

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
"ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ: ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΩΣ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ"
ΕΔΡΑ: ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΟΔΥΣΣΕΑΣ-ΙΩΑΝΝΗΣ ΖΩΡΑΣ

<< Η έρευνα στο ρετροϊό RSV και στο ογκογονίδιο Src σηματοδότησε την κατανόηση της γενετικής βάσης του καρκίνου>>

<<Research on retrovirus RSV and Src oncogene set the fundamentals to understand the genetic basis of cancer>>

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΣΙΜΑΤΟΥ ΑΡΙΣΤΟΦΑΝΙΑ
ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΔΙΔΑΚΤΩΡ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΔΙΪΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
"ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ: ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΩΣ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ"
ΕΔΡΑ: ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΟΔΥΣΣΕΑΣ-ΙΩΑΝΝΗΣ ΖΩΡΑΣ

<< Η έρευνα στο ρετροϊό RSV και στο ογκογονίδιο Src σηματοδότησε την κατανόηση της γενετικής βάσης του καρκίνου >>

<< Research on retrovirus RSV and Src oncogene set the fundamentals to understand the genetic basis of cancer >>

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΙΜΑΤΟΥ ΑΡΙΣΤΟΦΑΝΙΑ

ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΔΙΔΑΚΤΩΡ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα

Όνοματεπώνυμο: Σιμάτου Αριστοφάνια
Διεύθυνση: Πλατεία Ηρώων Πολυτεχνείου 34, Κηφισιά
Τηλέφωνο: 210-6205474, **Κινητό τηλέφωνο:** 6909266742
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: ariasimatou@yahoo.com
Ημερομηνία γέννησης: 23 Αυγούστου 1994
Εθνικότητα: Ελληνική **Φύλο:** Θήλυ
Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη

Εκπαίδευση και Σπουδές :

9/2006-9/2009 : Μαθήτρια Γυμνασίου στο Pierce College
9/2009-9/2012 : Μαθήτρια Λυκείου στην Ώθηση
9/2012-6/2018 : Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών
7/2018 : Πτυχίο Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών, Βαθμός : Λίαν Καλώς
7/2019-σήμερα : Υποψήφια Διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο θέμα : Μελέτη της έκφρασης του συστήματος RANK/RANKL/OPG στον καρκίνο του μαστού και θεραπευτικές προσεγγίσεις
10/2019-σήμερα : Φοιτήτρια του διατμηματικού προγράμματος: Ογκολογία: Από την ογκογένεση έως τη θεραπεία (Πανεπιστήμιο Κρήτης- Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών)

Ξένες Γλώσσες :

- 1) Αγγλικά : Proficiency in English
- 2) Γαλλικά : Sorbonne C1

Επαγγελματική Εμπειρία :

11/2018-12/2018 : Ιατρός Υπηρεσίας Υπαίθρου στο Γενικό Νοσοκομείο Λαμίας
12/2018-11/2019 : Ιατρός Υπηρεσίας Υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Αμφίκλειας
3/2020- 9/2020 : Ειδικευόμενη Εσωτερικής Παθολογίας στο Νοσοκομείο Μεταξά/
Αιματολογική Κλινική
10/2020- σήμερα : Ειδικευόμενη Εσωτερικής Παθολογίας στο Νοσοκομείο 417 ΝΙΜΤΣ/ Γ'
Παθολογική Κλινική

Δημοσιεύσεις σε περιοδικά :

Δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές:

1. F. Karachaliou, K Athanasakis, Ch Tsentidis, A Soldatou, **A Simatou** and K Karavanaki. Estimating the Direct Cost of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients in Greece. E.C Paediatrics. 2018; 7(10)
2. Simatos G, Filoppoulos E, Karachaliou F, Zompolas V, Intas G, Tsiropoulou E, **Simatou A**, Raftopoulos V, Papadopoulos A. Perceived quality and patient satisfaction from a day surgery clinic in Greece J Nurs Res Pract. 2018;2(3):35-38.
3. **Simatou A**, Simatos G, Goulielmaki M, Spandidos DA, Baliou S, Zoumpourlis V. Historical retrospective of the SRC oncogene and new perspectives. Mol Clin Oncol. 2020;13(4): 21
4. **Simatou, A.**, Sarantis, P., Koustas, E., Papavassiliou, A. G., & Karamouzis, M. V. The Role of the RANKL/RANK Axis in the Prevention and Treatment of Breast Cancer with Immune Checkpoint Inhibitors and Anti-RANKL. International Journal of Molecular Science.2020;21(20) : 7570.

