DNA topoisomerase inhibitor merbarone in male mouse meiotic divisions in vivo: cell cycle arrest and induction of aneuploidy. *Environ Mol Mutagen.* 1997;29:16–27. [[PubMed](#)]
 142. Roca J, Ishida R, Berger JM, Andoh T, Wang JC. Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:1781–1785. [[PubMed](#)]
 143. Hasinoff BB, Abram ME, Barnabé N, Khélifa T, Allan WP, Yalowich JC. The catalytic DNA topoisomerase II inhibitor dexrazoxane (ICRF-187) induces differentiation and apoptosis in human leukemia K562 cells. *Mol Pharmacol.* 2001;59:453–461. [[PubMed](#)]
 144. Akimitsu N, Adachi N, Hirai H, Hossain MS, Hamamoto H, Kobayashi M, et al. Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic cells depleting the activity of DNA topoisomerase II α . *Genes Cells.* 2003;8:393–402. [[PubMed](#)]
 145. Ferguson LR, Whiteside G, Holdaway KM, Baguley BC. Application of fluorescence in situ hybridization to study the relationship between cytotoxicity, chromosome aberration, and changes in chromosome number after treatment with the topoisomerase II inhibitor amsacrine. *Environ Mol Mutagen.* 1998;27:255–262. [[PubMed](#)]
 146. Holm C. Coming undone: how to untangle a chromosome. *Cell.* 1994;77:955–957. [[PubMed](#)]
 147. Carpenter AJ, Porter AC. Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase II α mutant human cell line. *Mol Biol Cell.* 2004;15:5700–5711. [[PubMed](#)]
 148. Johnson M, Phua HH, Bennett SC, Spence JM, Farr CJ. Studying vertebrate topoisomerase 2 function using a conditional knockdown system in DT40 cells. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e98. [[PubMed](#)]

149. Chang CJ, Goulding S, Earnshaw WC, Carmena M. RNAi analysis reveals an unexpected role for topoisomerase II in chromosome arm congression to a metaphase plate. *J Cell Sci.* 2003;116:4715–26. [\[PubMed\]](#)
150. Sandri MI, Isaacs RJ, Ongkeko WM, Harris AL, Hickson ID, Broggin M, et al. p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase IIalpha gene. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:4464–4470 [\[PubMed\]](#)
151. Liu D, Huang CL, Kameyama K, Hayashi E, Yamauchi A, Sumitomo S, et al. Topoisomerase IIalpha gene expression is regulated by the p53 tumor suppressor gene in nonsmall cell lung carcinoma patients. *Cancer.* 2002;94:2239–47. [\[PubMed\]](#)
152. Belluti S, Basile V, Benatti P, Ferrari E, Marverti G, Imbriano C. Concurrent inhibition of enzymatic activity and NF- κ B-mediated transcription of Topoisomerase-II α by bis-DemethoxyCurcumin in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2013;4:e756. [\[PubMed\]](#)
153. Stros M, Polanská E, Struncová S, Pospíšilová S. HMGB1 and HMGB2 proteins up-regulate cellular expression of human topoisomerase IIalpha. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:2070–2086. [\[PubMed\]](#)
154. Williams AO, Isaacs RJ, Stowell KM. Down-regulation of human topoisomerase IIalpha expression correlates with relative amounts of specificity factors Sp1 and Sp3 bound at proximal and distal promoter regions. *BMC Mol Biol.* 2007;8:36. [\[PubMed\]](#)
155. Mo YY, Wang Q, Beck WT. Down-regulation of topoisomerase IIalpha in CEM cells selected for merbarone resistance is associated with reduced expression of Sp3. *Cancer Res.* 1997;57:5004–8. [\[PubMed\]](#)
156. Ishida R, Iwai M, Marsh KL, Austin CA, Yano T, Shibata M, et al. Threonine 1342 in human topoisomerase IIalpha is phosphorylated throughout the cell cycle. *J Biol Chem.* 1996;271:30077–30082. [\[PubMed\]](#)
157. Daum JR, Gorbsky GJ. Casein kinase II catalyzes a mitotic phosphorylation on threonine 1342 of human DNA topoisomerase IIalpha, which is recognized by the 3F3/2 phosphoepitope antibody. *J Biol Chem.* 1998;273:30622–30629. [\[PubMed\]](#)
158. Redwood C, Davies SL, Wells NJ, Fry AM, Hickson ID. Casein kinase II stabilizes the activity of human topoisomerase II α in a phosphorylation-independent manner. *J Biol Chem.* 1998;273:3635–3642. [\[PubMed\]](#)
159. Luo K, Yuan J, Chen J, Lou Z. Topoisomerase IIalpha controls the decatenation checkpoint. *Nat Cell Biol.* 2009;11:204–210. [\[PubMed\]](#)
160. Chikamori K, Grabowski DR, Kinter M, Willard BB, Yadav S, Aebbersold RH, et al. Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem.* 2003;278:12696–12702. [\[PubMed\]](#)
161. Sahyoun N, Wolf M, Besterman J, Hsieh T, Sander M, LeVine H, 3rd, et al. Protein kinase C phosphorylates topoisomerase II: topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester-induced differentiation of HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986;83:1603–1607. [\[PubMed\]](#)
162. Qi X, Hou S, Lepp A, Li R, Basir Z, Lou Z, Chen G. Phosphorylation and stabilization of topoisomerase I α protein by p38 γ mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poisons. *J Biol Chem.* 2011;286:35883–35890. [\[PubMed\]](#)
163. Ganapathi RN, Ganapathi MK. Mechanisms regulating resistance to inhibitors of topoisomerase II. *Front Pharmacol.* 2013;4:89. [\[PubMed\]](#)

164. Yang D, Khan S, Sun Y, Hess K, Shmulevich I, Sood AK, et al. Association of BRCA1 and BRCA2 mutations with survival, chemotherapy sensitivity, and gene mutator phenotype in patients with ovarian cancer. *JAMA*. 2011;306:1557–1565. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
165. Xu X, Qiao W, Linke SP, Cao L, Li WM, Furth PA, et al. Genetic interactions between tumor suppressors Brca1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nat Genet*. 2001;28:266–271. [[PubMed](#)]
166. Xu X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, et al. Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat Genet*. 1999;22:37–43. [[PubMed](#)]
167. Lou Z, Minter-Dykhouse K, Chen J. BRCA1 participates in DNA decatenation. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12:589–593. [[PubMed](#)]
168. Gilmore PM, Quinn JE, Mullan PB, Andrews HN, McCabe N, Carty M, et al. Role played by BRCA1 in regulating the cellular response to stress. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:257–262. [[PubMed](#)]
169. Azuma Y, Arnaoutov A, Dasso M. SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol*. 2003;163:477–487. [[PubMed](#)]
170. Diaz-Martinez LA, Gimenez-Abian JF, Azuma Y, Guacci V, Gimenez-Martin G, Lanier LM, et al. PIASgamma is required for faithful chromosome segregation in human cells. *PLoS One*. 2006;1:e53. [[PubMed](#)]
171. Obado SO, Bot C, Echeverry MC, Bayona JC, Alvarez VE, Taylor MC, et al. Centromere-associated topoisomerase activity in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:1023–1033. [[PubMed](#)]
172. Azuma Y. Analysis of SUMOylation of topoisomerase IIalpha with *Xenopus* egg extracts. *Methods Mol Biol*. 2009;582:221–231.
173. Takahashi Y, Yong-Gonzalez V, Kikuchi Y, Strunnikov A. SIZ1/SIZ2 control of chromosome transmission fidelity is mediated by the sumoylation of topoisomerase II. *Genetics*. 2006;172:783–794. [[PubMed](#)]
174. Díaz-Martínez LA, Giménez-Abián JF, Azuma Y, Guacci V, Giménez-Martín G, Lanier LM, et al. PIASgamma is required for faithful chromosome segregation in human cells. *PLoS One*. 2006;1:e53. [[PubMed](#)]
175. Dawlaty MM, Malureanu L, Jeganathan KB, Kao E, Sustmann C, Tahk S, et al. Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha. *Cell*. 2008;133:103–115. [[PubMed](#)]
176. Tsai SC, Valkov N, Yang WM, Gump J, Sullivan D, Seto E. Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat Genet*. 2000;26:349–353. [[PubMed](#)]
177. Meng H, Chen R, Li W, Xu L, Xu L. Correlations of TOP2A gene aberrations and expression of topoisomerase II α protein and TOP2A mRNA expression in primary breast cancer: a retrospective study of 86 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Pathol Int*. 2012;62:391–399. [[PubMed](#)]
178. Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol*. 2000;13:542–547. [[PubMed](#)]
179. Lan J, Huang HY, Lee SW, Chen TJ, Tai HC, Hsu HP, et al. [[PubMed](#)]
180. Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;39:288–297. [[PubMed](#)]

181. Bhargava R, Lal P, Chen B. HER-2/neu and topoisomerase II α gene amplification and protein expression in invasive breast carcinomas: chromogenic in situ hybridization and immunohistochemical analyses. *Am J Clin Pathol.* 2005;123:889–895. [PubMed]
182. Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet.* 1995;9:444–450. [PubMed]
183. Lee WY, Jin YT, Chang TW, Lin PW, Su IJ. Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopathology.* 1999;34:106–112. [PubMed]
184. Seery LT, Knowlden JM, Gee JM, Robertson JF, Kenny FS, Ellis IO, Nicholson RI. BRCA1 expression levels predict distant metastasis of sporadic breast cancers. *Int J Cancer.* 1999;84:258–262. [PubMed]
185. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1117–1130. [PubMed]
186. Lynch HT, Deters CA, Snyder CL, Lynch JF, Villeneuve P, Silberstein J, et al. BRCA1 and pancreatic cancer: pedigree findings and their causal relationships. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;158:119–125. [PubMed]
187. Gunduz E, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder L, Demircan K, Tamamura R, et al. Epigenetic alterations of BRG1 leads to cancer development through its nuclear-cytoplasmic shuttling abnormalities. *Med Hypotheses.* 2006;67:1313–1316. [PubMed]
188. Reisman DN, Sciarrotta J, Wang W, Funkhouser WK, Weissman BE. Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res.* 2003;63:560–566. [PubMed]
189. Glaros S, Cirrincione GM, Palanca A, Metzger D, Reisman D. Targeted knockout of BRG1 potentiates lung cancer development. *Cancer Res.* 2008;68:3689–3696. [PubMed]
190. Varga-Weisz PD, Wilm M, Bonte E, Dumas K, Mann M, Becker PB. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature.* 1997;388:598–602. [PubMed]
191. Dykhuizen EC, Hargreaves DC, Miller EL, Cui K, Korshunov A, Kool M, et al. BAF complexes facilitate decatenation of DNA by topoisomerase II α . *Nature.* 2013;497:624–627. [PubMed]
192. Luo K, Yuan J, Chen J, Lou Z. Topoisomerase II α controls the decatenation checkpoint. *Nat Cell Biol.* 2009;11:204–210. [PubMed]
193. Bower JJ, Karaca GF, Zhou Y, Simpson DA, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK. Topoisomerase II α maintains genomic stability through decatenation G(2) checkpoint signaling. *Oncogene.* 2010;29:4787–4799. [PubMed]
194. Hande KR. Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics.* 2008;3(1):13–26.
195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4404185/figure/F5/>
196. Liu D, Huang CL, Kameyama K, Hayashi E, Yamauchi A, Sumitomo S, et al. Topoisomerase II α gene expression is regulated by the p53 tumor suppressor gene in nonsmall cell lung carcinoma patients. *Cancer.* 2002;94:2239–47. [PubMed]

197. Wang H, Jiang Zg, Wong YW, Dalton WS, Futscher BW, Chan VT. Decreased CP-1 (NF-Y) activity results in transcriptional down-regulation of topoisomerase IIalpha in a doxorubicin-resistant variant of human multiple myeloma RPMI 8226. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237:217–224. [[PubMed](#)]
198. Chikamori K, Grabowski DR, Kinter M, Willard BB, Yadav S, Aebersold RH, et al. Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem.* 2003;278:12696–12702. [[PubMed](#)]
199. Kolb RH, Greer PM, Cao PT, Cowan KH, Yan Y. ERK1/2 signaling plays an important role in topoisomerase II poison-induced G2/M checkpoint activation. *PLoS One.* 2012;7:e50281. [[PubMed](#)]
200. Iida M, Matsuda M, Komatani H. Plk3 phosphorylates topoisomerase I alpha at Thr(1342), a site that is not recognized by Plk1. *Biochem J.* 2008;411:27–32. [[PubMed](#)]
201. Kennedy RD, Gorski JJ, Quinn JE, Stewart GE, James CR, Moore S, et al. BRCA1 and c-Myc associate to transcriptionally repress psoriasin, a DNA damage-inducible gene. *Cancer Res.* 2005;65:10265–10272. [[PubMed](#)]
202. Pedersen-Bjergaard J, Daugaard G, Hansen SW, Philip P, Larsen SO, Rorth M. Increased risk of myelodysplasia and leukaemia after etoposide, cisplatin, and bleomycin for germ-cell tumours. *Lancet.* 1991;338:359–363. [[PubMed](#)]
203. Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 19–3
204. Yan, K.S., Chia, L.A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J.Y., Su, N., Luo, Y., Heils-horn, S.C., Amieva, M.R., et al. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 466–471
205. Munoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., et al. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *EMBO J.* 31, 3079–3091.
206. Buczacki, S.J., Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., and Winton, D.J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* 495, 65–69.
207. van Es, J.H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Nee, A.N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., et al. (2012). Dll1+secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat. Cell Biol.* 14, 1099–1104.
208. Kozar, S., Morrissey, E., Nicholson, A.M., van der Heijden, M., Zecchini, H.I., Kemp, R., Tavare, S., Vermeulen, L., and Winton, D.J. (2013). Continuous clonal labeling reveals small numbers of functional stem cells in intestinal crypts and adenomas. *Cell Stem Cell* 13, 626–633
209. Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., and Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003–1007
210. Jung, P., Sato, T., Merlos-Suarez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H., Gallardo, M., Blasco, M.A., Sancho, E., et al. (2011). Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat. Med.* 17, 1225–1227.

211. Hirata, A., Utikal, J., Yamashita, S., Aoki, H., Watanabe, A., Yamamoto, T., Okano, H., Bardeesy, N., Kunisada, T., Ushijima, T., et al. (2013). Dose-dependent roles for canonical Wnt signalling in de novo crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. *Development* 140, 66–75.
212. Greaves LC, Preston SL, Tadrous PJ, et al. : Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic stem cells, and mutated clones expand by crypt fission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3):714–719, 2006 [[PubMed](#)]
213. Ricci-Vitiani L, Fabrizio E, Palio E, et al. : Colon cancer stem cells. *J Mol Med* 87:1097–1104, 2009 [[PubMed](#)]
214. Nishimura S, Wakabayashi N, Toyoda K, et al. : Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci* 48(8):1523–1529, 2003 [[PubMed](#)]
215. Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, et al. : Candidate markers for stem and early progenitor cells, *Musashi-1* and *Hes1*, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* 535(1–3):131–135, 2003 [[PubMed](#)]
216. Fujimoto K, Beauchamp RD, Whitehead RH: Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology* 123(6):1941–1948, 2002 [[PubMed](#)]
217. Holmberg J, Genander M, Halford MM, et al. : EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 125(6):1151–1163, 2006 [[PubMed](#)]
218. Mishra L, Derynck R, Mishra B: Transforming growth factor-beta signaling in stem cells and cancer. *Science* 310(5745):68–71, 2005 [[PubMed](#)]
219. Barnard JA, Beauchamp RD, Coffey RJ, et al. : Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(5):1578–1582, 1989 [[PubMed](#)]
220. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, et al. : Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both *Dpc4* (*Smad4*) and *Apc* genes. *Cell* 92(5):645–656, 1998 [[PubMed](#)]
221. Sureban SM, May R, George RJ, et al. : Knockdown of RNA binding protein musashi-1 leads to tumor regression in vivo. *Gastroenterology* 134(5):1448–1458, 2008 [[PubMed](#)]
222. Jensen J, Pedersen EE, Galante P, et al. : Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* 24(1):36–44, 2000 [[PubMed](#)]
223. Mills JC, Gordon JI: The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22):12334–12336, 2001 [[PubMed](#)]
224. Garcia MI, Ghiani M, Lefort A, et al. : LGR5 deficiency deregulates Wnt signaling and leads to precocious Paneth cell differentiation in the fetal intestine. *Dev Biol* 331(1):58–67, 2009 [[PubMed](#)]
225. Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611
226. Zhu, L., Gibson, P., Currel, D.S., Tong, Y., Richardson, R.J., Bayazitov, I.T., Poppleton, H., Zakharenko, S., Ellison, D.W., and Gilbertson, R.J. (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457, 603–607