5. Karachaliou, F., Simatos, G., **& Simatou, A.** The Challenges in the Development of Diabetes Prevention and Care Models in Low-Income Settings. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;11
6. Karachaliou F, Skarakis N, Bountouvi E, Spyropoulou T, Tsintzou E, **Simatou A**, Papaevangelou V. Evolution of Hashimoto thyroiditis in children with type 1 diabetes melitus (T1DM). *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2020;Nov 11

Επιστημονικές εργασίες :

1. Karachaliou F, Skarakis N, Mitrogiorgou M, **Simatou A**, Papaevangelou V. ¹Pediatric Endocrinology Unit, 3rd University Department of Pediatrics, Attikon University Hospital. Structural pituitary abnormality and dysfunction associated with charge syndrome

2. Mitrogiorgou M, Karachaliou F, Skarakis N, **Simatou A**, Papaevangelou V, S Fessatou. Pediatric Endocrinology Unit, 3rd University Department of Pediatrics, Attikon University Hospital. Endocrinology Clinic, 4th Dept of Internal Medicine, Attikon University Hospital. Reduced bone mineral density in children with inflammatory bowel disease without exposure to corticosteroid treatment.

3. Karachaliou F, Skarakis N, Mitrogiorgou M, **Simatou A**, Peppas P, Papaevangelou V. Pediatric Endocrinology Unit, 3rd University Department of Pediatrics, Attikon University Hospital. Recombinant gh treatment in child with pseudohypoparathyroidism associated with growth hormone deficiency

4. Theoharis Lepenos, Maria Liarou, Dimitris Amorgianos, Aikaterini Kamiliou, Dimitra Grammenou, Dimitra Exarchopoulou, Kostantinos Mitrokotsas, Athanasios Ioannidis, Efstathia Tsampou, **Aristofania Simatou**. Health center Amfikleia, Gp-national health system-ESY. Attitudes and perceptions of the elderly in national health system

Παρακολούθηση Επιστημονικών Συνεδρίων :

1. Επιβιούντες ή επιβιώσαντες; Είναι δυνατή η ίαση; Αθήνα, 5-6 Απριλίου, 2019
2. Προσωποποιημένη Ιατρική (Personalized Medicine) στον καρκίνο σήμερα, Αθήνα, 12-13 Οκτωβρίου 2018
3. 7ο Επιστημονικό Forum : Τα νέα φάρμακα στην Ογκολογία : από την έρευνα στην , πράξη, Σπέτσες 10-11 Μαΐου 2019
4. Η Μοριακή Ιατρική από το εργαστήριο στην Πράξη: Προκλήσεις και ερωτήματα IV
5. Η ογκολογία συναντά τις άλλες ειδικότητες , 4-5 Δεκεμβρίου 2020
6. Ημερίδα ενημέρωσης σχετικά με τα οφέλη της ανοσοθεραπείας και της στοχευμένης θεραπείας στον καρκίνο :το μεταβαλλόμενο τοπίο , 12 Δεκεμβρίου 2020
7. Αναδυόμενες θεραπευτικές επιλογές στην αιματολογία, 5-6 Φεβρουαρίου 2021

Άλλες Δραστηριότητες :

1. Μέλος της Ελληνικής Αντικαρκινικής Εταιρείας
2. Μέλος της Ελληνικής Σκακιστικής Ομοσπονδίας 2008
3. Μέλος του Ομίλου Πολεμικών Τεχνών Κηφισιάς, Πρωταθλήτρια Ελλάδος 2012
4. Μέλος του σωματίου ζωόφιλων ΣΩ.ΖΩ.
5. Εθελοντής Αιμοδότης και Εθελοντής Δότης Μυελού των Οστών

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΓΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ

ΑΘΗΝΑ 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1.Ζουμπουρλής Βασίλειος –Ερευνητής Α, Διευθυντής Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα (Επιβλέπων)

2.Σουρβίνος Γεώργιος– Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

3.Αγγελάκη Σοφία- Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι την ανάγκη και την ηθική υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που συνέβαλαν, στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Τον κύριο Βασίλειο Ζουμπουρλή, -Διευθυντή Ερευνών- Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών Αθηνών, ως επιβλέποντα και για την ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, αλλά και την επιστημονική εποπτεία, καθοδήγηση και γόνιμη κριτική καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Τον κύριο Γεώργιο Σουρβίνο, Καθηγητή Κλινικής Ιολογίας- Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, για την συμβολή του και στήριξή του

Την κυρία Σοφία Αγγελάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας- Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης για τη συμβολή της και τη στήριξή της.