227. Taketo, M.M., and Edelman, W. (2009). Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology* 136, 780–798.
228. Itzkowitz, S.H., and Yio, X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G7–G17
229. Humphries, A., Cereser, B., Gay, L.J., Miller, D.S.J., Das, B., Gutteridge, A., lia, G., Nye, E., Jeffery, R., Poulson, R., et al. (2013). Lineage tracing reveals multipotent stem cells maintain human adenomas and the pattern of clonal expansion in tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E2490–E2499.
230. Vermeulen, L., Morrissey, E., van der Heijden, M., Nicholson, A.M., Sottoriva, A., Buczaccki, S., Kemp, R., Tavare, S., and Winton, D.J. (2013). Defining stem cell dynamics in models of intestinal tumor initiation. *Science* 342, 995–998
231. Sottoriva, A., Vermeulen, L., and Tavare, S. (2011). Modeling evolutionary dynamics of epigenetic mutations in hierarchically organized tumors. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1001132.
232. Schwitalla, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Goktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., et al. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152, 25–38.
233. Westphalen, C.B., Asfaha, S., Hayakawa, Y., Takemoto, Y., Lukin, D.J., Nuber, A.H., Brandtner, A., Setlik, W., Remotti, H., Muley, A., et al. (2014). Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells. *J. Clin. Invest.* 124, 1283–1295.
234. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, et al. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell.* 2009;137(4):623–34.
235. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007;13(28):3784–91
236. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Res.* 2012;5(1):19–27.
237. **Figure 1 Carcinogenesis of colon cancer** Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment Elsa N Garza-Treviño†, Salvador L Said-Fernández and Herminia G Martínez-Rodríguez† Email author
†Contributed equally *Cancer Cell International* 2015 **15**:2
238. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2059–72
239. Shiras A, Chettiar ST, Shepal V, Rajendran G, Prasad GR, Shastry P. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma. *Stem Cells.* 2007;25(6):1478–89.\
240. Wang H, Wu J, Zhang Y, Xue X, Tang D, Yuan Z, et al. Transforming growth factor beta-induced epithelial-mesenchymal transition increases cancer stem-like cells in the PANC-1 cell line. *Oncol Lett.* 2012;3(1):229–33.
241. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis.* 2008;29(4):673–80.

242. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology*. 2000;119(4):921–8.
243. Nakagawa H, Nuovo GJ, Zervos EE, Martin Jr EW, Salovaara R, Aaltonen LA, et al. Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Res*. 2001;61(19):6991–5.
244. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*. 2002;24(1):91–8.
245. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 2009;457(7229):608–11.
246. Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*. 2006;66(9):4553–7.
247. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. : A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445(7123):106–110, 2007 [[PubMed](#)]
248. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. : Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24):10158–10163, 2007 [[PubMed](#)]
249. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. : Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432(7015):396–401, 2004 [[PubMed](#)]
250. Moore N, Lyle S. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. *J Oncol*. 2011;2011:1–11.
251. Feng Y, Dai X, Li X, Wang H, Liu J, Zhang J, et al. EGF signalling pathway regulates colon cancer stem cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif*. 2012;45(5):413–9.
252. Agarwal JR, Matsui W. Multiple myeloma: a paradigm for translation of the cancer stem cell hypothesis. *Anti Cancer Agents Med Chem*. 2010;10(2):116–20.
253. Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, et al. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*. 2009;1(6–7):338–51
254. Edelblum KL, Yan F, Yamaoka T, Polk DB. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(5):413–24.
255. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007;58:267–84.
256. Ashley N, Yeung TM, Bodmer WF. Stem cell differentiation and lumen formation in colorectal cancer cell lines and primary tumors. *Cancer Res*. 2013;73(18):5798–809.
257. Merlos-Suarez A, Barriga FM, Jung P, Iglesias M, Cespedes MV, Rossell D, et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell*. 2011;8(5):511–24.
258. Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, Klein OD, et al. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*. 2011;478(7368):255–9.

259. Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY, et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(2):466–71
260. Panequin J, Joubet D, Hollande F. Intestinal Stem cells: From Homeostasis to Cancer. In: Hayat MA, editor. *Stem Cells and Cancer Stem Cells. Therapeutic Applications in Disease and Injury*. Vol 9. New York, USA: Springer; 2013. p. 219–26
261. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
262. O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 44, 106–110.
264. Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., Benfante, A., Iovino, F., Biffoni, M., Apuzzo, T., Sperduti, I., Volpe, S., Cocorullo, G., et al. (2014). CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell* 14, 34–356.
265. Kreso, A., van Galen, P., Pedley, N.M., Lima-Fernandes, E., Frelin, C., Davis, T., Cao, L., Baiazitov, R., Du, W., Sydorenko, N., et al. (2014). Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nat. Med.* 20, 29–36.
266. Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J.H., Borovski, T., Tuynman, J.B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., et al. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat. Cell Biol.* 12, 468–476
267. O'Brien, C.A., Kreso, A., Ryan, P., Hermans, K.G., Gibson, L., Wang, Y., Tsatsanis, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2012). ID1 and ID3 regulate the self-renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21. *Cancer Cell* 21, 777–792
268. Dieter, S.M., Ball, C.R., Hoffmann, C.M., Nowrouzi, A., Herbst, F., Zavidij, O., Abel, U., Arens, A., Weichert, W., Brand, K., et al. (2011). Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. *Cell Stem Cell* 9, 357–365
269. Massague J, Blain SW, Lo RS: TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103(2):295–309, 2000 [[PubMed](#)]
270. Shi Y, Massague J: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6):685–700, 2003 [[PubMed](#)]
271. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, et al. : SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95(6):779–791, 1998 [[PubMed](#)]
272. Jung B, Doctolero RT, Tajima A, et al. : Loss of activin receptor type 2 protein expression in microsatellite unstable colon cancers. *Gastroenterology* 126(3):654–659, 2004 [[PubMed](#)]
273. Grady WM, Carethers JM: Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135(4):1079–1099, 2008
274. Chow JY, Cabral JA, Chang J, et al. : TGFbeta modulates PTEN expression independently of SMAD signaling for growth proliferation in colon cancer cells. *Cancer Biol Ther* 7(10):1694–1699, 2008 [[PubMed](#)]
275. Ilyas M, Efsthathiou JA, Straub J, et al. : Transforming growth factor beta stimulation of colorectal cancer cell lines: type II receptor bypass and changes in adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6):3087–3091, 1999 [[PubMed](#)]

276. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, et al. : Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 41(3):185–192, 2006 [[PubMed](#)]
277. Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 16(spec. no. 1):R14–R20, 2007 [[PubMed](#)]
278. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, et al. : Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 13(3):343–346, 1996 [[PubMed](#)]
279. Tang Y, Katuri V, Srinivasan R, et al. : Transforming growth factor-beta suppresses nonmetastatic colon cancer through Smad4 and adaptor protein ELF at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res* 65(10):4228–4237, 2005 [[PubMed](#)]
280. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, et al. : arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signaling. *Nature* 407(6803):527–530, 2000 [[PubMed](#)]
281. Espada J, Calvo MB, Diaz-Prado S, et al. : Wnt signaling and cancer stem cells. *Clin Transl Oncol* 11(7):411–427, 2009 [[PubMed](#)]
282. Moon, B.S., Jeong, W.J., Park, J., Kim, T.I., Min, S., and Choi, K.Y. (2014). Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/b-catenin signaling. *J. Natl. Cancer Inst.* 106, djt373.
283. Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., et al. (2014). YAP/TAZ incorporation in the b-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 158, 157–170.
284. Barry, E.R., Morikawa, T., Butler, B.L., Shrestha, K., de la Rosa, R., Yan, K.S., Fuchs, C.S., Magness, S.T., Smits, R., Ogino, S., et al. (2013). Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* 493, 106–110
285. Bartucci, M., Dattilo, R., Moriconi, C., Pagliuca, A., Mottolese, M., Federici, G., Benedetto, A.D., Todaro, M., Stassi, G., Sperati, F., et al. (2014). TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene*, in press. Published online February 17, 2014.
286. Merlos-Sua rez, A., Barriga, F.M., Jung, P., Iglesias, M., Cespedes, M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Munoz, P., et al. (2011). The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell* 8, 511–524.
287. Sekiya T, Adachi S, Kohu K, et al. : Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J Biol Chem* 279(8):6840–6846, 2004 [[PubMed](#)]
288. Sekiya T, Oda T, Matsuura K, et al. : Transcriptional regulation of the TGF-beta pseudoreceptor BAMBI by TGF-beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 320(3):680–684, 2004 [[PubMed](#)]
289. Carethers JM: Intersection of transforming growth factor-beta and Wnt signaling pathways in colorectal cancer and metastasis. *Gastroenterology* 137(1):33–36, 2009 [[PubMed](#)]
290. Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., Kaestner, K.H., Kopan, R., Lewis, J., and Radtke, F. (2011). Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterol.* 140, 1230–1240 e1231–1237.

291. Sikandar, S.S., Pate, K.T., Anderson, S., Dizon, D., Edwards, R.A., Waterman, M.L., and Lipkin, S.M. (2010). NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer. *Cancer Res.* 70, 1469–1478.
292. Hwang, W.L., Jiang, J.K., Yang, S.H., Huang, T.S., Lan, H.Y., Teng, H.W., Yang, C.Y., Tsai, Y.P., Lin, C.H., Wang, H.W., and Yang, M.H. (2014). MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat. Cell Biol.* 16, 268–280
293. Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* 18, 884–901
294. Rothenberg, M.E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J.J., Dalerba, P., Scheeren, F., lobo, N., Kulkarni, S., Sim, S., Qian, D., et al. (2012). Identification of a cKit(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. *Gastroenterol.* 142, 1195–1205 e1196.
295. Lu, J., Ye, X., Fan, F., Xia, L., Bhattacharya, R., Bellister, S., Tozzi, F., Sceusi, E., Zhou, Y., Tachibana, I., et al. (2013). Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* 23, 171–185.
296. Li, H.J., Reinhardt, F., Herschman, H.R., and Weinberg, R.A. (2012). Cancer stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. *Canc. Disc.* 2, 840–855.
297. Kryczek, I., Lin, Y., Nagarsheth, N., Peng, D., Zhao, L., Zhao, E., Vatan, L., Szeliga, W., Dou, Y., Owens, S., et al. (2014). IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* 40, 772–784
298. Lotti, F., Jarrar, A.M., Pai, R.K., Hitomi, M., Lathia, J., Mace, A., Gantt, G.A., Jr. Sukhdeo, K., DeVecchio, J., Vasanji, A., et al. (2013). Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J. Exp. Med.* 210, 2851–2872.
299. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. Pang, R., Law, W.L., Chu, A.C., Poon, J.T., Lam, C.S., Chow, A.K., Ng, L., Cheung, L.W., Lan, X.R., Lan, H.Y. et al. *Cell Stem Cell.* 2010; 6: 603–615
300. Isolation and phenotypic characterization of colorectal cancer stem cells with organ-specific metastatic potential. Gao, W., Chen, L., Ma, Z., Du, Z., Zhao, Z., Hu, Z., and Li, Q. *Gastroenterol.* 2013; 145: 636–646 e635
301. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. Oskarsson, T., Batlle, E., and Massagué, J. *Cell Stem Cell.* 2014; 14: 306–321
302. Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. Zhang, B., Halder, S.K., Kashikar, N.D., Cho, Y.J., Datta, A., Gorden, D.L., and Datta, P.K. *Gastroenterol.* 2010; 138: 969–980
303. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V., Iglesias, M., Céspedes, M.V., Sevillano, M., Nadal, C., Jung, P., Zhang, X.H. et al. *Cancer Cell.* 2012; 22: 571–584
304. Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice. Lombardo, Y., Scopelliti, A., Cammareri, P., Todaro, M., Iovino, F., Ricci-Vitiani, L., Gulotta, G., Dieli, F., de Maria, R., and Stassi, G. *Gastroenterology.* 2011; 140: 297–309

305. Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. Li, X., Nadauld, L., Ootani, A., Corney, D.C., Pai, R.K., Gevaert, O., Cantrell, M.A., Rack, P.G., Neal, J.T., Chan, C.W. et al. *Nat. Med.* 2014; 20: 769–777
306. The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. Kemper, K., Sprick, M.R., de Bree, M., Scopelliti, A., Vermeulen, L., Hoek, M., Zeilstra, J., Pals, S.T., Mehmet, H., Stassi, G., and Medema, J.P. *Cancer Res.* 2010; 70: 719–729
307. CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Chen, S., Song, X., Chen, Z., Li, X., Li, M., Liu, H., and Li, J. *PLoS ONE.* 2013; 8: e56380
308. In situ validation of an intestinal stem cell signature in colorectal cancer. Ziskin, J.L., Dunlap, D., Yaylaoglu, M., Fodor, I.K., Forrest, W.F., Patel, R., Ge, N., Hutchins, G.G., Pine, J.K., Quirke, P. et al. *Gut.* 2013; 62: 1012–1023
309. Common cancer stem cell gene variants predict colon cancer recurrence. Gerger, A., Zhang, W., Yang, D., Bohanes, P., Ning, Y., Winder, T., LaBonte, M.J., Wilson, P.M., Benhaim, L., Paez, D. et al. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 6934–6943
310. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. Todaro, M., Alea, M.P., Di Stefano, A.B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J.P., and Stassi, G. *Cell Stem Cell.* 2007; 1: 389–402
311. DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency. Hoey, T., Yen, W.C., Axelrod, F., Basi, J., Donigian, L., Dylla, S., Fitch-Bruhns, M., Lazetic, S., Park, I.K., Sato, A. et al. *Cell Stem Cell.* 2009; 5: 168–177
312. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, et al. : Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* 12(10):1167–1174, 2006 [[PubMed](#)]
313. Huang EH, Wicha MS: Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy. *Trends Mol Med* 14(11):503–509, 2008
314. Boman BM, Wicha MS, Fields JZ, et al. : Symmetric division of cancer stem cells: a key mechanism in tumor growth that should be targeted in future therapeutic approaches. *Clin Pharmacol Ther* 81(6):893–898, 2007 [[PubMed](#)]
315. Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis.* 2013;4:e532.
316. Wu CP, Calcagno AM, Ambudkar SV. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol.* 2008;1(2):93–105.
317. Chen N, Chen X, Huang R, Zeng H, Gong J, Meng W, et al. BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1{alpha}. *J Biol Chem.* 2009;284(15):10004–12.
318. Flamant L, Notte A, Ninane N, Raes M, Michiels C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol Cancer.* 2010;9:191.

319. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem.* 2004;279(23):24218–25.
320. Raspaglio G, Filippetti F, Prislei S, Penci R, De Maria I, Cicchillitti L, et al. Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1alpha binding to its 3' flanking region. *Gene.* 2008;409(1–2):100–8
321. Wang SJ, Bourguignon LY. Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(7):771–8.
322. Wang MT, Jiang H, Boral D, Nie D. Cancer Stem Cells in Resistance to Cytotoxic Drugs: Implications in Chemotherapy. In: Bonavida B, editor. *Molecular Mechanisms of Tumor Cell Resistant to Chemotherapy. Resistance to Target Anti-Cancer Therapeutics.* Vol 1. New York, USA: Springer; 2013. p. 151–61.
323. Wang SJ, Bourguignon LY. Hyaluronan-CD44 promotes phospholipase C-mediated Ca²⁺ signaling and cisplatin resistance in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(1):19–24.
324. Naujokat C. Targeting Human Cancer Stem Cells with Monoclonal Antibodies. *J Clin Cell Immunol.* 2012;2012:1–15.
325. Li Y, Wicha MS, Schwartz SJ, Sun D. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. *J Nutr Biochem.* 2011;22(9):799–806.
326. Majeti R. Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene.* 2011;30(9):1009–19.
327. Todaro M, Perez Alea M, Scopelliti A, Medema JP, Stassi G. IL-4-mediated drug resistance in colon cancer stem cells. *Cell Cycle.* 2008;7(3):309–13.
328. Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, et al. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells.* 2012;30(12):2631–44.
329. Hoey T, Yen WC, Axelrod F, Basi J, Donigian L, Dylla S, et al. DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency. *Cell Stem Cell.* 2009;5(2):168–77.
330. Logtenberg T. Antibody cocktails: next-generation biopharmaceuticals with improved potency. *Trends Biotechnol.* 2007;25(9):390–4.
331. Reid A, Vidal L, Shaw H, de Bono J. Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu). *Eur J Cancer.* 2007;43(3):481–9
332. Junghanns JU, Muller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(3):295–309
333. Liu C, Zhao G, Liu J, Ma N, Chivukula P, Perelman L, et al. Novel biodegradable lipid nano complex for siRNA delivery significantly improving the chemosensitivity of human colon cancer stem cells to paclitaxel. *J Control Release.* 2009;140(3):277–83.