Τέλος αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον σύζυγο μου καθώς και την οικογένεια μου για τη συνεχή αγάπη και υποστήριξη που έχω λάβει καθ' όλη τη διάρκεια της επαγγελματικής μου σταδιοδρομίας, καθώς και να αφιερώσω τη συγκεκριμένη εργασία στην αδερφή μου Γεωργία Σιμάτου που φέτος μέσω της διαδικασίας των πανελλαδικών εξετάσεων κατόρθωσε να εισαχθεί στην Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης .**Η ερευνά στο ρετροϊό RSV και στο ογκογονίδιο Src σηματοδότησε την κατανόηση της γενετικής βάσης του καρκίνου**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό Σημείωμα	3
Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή	5
Ευχαριστίες	5
Περιεχόμενα	6
Κεφάλαιο 1.Εισαγωγή	7
Κεφάλαιο 2.Ογκογόνοι Ιοί	11
2.1.Εισαγωγή στους ογκογόνους ιούς	11
2.2.RNA ογκογόνοι ιοί και η ανακάλυψη του RSV	13
2.3.DNA ογκογόνοι ιοί	18
2.4.Ογκογόνοι ιοί στον άνθρωπο	20
Κεφάλαιο 3.Κυτταρική Προέλευση των ρετροϊκών ογκογονιδίων	25
Κεφάλαιο 4.Χημική Καρκινογένεση	29
Κεφάλαιο 5.Ενθετική Μεταλλαξιγένεση και ανάδειξη πρώτο-ογκογονιδίων	33
Κεφάλαιο 6.MicroRNAs (miRNAs)	39
6.1.Εισαγωγή στα miRNAs	39
6.2.Ιστορική Αναδρομή miRNAs	40
6.3.Βιογένεση miRNAs και μηχανισμός δράσης	42
6.4.miRNAs ως ρυθμιστές της Src σηματοδότησης στον καρκίνο	43
6.5.miRNA διαμεσολαβούμενη Src ογκογόνα σηματοδότηση σε επιλεγμένους τύπους καρκίνου	46
Κεφάλαιο 7.Εξωσώματα ως ρυθμιστές της Src σηματοδότησης στον καρκίνο	48
Κεφάλαιο 8.Src αναστολείς ως αντικαρκινικοί παράγοντες σε κλινικές μελέτες	50
Κεφάλαιο 9.Στρατηγικές διπλής στόχευσης σε Src θετικούς καρκίνους	55
9.1.Εισαγωγή	55
9.2.Στρατηγική διπλής στόχευσης στον καρκίνο του μαστού	57
9.3.Στρατηγική διπλής στόχευσης στον καρκίνο του γαστρεντερικού σωλήνα	59
9.4.Στρατηγική διπλής στόχευσης στον καρκίνο των ωοθηκών	61
9.5.Στρατηγική διπλής στόχευσης στον καρκίνο κεφαλής τραχήλου	61
10.Συμπεράσματα	63
Περίληψη	65
Βιβλιογραφία	67

1.Εισαγωγή

Ο καρκίνος συνιστά τη δεύτερη συνηθέστερη αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες, μετά από τις καρδιοπάθειες, με τον καρκίνο του πνεύμονα να κατέχει την πρώτη θέση ανάμεσα στις κακοήθειες νόσους, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες.. Γενικά, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από τα εξής: 1) ανθίστανται της απόπτωσης, 2)έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται παρουσία ή μη αυξητικών παραγόντων 3) έχουν αυτονομηθεί πλήρως και ως εκ τούτου ανθίστανται σε ανασταλτικά σήματα, 4)διαφεύγουν του φυσιολογικού μηχανισμού γήρανσης 5) έχουν την ικανότητα διήθησης και μετάστασης σε απομακρυσμένους ιστούς, 6)διαθέτουν την ικανότητά της δημιουργίας νέων αγγείων - νεοαγγειογένεση προκειμένου να εξασφαλίσουν οξυγόνο και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στα ταχέως αναπτυσσόμενα κύτταρα τους .(1) Είναι γεγονός 'ότι το 90% των θανάτων σχετιζόμενων με καρκίνο οφείλονται στη διαφυγή και μετάσταση του πρωτογενούς όγκου σε μια νέα απομακρυσμένη θέση, η οποία συνεπάγεται και ποικιλία κλινικών χαρακτηριστικών. Αναλυτικότερα, η μετάσταση συνιστά μια πολυσταδιακή διαδικασία, κατά την οποία λαμβάνουν χώρα πολλαπλά μηνύματα σηματοδότησης που επάγουν τη διήθηση του στρώματος καθώς και την διείσδυση των καρκινικών κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία.. Σαφέστερα, τα καρκινικά κύτταρα της πρωτοπαθούς εστίας χάνουν την ικανότητα ισχυρούς προσκόλλησης τόσο μεταξύ τους όσο και με την εξωκυττάρια ουσία τους, διεισδύουν στη βασική μεμβράνη του επιθηλιακού ιστού, εισβάλλουν στο περιβάλλον στρώμα του συνδετικού ιστού, κατόπιν εισέρχονται στα αιμοφόρα αγγεία και με την κυκλοφορία εξέρχονται σε ένα νέο περιβάλλον, όπου μπορούν να εγκατασταθούν και να αναπτυχθούν (2,3). Όλη αυτή η διαδικασία χαρακτηρίζεται από ποικίλες αλλαγές τόσο σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, όσο και στη λειτουργία τους όπως είναι για παράδειγμα η απώλεια ειδικών επιθηλιακών δεικτών , μια διαδικασία γνωστή ως επιθηλιακή-μεσεγχυματική μμετατροπή (epithelial-mesenchymal transition= EMT) (2,3)

Είναι πλέον γνωστό, ότι τα μόρια προσκόλλησης κατέχουν ένα κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης και κυρίως κατά το στάδιο αύξησης του μεγέθους του όγκου και μετάστασης του σε παρακείμενα όργανα(4). Στο φυσιολογικό κύτταρο, αυτές οι αλληλεπιδράσεις προσκόλλησης κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας είναι κρίσιμες για την κυτταρική αύξηση, επιβίωση, και λειτουργία, καθώς κύτταρα τα οποία για τον οποιοδήποτε λόγο αποτυγχάνουν να προσκολληθούν και να εξαπλωθούν (spread) υποβάλλονται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και απόπτωση(5). Η εξωκυττάρια ουσία κατέχει διττό ρόλο καθώς αφενός αποτελεί το ικρίωμα επάνω στο οποίο προσκολλούνται τα κύτταρα και αφετέρου καθορίζει την κυτταρική συμπεριφορά (2,3). Οι ετεροδιμερείς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που ονομάζονται ιντεγκρίνες είναι οι σημαντικότεροι υποδοχείς όσον αφορά την εξασφάλισή της προσκόλλησης των κυττάρων του ιστού στην εξωκυττάρια ουσία (5). Οι αλληλεπιδράσεις των ιντεγκρινών με τους εξωκυττάρια συνδέτες (ligands) τους έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική προσκόλληση και εξάπλωση μέσω επίδρασης και ρύθμισης της οργάνωσης του κυτοσκελετού της ακτίνης. Επιπροσθέτως, η σύνδεση των ιντεγκρινών στους συνδέτες τους της εξωκυττάριας ουσίας οδηγεί αλυσιδωτά στην ενεργοποίηση των πρώτων και τη συσσώρευσή τους στα σημεία εστιακής προσκόλλησης (focal adhesions) (5). Τα σημεία εστιακής προσκόλλησης αποτελούν δομές μέσω των οποίων οι ιντεγκρίνες λειτουργούν ως γέφυρες συνδέοντας το εξωκυττάριο περιβάλλον με τα ενδοκυττάρια σύμπλοκα (5). Οι ίδιοι οι υποδοχείς αυτοί στερούνται εγγενούς ενζυματικής δραστηριότητας με αποτέλεσμα να ασκούν τις δράσεις τους αναφορικά με την οργάνωση της δομής του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της μεταγωγής σημάτων μέσω στρατολόγησης διαφόρων κινασών, μορίων σηματοδότησης και κυτοσκελετικών πρωτεϊνών στο κυτταροπλασματικό τους άκρο (5-6). Από τα πρώτα μόρια που στρατολογούνται ως απότοκος της ενεργοποίησης και συγκέντρωσης των ιντεγκρινών στα σημεία της εστιακής προσκόλλησης είναι η FAK κινάση της τυροσίνης (Focal Adhesion Kinase) και η c-Src (6). Ακολουθεί η αυτοφωσφορυλίωση της FAK στο κατάλοιπο τυροσίνης στη θέση 397, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας θέσης πρόσφυσης για μέλη της οικογένειας των κινασών Src, όπως η c-Src και η Fyn (6). Τέλος ακολουθεί ένας καταρράκτης φωσφορυλίωσης μεταξύ άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη FAK κινάση, όπως η παξιλίνη, η p¹³⁰CAS και η τενσίνη (5).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η επιβίωση πολλών τύπων κυττάρων του ανθρώπου, όπως είναι για παράδειγμα τα επιθηλιακά κύτταρα επηρεάζεται άμεσα από τη προσκόλληση των τελευταίων στα συστατικά της εξωκυττάριας, με την ενδεχόμενη αποκόλλησή τους να προάγει τη διαδικασία της απόπτωσης, διασφαλίζοντας κατά αυτό τον τρόπο τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο για όσα κύτταρα έχουν χάσει τη συνέχεια από το φυσικό τους περιβάλλον. Ωστόσο, ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η ικανότητα τους να ανθίστανται στο μηχανισμό της απόπτωσης και να επιβιώνουν συνεχίζοντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι οι c-Src και Ras είναι ενεργοποιημένες σε κύτταρα που έχουν αυτονομηθεί από την εξαρτώμενη της κυτταρικής αποκόλλησης κυτταρική απόπτωση, συνιστώντας ένδειξη ότι οι ογκοπρωτεΐνες αυτές μέσω των ιντεγκρινών παρέχουν ένα σταθερό συνεχές σήμα, που επάγει την καρκινογένεση καθώς και την εξέλιξη του όγκου. (3)