334. Al-Qubaisi MS, Rasedee A, Flaifel MH, Ahmad SH, Hussein-Al-Ali S, Hussein MZ, et al. Cytotoxicity of nickel zinc ferrite nanoparticles on cancer cells of epithelial origin. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2497–508.
335. Satapathy SR, Mohapatra P, Preet R, Das D, Sarkar B, Choudhuri T, et al. Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53. *Nanomedicine*. 2013;8(8):1307–22.
336. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003;63:1256–1272. [[PubMed](#)]
337. Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*. 1998;273:17299–17302. [[PubMed](#)]
338. Lundstrom K. Latest development in drug discovery on G protein-coupled receptors. *Curr Protein Pept Sci*. 2006;7:465–470. [[PubMed](#)]
339. Chun E, Thompson AA, Liu W, Roth CB, Griffith MT, Katritch V, Kunken J, Xu F, Cherezov V, Hanson MA, Stevens RC. Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure*. 2012;20:967–976. [[PubMed](#)]
340. Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature*. 2012;482:547–551
341. Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 2012;482:552–556.
342. Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494:185–194. [[PubMed](#)]
343. Kaavya Krishna Kumar^{1,2}, Antony W Burgess^{1,3} and Jacqueline M Gulbis^{1,2} Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells *Protein Sci*. 2014 May; 23(5): 551–565. Published online 2014 Mar 19. doi: [10.1002/pro.2446](https://doi.org/10.1002/pro.2446) figure 1
344. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*. 2011;477:549–555.
345. Rosenbaum DM, Zhang C, Lyons JA, Holl R, Aragao D, Arlow DH, Rasmussen SG, Choi HJ, Devree BT, Sunahara RK, Chae PS, Gellman SH, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Caffrey M, Gmeiner P, Kobilka BK. Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature*. 2011;469:236–240
346. Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem*. 1993;268:4625–4636. [[PubMed](#)]

347. Stevens RC, Cherezov V, Katritch V, Abagyan R, Kuhn P, Rosen H, Wuthrich K. The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:25–34
348. Hsu SY, Kudo M, Chen T, Nakabayashi K, Bhalla A, van der Spek PJ, van Duin M, Hsueh AJ. The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Mol Endocrinol.* 2000;14:1257–1271. [\[PubMed\]](#)
349. Kajava AV, Vassart G, Wodak SJ. Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure.* 1995;3:867–877. [\[PubMed\]](#)
350. Van Hiel MB, Vandersmissen HP, Van Loy T, Vanden Broeck J. An evolutionary comparison of leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptors reveals a novel LGR subtype. *Peptides.* 2012;34:193–200. [\[PubMed\]](#)
351. Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ. INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J Biol Chem.* 2002;277:31283–31286. [\[PubMed\]](#)
352. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature.* 2007;449:1003–1007. [\[PubMed\]](#)
353. nippert HJ, Haegebarth A, Kasper M, Jaks V, van Es JH, Barker N, van de Wetering M, van den Born M, Begthel H, Vries RG, Stange DE, Toftgard R, Clevers H. *Lgr6* marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science.* 2010;327:1385–1389. [\[PubMed\]](#)
354. Leushacke M, Barker N. *Lgr5* and *Lgr6* as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer. *Oncogene.* 2012;31:3009–3022. [\[PubMed\]](#)
355. Leedham S. J. *et al.* A basal gradient of Wnt and stem-cell number influences regional tumour distribution in human and mouse intestinal tracts. *Gut* 62, 83–93 (2013). [\[PMC free article\]](#)[\[PubMed\]](#)
356. Ziskin J. L. *et al.* In situ validation of an intestinal stem cell signature in colorectal cancer. *Gut* 62, 1012–23 (2013). [\[PubMed\]](#)
357. Merlos-Suarez A. *et al.* The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell* 8, 511–24 (2011). [\[PubMed\]](#)
358. Schepers A. G. *et al.* Lineage tracing reveals *Lgr5*+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 337, 730–5 (2012). [\[PubMed\]](#)
359. Ritsma L. *et al.* Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. *Nature* 507, 362–5 (2014)
360. Becker L., Huang Q. & Mashimo H. Immunostaining of *Lgr5*, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *ScientificWorldJournal* 8, 1168–76 (2008).[\[PubMed\]](#)
361. Takeda K. *et al.* Expression of *LGR5*, an intestinal stem cell marker, during each stage of colorectal tumorigenesis. *Anticancer Res* 31, 263–70 (2011). [\[PubMed\]](#)
362. Ann-Marie Baker,^{a,1} Trevor A. Graham,¹ George Elia,¹ Nicholas A. Wright,¹ and Manuel Rodriguez-Justo² Characterization of *LGR5* stem cells

- in colorectal adenomas and carcinomas *Sci Rep.* 2015; 5: 8654. Published online 2015 Mar 2. doi: [10.1038/srep08654](https://doi.org/10.1038/srep08654) **figure 2**
363. Ann-Marie Baker,^{a,1} Trevor A. Graham,¹ George Elia,¹ Nicholas A. Wright,¹ and Manuel Rodriguez-Justo² Characterization of LGR5 stem cells in colorectal adenomas and carcinomas *Sci Rep.* 2015; 5: 8654. Published online 2015 Mar 2. doi: [10.1038/srep08654](https://doi.org/10.1038/srep08654)
364. Neumuller RA, Knoblich JA. Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* 2009;23:2675–2699.
365. Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, Barker N, Klein AM, van Rheenen J, Simons BD, Clevers H. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell.* 2010;143:134–144. [[PubMed](#)]
366. Morita H, Mazerbourg S, Bouley DM, Luo CW, Kawamura K, Kuwabara Y, Baribault H, Tian H, Hsueh AJ. Neonatal lethality of LGR5 null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. *Mol Cell Biol.* 2004;24:9736–9743
367. Garcia MI, Ghiani M, Lefort A, Libert F, Strollo S, Vassart G. LGR5 deficiency deregulates Wnt signaling and leads to precocious Paneth cell differentiation in the fetal intestine. *Dev Biol.* 2009;331:58–67. [[PubMed](#)]
368. Walker F, Zhang HH, Odorizzi A, Burgess AW. LGR5 is a negative regulator of tumorigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines. *PLoS One.* 2011;6:e22733. [[PubMed](#)]
369. Barker N, van Es JH, Jaks V, Kasper M, Snippert H, Toftgard R, Clevers H. Very long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles from cycling Lgr5+ve stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008;73:351–356. [[PubMed](#)]
370. Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol.* 2007;27:7551–7559. [[PubMed](#)]
371. Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Battle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR, Winton DJ. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* 2004;18:1385–1390. [[PubMed](#)]
372. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell.* 2002;111:241–250. [[PubMed](#)]
373. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat.* 1974;141:537–561. [[PubMed](#)]
374. Kretzschmar K, Watt FM. Lineage tracing. *Cell.* 2012;148:33–45. [[PubMed](#)]
375. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459:262–265. [[PubMed](#)]
376. Plaks V, Brenot A, Lawson DA, Linnemann JR, Van Kappel EC, Wong KC, de Sauvage F, Klein OD, Werb Z. Lgr5-expressing cells are sufficient and

- necessary for postnatal mammary gland organogenesis. *Cell Rep.* 2013;3:70–78. [[PubMed](#)]
377. Pellettieri J, Sanchez Alvarado A. Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annu Rev Genet.* 2007;41:83–105. [[PubMed](#)]
378. Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG, Grompe M, Clevers H. In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature.* 2013;494:247–250. [[PubMed](#)]
379. Humphries A. *et al.* Lineage tracing reveals multipotent stem cells maintain human adenomas and the pattern of clonal expansion in tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E2490–9 (2013). [[PubMed](#)]
380. Ann-Marie Baker,^{a,1} Trevor A. Graham,¹ George Elia,¹ Nicholas A. Wright,¹ and Manuel Rodriguez-Justo² Characterization of LGR5 stem cells in colorectal adenomas and carcinomas *Sci Rep.* 2015; 5: 8654. Published online 2015 Mar 2. doi: [10.1038/srep08654](https://doi.org/10.1038/srep08654) figure 3
381. Becker L., Huang Q. & Mashimo H. Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *ScientificWorldJournal* 8, 1168–76 (2008). [[PubMed](#)]
382. Fan X. S. *et al.* Expression of Lgr5 in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with beta-catenin. *Int J Colorectal Dis* 25, 583–90 (2010). [[PubMed](#)]
383. Sentani K. *et al.* Expression of olfactomedin 4 and claudin-18 in serrated neoplasia of the colorectum: a characteristic pattern is associated with sessile serrated lesion. *Histopathology* 62, 1018–27 (2013). [[PubMed](#)]
384. Mohammadi M., Bzorek M., Bonde J. H., Nielsen H. J. & Holck S. The stem cell marker CD133 is highly expressed in sessile serrated adenoma and its borderline variant compared with hyperplastic polyp. *J Clin Pathol* 66, 403–8 (2013). [[PubMed](#)]
385. Ann-Marie Baker,^{a,1} Trevor A. Graham,¹ George Elia,¹ Nicholas A. Wright,¹ and Manuel Rodriguez-Justo² Characterization of LGR5 stem cells in colorectal adenomas and carcinomas *Sci Rep.* 2015; 5: 8654. Published online 2015 Mar 2. doi: [10.1038/srep08654](https://doi.org/10.1038/srep08654) figure 6
386. Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:11452–11457. [[PubMed](#)]
387. de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature.* 2011;476:293–297. [[PubMed](#)]
388. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459:262–265. [[PubMed](#)]
389. Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M, Liu Y, Boyle B, Park E, Emtage P, Funk WD, Tomizuka K. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science.* 2005;309:1256–1259. [[PubMed](#)]
390. Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D, Boutros M, Cruciat CM, Niehrs C. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep.* 2011;12:1055–1061. [[PubMed](#)]

391. Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell*. 2004;7:525–534. [PubMed]
392. Kim KA, Wagle M, Tran K, Zhan X, Dixon MA, Liu S, Gros D, Korver W, Yonkovich S, Tomasevic N, Binnerts M, Abo A. R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol Biol Cell*. 2008;19:2588–2596. [PubMed]
393. Kaavya Krishna Kumar,^{1,2} Antony W Burgess,^{1,3} and Jacqueline M Gulbis^{1,2} Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells *Protein Sci*. 2014 May; 23(5): 551–565. Published online 2014 Mar 19. doi: [10.1002/pro.2446](https://doi.org/10.1002/pro.2446) figure 2
394. Xu K, Xu Y, Rajashankar KR, Robev D, Nikolov DB. Crystal structures of Lgr4 and its complex with R-spondin1. *Structure*. 2013;21:1683–1689. [PubMed]
395. Kaavya Krishna Kumar,^{1,2} Antony W Burgess,^{1,3} and Jacqueline M Gulbis^{1,2} Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells *Protein Sci*. 2014 May; 23(5): 551–565. Published online 2014 Mar 19. doi: [10.1002/pro.2446](https://doi.org/10.1002/pro.2446) figure 7
396. Chen PH, Chen X, Lin Z, Fang D, He X. The structural basis of R-spondin recognition by LGR5 and RNF43. *Genes Dev*. 2013;27:1345–1350. [PubMed]
397. Pin JP, Galvez T, Prezeau L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*. 2003;98:325–354. [PubMed]
398. Harikumar KG, Morfis MM, Sexton PM, Miller LJ. Pattern of intra-family hetero-oligomerization involving the G-protein-coupled secretin receptor. *J Mol Neurosci*. 2008;36:279–285. [PubMed]
399. Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, Ghoshdastider U, Debinski A, Filipek S. Action of molecular switches in GPCRs—theoretical and experimental studies. *Curr Med Chem*. 2012;19:1090–1109. [PubMed]
400. Peng WC, de Lau W, Forneris F, Granneman JC, Huch M, Clevers H, Gros P. Structure of stem cell growth factor R-spondin 1 in complex with the ectodomain of its receptor LGR5. *Cell Rep*. 2013;3:1885–1892. [PubMed]
401. Standfuss J, Edwards PC, D'Antona A, Fransen M, Xie G, Oprian DD, Schertler GF. The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature*. 2011;471:656–660. [PubMed]
402. Kwon MS, Park BO, Kim HM, Kim S. Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5/GPR49 activates G12/13-Rho GTPase pathway. *Mol Cells*. 2013;36:267–272. [PubMed]
403. Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW. Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;335:572–579. [PubMed]
404. Kaavya Krishna Kumar,^{1,2} Antony W Burgess,^{1,3} and Jacqueline M Gulbis^{1,2} Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells *Protein Sci*. 2014 May; 23(5): 551–565. Published online 2014 Mar 19. doi: [10.1002/pro.2446](https://doi.org/10.1002/pro.2446) figure 3
405. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*. 2004;131:1663–1677. [PubMed]

406. Burgess AW, Faux MC, Layton MJ, Ramsay RG. Wnt signaling and colon tumorigenesis—a view from the periphery. *Exp Cell Res.* 2011;317:2748–2758. [PubMed]
407. Huang P, Senga T, Hamaguchi M. A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene.* 2007;26:4357–4371. [PubMed]
408. Medrek C, Landberg G, Andersson T, Leandersson K. Wnt-5a-CKI{alpha} signaling promotes {beta}-catenin/E-cadherin complex formation and intercellular adhesion in human breast epithelial cells. *J Biol Chem.* 2009;284:10968–10979. [PubMed]
409. Schulte G, Bryja V. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:518–525. [PubMed]
410. Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a002915. [PubMed]
411. Kaavya Krishna Kumar,^{1,2} Antony W Burgess,^{1,3} and Jacqueline M Gulbis^{1,2} Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells *Protein Sci.* 2014 May; 23(5): 551–565. Published online 2014 Mar 19. doi: [10.1002/pro.2446](https://doi.org/10.1002/pro.2446) figure 4
412. Fafilek B, Krausova M, Vojtechova M, Pospichalova V, Tumova L, Sloncova E, Huranova M, Stancikova J, Hlavata A, Svec J, Sedlacek R, Luksan O, Oliverius M, Voska L, Jirsa M, Paces J, Kolar M, Krivjanska M, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H, Korinek V. Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with lgr5 to inhibit wnt signaling in intestinal stem cells. *Gastroenterology.* 2013;144:381–391. [PubMed]
413. Carmon KS, Lin Q, Gong X, Thomas A, Liu Q. LGR5 interacts and cointernalizes with Wnt receptors to modulate Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol.* 2012;32:2054–2064. [PubMed]
414. Kaavya Krishna Kumar,^{1,2} Antony W Burgess,^{1,3} and Jacqueline M Gulbis^{1,2} Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells *Protein Sci.* 2014 May; 23(5): 551–565. Published online 2014 Mar 19. doi: [10.1002/pro.2446](https://doi.org/10.1002/pro.2446) figure 5
415. Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, Lei H, Mickanin C, Liu D, Ruffner H, Mao X, Ma Q, Zamponi R, Bouwmeester T, Finan PM, Kirschner MW, Porter JA, Serluca FC, Cong F. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature.* 2012;485:195–200. [PubMed]
416. Koo BK, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, van Es JH, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Clevers H. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature.* 2012;488:665–669. [PubMed]
417. Peng WC, de Lau W, Forneris F, Granneman JC, Huch M, Clevers H, Gros P. Structure of stem cell growth factor R-spondin 1 in complex with the ectodomain of its receptor LGR5. *Cell Rep.* 2013;3:1885–1892. [PubMed]
418. Xi H. Q. *et al.* Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 is associated with invasion, metastasis, and could be a potential therapeutic target in human gastric cancer. *Br J Cancer* 110, 2011–20 (2014). [PubMed]
419. Teglund S. & Toftgård R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1805, 181–208 (2010). [PubMed]

420. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337 (2012). [[PubMed](#)]
421. Varnat F. et al. . Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol. Med.* 1, 338–351 (2009). [[PubMed](#)]
422. Büller N. V. J. A., Rosekrans S. L., Westerlund J. & van den Brink G. R. Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in the intestinal epithelium. *Physiology* 27, 148–155 (2012). [[PubMed](#)]
423. Sekulic A. et al. . Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 366, 2171–2179 (2012). [[PubMed](#)]
424. Berlin J. et al. . A randomized phase II trial of vismodegib versus placebo with FOLFOX or FOLFIRI and bevacizumab in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 19, 258–267 (2013). [[PubMed](#)]
425. Herter-Sprie G. S., Kung A. L. & Wong K. -K. New cast for a new era: preclinical cancer drug development revisited. *J. Clin. Invest.* 123, 3639–3645 (2013). [[PubMed](#)]
426. van Dop W. A. et al. . Loss of Indian Hedgehog activates multiple aspects of a wound healing response in the mouse intestine. *Gastroenterology* 139, 1665–1676.e10 (2010). [[PubMed](#)]
427. Büller N. V. J. A. et al. . Stromal Indian hedgehog signaling is required for intestinal adenoma formation in mice. *Gastroenterology* 148, 170–180.e6 (2015). [[PubMed](#)]
428. Kosinski C. et al. . Indian Hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial–mesenchymal interactions during development. *Gastroenterology* 139, 893–903 (2010). [[PubMed](#)]
429. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development.* 1997;124(7):1313–1322. [[PubMed](#)]
430. Yanfei Jia, Yunshan Wang, and Jingwu Xie The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation *Arch Toxicol.* Author manuscript; available in PMC 2016 Feb 1. Published in final edited form as: *Arch Toxicol.* 2015 Feb; 89(2): 179–191.b figure 1
431. Palm W, Swierczynska MM, Kumari V, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Eaton S. Secretion and signaling activities of lipoprotein-associated hedgehog and non-sterol-modified hedgehog in flies and mammals. *PLoS Biol.* 2013;11(3):e1001505. [[PubMed](#)]
432. Caspary T, Garcia-Garcia MJ, Huangfu D, et al. Mouse dispatched homolog is required for long-range, but not juxtacrine, Hh signaling. *Curr Biol.* 2002;12(18):1628–1632. [[PubMed](#)]
433. Dierker T, Dreier R, Petersen A, Bordych C, Grobe K. Heparan sulfate-modulated, metalloprotease-mediated sonic hedgehog release from producing cells. *J Biol Chem.* 2009;284(12):8013–8022. [[PubMed](#)]
434. Beckett K, Franch-Marro X, Vincent JP. Glypican-mediated endocytosis of hedgehog has opposite effects in flies and mice. *Trends Cell Biol.* 2008;18(8):360–363. [[PubMed](#)]
435. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature.* 2002;418(6900):892–897. [[PubMed](#)]

436. Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell*. 2008;14(5):700–711. [\[PubMed\]](#)
437. Yavari A, Nagaraj R, Owusu-Ansah E, et al. Role of lipid metabolism in smoothed derepression in hedgehog signaling. *Dev Cell*. 2010;19(1):54–65. [\[PubMed\]](#)
438. Wang Y, Davidow L, Arvanites AC, et al. Glucocorticoid compounds modify smoothed localization and hedgehog pathway activity. *Chem Biol*. 2012a;19(8):972–982. [\[PubMed\]](#)
439. Zhao Y, Tong C, Jiang J. Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature*. 2007;450(7167):252–258. [\[PubMed\]](#)
440. Li S, Chen Y, Shi Q, Yue T, Wang B, Jiang J. Hedgehog-regulated ubiquitination controls smoothed trafficking and cell surface expression in *Drosophila*. *PLoS Biol*. 2012a;10(1):e1001239. [\[PubMed\]](#)
441. Hoover AN, Wynkoop A, Zeng H, Jia J, Niswander LA, Liu A. C2cd3 is required for cilia formation and Hedgehog signaling in mouse. *Development*. 2008;135(24):4049–4058. [\[PubMed\]](#)
442. Bai Q, Shen Y, Jin N, Liu H, Yao X. Molecular modeling study on the dynamical structural features of human smoothed receptor and binding mechanism of antagonist LY2940680 by metadynamics simulation and free energy calculation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(7):2128–2138. [\[PubMed\]](#)
443. Parker DS, White MA, Ramos AI, Cohen BA, Barolo S. The cis-regulatory logic of Hedgehog gradient responses: key roles for gli binding affinity, competition, and cooperativity. *Science Signal*. 2011;4(176):ra38. [\[PubMed\]](#)
444. Stecca B, Mas C, Clement V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(14):5895–5900. [\[PubMed\]](#)
445. Sheng T, Chi S, Zhang X, Xie J. Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal. *J Biol Chem*. 2006;281(1):9–12. [\[PubMed\]](#)
446. Han L, Pan Y, Wang B. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification inhibits GLI2 protein transcriptional activity *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*. 2012;287(24):20483–20489. [\[PubMed\]](#)
447. Li ZJ, Mack SC, Mak TH, Angers S, Taylor MD, Hui CC. Evasion of p53 and G/M checkpoints are characteristic of Hh-driven basal cell carcinoma. *Oncogene*. 2013 [\[PubMed\]](#)
448. Amakye D, Jagani Z, Dorsch M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat. Med*. 2013;19:1410–1422. [\[PubMed\]](#)
449. Kool M, et al. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to Smoothed inhibition. *Cancer Cell*. 2014;25:393–405. [\[PubMed\]](#)
450. Dennler S, et al. Induction of Sonic hedgehog mediators by transforming growth factor- β : Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res*. 2007;67:6981–6986. [\[PubMed\]](#)
451. Jagani Z, et al. Loss of the tumor suppressor Snf5 leads to aberrant activation of the Hedgehog–Gli pathway. *Nat. Med*. 2010;16:1429–1433. [\[PubMed\]](#)

452. Riobo NA, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP., Jr Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006;103:4505–4510. [\[PubMed\]](#)
453. Perreault N., Sackett S. D., Katz J. P., Furth E. E. & Kaestner K. H. Foxl1 is a mesenchymal modifier of Min in carcinogenesis of stomach and colon. *Genes Dev.* 19, 311–315 (2005). [\[PubMed\]](#)
454. Marco Gerling,¹ Nikè V. J. A. Büller,^{2*} Leonard M. Kirn, Stromal Hedgehog signalling is downregulated in colon cancer and its restoration restrains tumour growth *Nat Commun.* 2016; 7: 12321.
455. Dow L. E. et al. . Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. *Cell* 161, 1539–1552 (2015). [\[PubMed\]](#)
456. Mazumdar T., DeVecchio J., Agyeman A., Shi T. & Houghton J. A. The GLI genes as the molecular switch in disrupting Hedgehog signaling in colon cancer. *Oncotarget* 2, 638–645 (2011). [\[PubMed\]](#)
457. Rodriguez-Blanco J, Schilling NS, Tokhunts R, et al. The hedgehog processing pathway is required for NSCLC growth and survival. *Oncogene.* 2013;32(18):2335–2345. [\[PubMed\]](#)
458. Pelczar P, Zibat A, van Dop WA, et al. Inactivation of Patched 1 in mice leads to development of gastrointestinal stromal-like tumors that express Pdgfralpha but not kit. *Gastroenterology.* 2013;144(1):134–144. e6. [\[PubMed\]](#)
459. Tian H, Callahan CA, DuPree KJ, et al. Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(11):4254–4259. [\[PM\]](#) [\[PubMed\]](#)
460. Mao J, Ligon KL, Rakhlin EY, et al. A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer Res.* 2006;66(20):10171–10178. [\[PubMed\]](#)
461. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature.* 2009;458(7239):776–779. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#)
462. Merchant M, Evangelista M, Luoh SM, et al. Loss of the serine/threonine kinase fused results in postnatal growth defects and lethality due to progressive hydrocephalus. *Mol Cell Biol.* 2005;25(16):7054–7068. [\[PubMed\]](#)
463. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105–111. [\[PubMed\]](#)
464. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science.* 2009;324(5933):1457–1461. [\[PubMed\]](#)
465. Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immune suppression and accelerates pancreatic cancer with reduced survival. *Cancer Cell.* 2014;25(6):719–734. [\[PubMed\]](#)
466. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2014;25(6):735–747. [\[PubMed\]](#)
467. Gu D, Liu H, Su GH, et al. Combining hedgehog signaling inhibition with focal irradiation on reduction of pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(6):1038–1048. [\[PubMed\]](#)

468. Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.* 2006;66(12):6063–6071. [PubMed]
469. Takahashi T, Kawakami K, Mishima S, et al. Cyclopamine induces eosinophilic differentiation and upregulates CD44 expression in myeloid leukemia cells. *Leuk Res.* 2011;35(5):638–645. [PubMed]
470. Steg AD, Katre AA, Bevis KS, et al. Smoothed antagonists reverse taxane resistance in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2012b;11(7):1587–1597. [PubMed]
471. Zahreddine HA, Culjkovic-Kraljacic B, Assouline S, et al. The sonic hedgehog factor GLI1 imparts drug resistance through inducible glucuronidation. *Nature.* 2014;511(7507):90–93. [PubMed]
472. An Y, Cai B, Chen J, et al. MAP3K10 promotes the proliferation and decreases the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine by upregulating Gli-1 and Gli-2. *Cancer Lett.* 2013;329(2):228–235. [PubMed]
473. Domingo-Domenech J, Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, et al. Suppression of acquired docetaxel resistance in prostate cancer through depletion of notch- and hedgehog-dependent tumorinitiating cells. *Cancer Cell.* 2012;22(3):373–388. [PubMed]
474. Ramaswamy B, Lu Y, Teng KY, et al. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. *Cancer Res.* 2012;72(19):5048–5059. [PubMed]
475. Das S, Samant RS, Shevde LA. Nonclassical activation of Hedgehog signaling enhances multidrug resistance and makes cancer cells refractory to smoothed-targeting Hedgehog inhibition. *J Biol Chem.* 2013;288(17):11824–11833. [PubMed]
476. Park KS, Martelotto LG, Peifer M, et al. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nat Med.* 2011;17(11):1504–1508. [PubMed]
477. Boyd AL, Salci KR, Shapovalova Z, McIntyre BA, Bhatia M. Nonhematopoietic cells represent a more rational target of in vivo hedgehog signaling affecting normal or acute myeloid leukemia progenitors. *Exp Hematol.* 2013 [PubMed]
478. Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, et al. Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell.* 2004;6(3):229–240. [PubMed]
479. Xie J, Aszterbaum M, Zhang X, et al. A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(16):9255–9259. [PubMed]
480. Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene.* 2009;28(40):3513–3525. [PubMed]
481. Inaguma S, Kasai K, Ikeda H. GLI1 facilitates the migration and invasion of pancreatic cancer cells through MUC5AC-mediated attenuation of E-cadherin. *Oncogene.* 2010 [PubMed]
482. Joost S, Almada LL, Rohnalter V, et al. GLI1 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2012;72(1):88–99. [PubMed]
483. Yanfei Jia, Yunshan Wang, and Jingwu Xie The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation Arch Toxicol. Author manuscript;

available in PMC 2016 Feb 1. Published in final edited form as: Arch Toxicol. 2015 Feb; 89(2): 179–191.b figure 2