Το πρώτο-ογκογονίδιο c-Src (cellular Src) συνιστά το κυτταρικό ομόλογο της ιϊκής προέλευσης v-Src (viral Src), του οποίου η έκφραση και η δραστηριότητα έχει ανευρεθεί αυξημένη σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου και σχετίζεται με την απόκτηση ικανότητας κακοήθους εξαλλαγής και ανάπτυξης μεταστατικού δυναμικού. (7-9). Δεδομένου των πολλών κλινικών μελετών που αναδεικνύουν τον κεντρικό του ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο, (10,11) το c-SRC έχει αναδειχθεί ως ένας πολλά υποσχόμενος στόχος αντικαρκινικής θεραπείας. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί προσφάτως πολλαπλοί SRC αναστολείς που στοχεύουν το εν λόγω μόριο και η αποτελεσματικότητά τους μένει να εκτιμηθεί σε προσεχείς κλινικές μελέτες που ήδη λαμβάνουν χώρα. (12,13). Παραδόξως, ο ακριβής μηχανισμός δράσης, αυτού του τόσο καλά μελετημένου γονιδίου δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, καθώς ενέχονται πολλαπλά και πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια. Το c-Src ήταν το πρώτο πρωτοογκογονίδιο που ταυτοποιήθηκε στο ανθρώπινο γονιδίωμα, συνιστά εξελικτικά μια εξαιρετικά διατηρημένη DNA αλληλουχία και ανήκει σε μια οικογένεια κινασών τυροσίνης που ονομάζεται οικογένεια Src (Src Family Kinases-SFKs), με τα μέλη της να κατέχουν σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση επαγωγής σημάτων που προέρχονται από ένα ευρύ φάσμα υποδοχέων. Η οικογένεια περιλαμβάνει 8 μέλη που ονομάζονται p55Blk, p56Fgr, p59Fyn, p61Hck, p56Lck, p56Lyn, p60Src και p60Yes. Μεταξύ αυτών οι Blk, Fgr, Hck, Lck και Lyn εκφράζονται κατά προτίμηση στα αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ οι Src, Fyn και Yes είναι ευρέως εκφραζόμενες (14,15) Οι SFKs έχουν μοριακό βάρος