484. Ribes V, Briscoe J. Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(2):a002014. [PubMed]
485. Benazet JD, Zeller R. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a001339. [PubMed]
486. Wallace VA. Purkinje-cell-derived sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol.* 1999;9(8):445–448. [PubMed]
487. Dirix L. Discovery and exploitation of novel targets by approved drugs. *J. Clin. Oncol.* 2014;32:720–721. [PubMed]
488. Sekulic A, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2012;366:2171–2179. [PubMed]
489. Lewis KD, et al. Vismodegib in the treatment of patients with metastatic basal cell carcinoma (mBCC) and distant metastases: survival in the pivotal phase II and phase I studies [abstract] *J. Clin. Oncol.* 2014;32(5s Suppl.):a9012.
490. Sloan AE, et al. Targeting glioma-initiating cells in GBM: ABTC-0904, a randomized phase 0/II study targeting the Sonic Hedgehog-signaling pathway [abstract] *J. Clin. Oncol.* 2014;32(5s Suppl.):a2026.
491. Belani CP, et al. Three-arm randomized phase II study of cisplatin and etoposide (CE) versus CE with either vismodegib (V) or cixutumumab (Cx) for patients with extensive stage-small cell lung cancer (ES-SCLC) (ECOG 1508) [abstract] *J. Clin. Oncol.* 2013;31(Suppl.):a7508.
492. Catenacci DVT, et al. Final analysis of a phase IB/randomized phase II study of gemcitabine (G.) plus placebo (P) or vismodegib (V), a hedgehog (Hh) pathway inhibitor, in patients (pts) with metastatic pancreatic cancer (PC): a University of Chicago phase II consortium study [abstract] *J. Clin. Oncol.* 2013;31(Suppl.):a4012.
493. Berlin J, et al. A randomized phase II trial of vismodegib versus placebo with FOLFOX or FOLFIRI and bevacizumab in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2013;19:258–267. [PubMed]
494. Madden JI. Infinity Reports Update from Phase 2 Study of Saridegib Plus Gemcitabine in Patients with Metastatic Pancreatic. Cancer. Infinity Pharmaceuticals. 2012 [online], <http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=121941&p=irol-newsArticle&ID=1653550&highlight>.
495. Madden JI. Infinity Stops Phase 2 Trials of Saridegib in Chondrosarcoma and Myelofibrosis. FierceBiotech. 2012 [online], <http://www.fiercebiotech.com/pres-s-releases/infinity-stops-phase-2-trials-saridegib-chondrosarcoma-and-myelofibrosis>.
496. Pietanza MC, et al. Phase I trial of the Hedgehog (Hh) inhibitor, LDE225, in combination with etoposide and cisplatin (EP) for initial treatment of extensive stage small cell lung cancer (ES-SCLC) [abstract] *J. Clin. Oncol.* 2014;32(5s Suppl.):a7602.
497. Ng JM, Curran T. The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2011;11:493–501. [PubMed]
498. Yaucz RL, et al. A paracrine requirement for Hedgehog signalling in cancer. *Nature.* 2008;455:406–410. [PubMed]

499. Ellison DW, et al. Medulloblastoma: clinicopathological correlates of, SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol.* 2011;121:381–396. [PubMed]
500. Shou Y, et al. A five-gene Hedgehog signature developed as a patient preselection tool for hedgehog inhibitor therapy in medulloblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2015;21:585–593. [PubMed]
501. Von Hoff DD, et al. Inhibition of the Hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2009;361:1164–1172. [PubMed]
502. Graham RA, et al. Pharmacokinetics of Hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with locally advanced or metastatic solid tumors: the role of alpha-1-acid glycoprotein binding. *Clin. Cancer Res.* 2011;17:2512–2520. [PubMed]
503. Ramaswamy B, et al. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. *Cancer Res.* 2012;72:5048–5059. [PubMed]
504. Yauch RL, et al. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science.* 2009;326:572–574. [PubMed]
505. Buonamici S, et al. Interfering with resistance to Smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci. Transl. Med.* 2010;2:51ra70. [PubMed]
506. Yoon JW, et al. Noncanonical regulation of the Hedgehog mediator GLI1 by c-MYC in Burkitt lymphoma. *Mol. Cancer Res.* 2013;11:604–615. [PubMed]
507. Brennan D, Chen X, Cheng L, Mahoney M, Riobo NA. Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitam. Horm.* 2012;88:55–72. [PubMed]
508. Wang Y, et al. The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer Cell.* 2012;21:374–87. [PubMed]
509. Kim DJ, et al. Open-label, exploratory phase II trial of oral itraconazole for the treatment of basal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2014;32:745–751. [PubMed]
510. Kim J, et al. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell.* 2010;17:388–399. [PubMed]
511. Kim J, Lee JJ, Kim J, Gardner D, Beachy PA. Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010;107:13432–13437. [PubMed]
512. Vertebrate Intestinal Endoderm Development Jason R. Spence, Ryan Lauf, Noah F. Shroyer *Dev Dyn.* Author manuscript; available in PMC 2012 Mar 1. Published in final edited form as: *Dev Dyn.* 2011 Mar; 240(3): 501–520. Published online 2011 Jan 18. doi: 10.1002/dvdy.22540
513. Micchelli, C. A. (2011). The origin of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Developmental Dynamics*, 241(1), 85–91. doi:10.1002/dvdy.22759
514. Dzama, M. M., Nigmatullina, L., Sayols, S., Kreim, N., & Soshnikova, N. (2017). Distinct populations of embryonic epithelial progenitors generate Lgr5 + intestinal stem cells. *Developmental Biology*, 432(2), 258–264. doi:10.1016/j.ydbio.2017.10.012
515. Dominant Activation of the Hedgehog Signaling Pathway in the Ovary Alters Theca Development and Prevents Ovulation Yi Ren Robert G. Cowan Rebecca M. Harman Susan M. Quirk *Molecular Endocrinology*, Volume 23, Issue 5, 1 May 2009, Pages 711–723, <https://doi.org/10.1210/me.2008-0391>

516. Sex and hedgehog: roles of genes in the hedgehog signaling pathway in mammalian sexual differentiation Heather L. Franco and Humphrey H.-C. Yao
 doi: 10.1007/s10577-011-9254-z
517. Chou CI, Chang sC, lin tC, et al. Differences in clinicopathological characteristics of colorectal cancer between younger and elderly patients: an analysis of 322 patients from a single institution. *Am J Surg.* 2011;202:574–582.
518. Davis Dm, marcet Je, frattini JC, Prather aD, mateka JJ, nfon-sam Vn. is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *J Am Coll Surg.* 2011;213:352–361.
519. Recommendations on screening for colorectal cancer in primary care Canadian Task Force on Preventive Health Care *CMAJ.* 2016 Mar 15; 188(5): 340–348. doi: 10.1503/cmaj.151125
520. Canonical Wnt Signaling Ameliorates Aging of Intestinal Stem Cells *Cell Rep.* 2017 Mar 14; 18(11): 2608–2621. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.056
521. Development and differentiation of the intestinal epithelium Pascal De Santa Barbara, Gijs R. Van Den Brink, Drucilla J. Roberts *Cell Mol Life Sci.* 2003 Jul; 60(7): 1322–1332. doi: 10.1007/s00018-003-2289-3
522. sonic hedgehog is required in pulmonary endoderm for atrial septation Andrew D. Hoffmann, Michael A. Peterson, Joshua M. Friedland-Little, Stuart A. Anderson, Ivan P. Moskowitz *Development* 2009 136: 1761-1770; doi: 10.1242/dev.034157
523. Hedgehog Signaling in Development and Homeostasis of the Gastrointestinal Tract *Physiol Rev* 87: 1343–1375, 2007; doi:10.1152/physrev.00054.2006
524. Dashty M (2014) Hedgehog Signaling Pathway is Linked with Age- Related Diseases. *J Diabetes Metab* 5:350. doi: 10.4172/2155-6156.1000350