που κυμαίνεται μεταξύ 52 και 62 kDa και περιέχουν 6 διακριτά συντηρημένες περιοχές. Ειδικότερα, το c-SRC ενέχεται στη διατήρηση της ομοιόστασης του φυσιολογικού κυττάρου, ρυθμίζοντας ένα ευρύ φάσμα κρίσιμων κυτταρικών γεγονότων, μεταξύ των οποίων είναι η γονιδιακή μεταγραφή, η κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμός, επιβίωση, προσκόλληση, κινητικότητα απόπτωση και η μετανάστευση. (16,17). Ως εκ τούτου, στα φυσιολογικά κύτταρα το επίπεδο έκφρασης και δραστικότητας του c-SRC ρυθμίζεται αυστηρά από πολλαπλούς μηχανισμούς ελέγχου. Αναλυτικότερα, η δραστικότητα κίνησης του c-SRC είναι υπό τον έλεγχο της CSK κίνησης (C-terminal SRC kinase), η οποία δρα φωσφορυλιώνοντας ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης που εντοπίζεται στη θέση 530 του καρβοξυτελικού άκρου του c-SRC (Tyr530). Η εν λόγω φωσφορυλίωση αναστρέφεται από την ενεργοποιημένη πρωτεϊνική φωσφατάση 1B (PTP1B), οδηγώντας έτσι στην απενεργοποίηση του c-SRC. Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων οδηγεί στην αλληλεπίδραση τους με τη SH2 (c-SRC homology 2) περιοχή του c-SRC, γεγονός που διαταράσσει τις ανασταλτικές ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και προάγει την ενεργοποίηση του c-SRC. Με ανάλογο μηχανισμό, άλλες πρωτεΐνες όπως οι CAS (CRK-associated substrate) και FAK, συνδέονται στις SH2 και SH3 περιοχές του c-SRC, προάγοντας την ενεργοποίησή του. Επιπροσθέτως, το c-SRC ρυθμίζεται αρνητικά μέσω του άξονα ουμπικουϊτίνης -πρωτεασώματος, που διαμεσολαβείται μέσω της E3 ουβικουϊτινικής λιγάσης Cbl και της Cullin-5 (18-20). Επομένως, καθίσταται ευκολά σαφές ότι το c-SRC ογκογονίδιο επιδέχεται τροποποίηση και ρύθμιση τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μέτα- μεταφραστικό επίπεδο με στόχο την διασφάλιση της ακεραιότητας του και την αποφυγή ανάπτυξης καρκίνου, (18-20), ενώ η απορρύθμιση αυτής της εύθραυστης ισορροπίας με συνοδό επακόλουθο την αυξημένη δραστικότητα κίνησης τυροσίνης μπορεί να προωθήσει την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων, να μειώσει την προσκόλληση και τις στενές συνδέσεις μεταξύ αυτών, να συμβάλλει στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και στην διαφυγή τους από τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και να ενισχύσει την αγγειογένεση. (3). Μόλις ενεργοποιηθεί από αυξητικούς παράγοντες ή/και ιντεγκρίνες το ογκογονίδιο c SRC ενεργοποιεί καθοδικές οδούς σηματοδότης, συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών RAS/MAPK, PI3K/AKT, και STAT προάγοντας έτσι την ανάπτυξη κακοήθους φαινοτύπου και την απόκτηση μεταστατικού δυναμικού. (21).

2. Ογκογόνοι Ιοί

2.1.Εισαγωγή

<< Ένας όγκος του κοτόπουλου πολλαπλασιάζεται στο εργαστήριο από τον Οκτώβρη του 1909. Η συμπεριφορά αυτού του νέου όγκου έχει υπάρξει ολοκληρωτικά πανομοιότυπη με τη συμπεριφορά του πραγματικού νεοπλάσματος, για τον οποίο λόγο ο τρόπος της μετάδοσής του μέσω ενός άνευ κυττάρων διηθήματος είναι εξαιρετικής σημασίας >> .(22,23)

Peyton Rous ογκοβιολόγος 1911

Όπως είναι ήδη γνωστό , οι ιοί είναι ικανοί να προκαλέσουν μια μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων ασθενειών, που κυμαίνονται από τη λύσσα έως την ευλογιά και το κοινό κρυολόγημα. Η συντριπτική πλειονότητα αυτών των μολυσματικών παραγόντων προκαλούν βλάβη μέσω της ικανότητας τους να πολλαπλασιάζονται εντός των μολυσμένων κυττάρων-ξενιστών, να σκοτώνουν αυτά τα κύτταρα και να απελευθερώνουν θυγατρικά ιικά σωματίδια που με τη σειρά τους μολύνουν άλλους εγγενείς ξενιστές. Ως εκ τούτου, οι κυτταροπαθητικές ιδιότητες των ιών, σε συνδυασμό με την μοναδική ικανότητα που τους χαρακτηρίζει να εξαπλώνονται γρήγορα μέσα σε έναν ιστό, επιτρέπουν σε αυτούς τους παράγοντες να αφήσουν ένα ευρύ πεδίο καταστροφής στο πέρασμά τους .Ωστόσο οι ιδιαιτερότητες ορισμένων κύκλων αντιγραφής του ιού μπορεί περιστασιακά να αποδώσουν ένα εντελώς αντίθετο αποτέλεσμα , και μέσω μιας παράδοξης διαδικασίας να αναγκάσουν τους ξενιστές τους να ευδοκιμήσουν και να οδηγηθούν σε έναν ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό .(24)Πρόκειται λοιπόν για μια ξεχωριστή κατηγορία ιών, γνωστοί και ως ογκογόνοι ιοί, οι οποίοι δύνανται να προκαλέσουν καρκίνο. Αξίζει να αναφερθεί ότι πολλοί ιοί όντας υποχρεωτικά ενδοκυτταριοί οργανισμοί αναδιπλασιάζονται ταυτόχρονα με το DNA του κύτταρου- ξενιστή στο οποίο έχουν εισβάλλει, γεγονός που τους επιτρέπει να χρησιμοποιούν διάφορα ένζυμα του ξενιστή προς όφελός τους. Αναλυτικότερα, φέρονται να χρησιμοποιούν το ένζυμο DNA ροί του κυττάρου ξενιστή για την αντιγραφή του δικού τους DNA, τις RNA ροί για τη μεταγραφή του ιικού τους mRNA, καθώς και τα ριβοσώματα του ξενιστή προκειμένου να μεταφραστούν τα ιικά mRNAs και να γίνει η πρωτεϊνοσύνθεση .Μόλις ολοκληρωθεί η πρωτεϊνοσύνθεση στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, αρχίζει η συναρμολόγηση του ιοσωματίου, με τις νεοσυντιθέμενες ιικές πρωτεΐνες να

χρησιμοποιούνται σαν περίβλημα για την κάλυψη του νεοσυντιθέμενου ιικού γονιδιώματος. Τέλος, το απογονικό ισωμάτιο απελευθερώνεται από το μολυσμένο κύτταρο και συνεχίζει τη διασπορά του ιού, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων μόλυνσης και απελευθέρωσης στην κυκλοφορία.(24). Στις αρχές της δεκαετίας του 1970 , οι ογκογόνοι ιοί μελετήθηκαν εντατικά καθώς επικρατούσε η άποψη ότι ο καρκίνος συνιστά μια μολυσματική νόσο, η οποία διασπείρεται μέσω των ογκογόνων ιών. Αυτή η αντίληψη δεν επιβεβαιώθηκε, καθώς αποδείχθηκε σε μια μεγάλη σειρά πειραματικών δοκιμασιών ότι ο καρκίνος συνιστά ουσιαστικά μια γενετική νόσο, που προκύπτει από τη συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό, καθώς επίσης και ότι οι καρκίνοι που προκαλούνται από ιούς αντιπροσωπεύουν μόνο μια μειοψηφία τύπων καρκίνων που προσβάλλουν τους ανθρώπους. Ωστόσο η εν λόγω ερευνητική γραμμή αποδείχθηκε ανεκτίμητη για τους ογκοβιολόγους , καθώς συνέβαλε στην απόδειξη της γενετικής βάσης του καρκίνου, μέσω της ανακάλυψης των ογκογονιδίων , και αποτέλεσε το εναρκτήριο έναυσμα για την ανάδειξη- διερεύνηση των πολύπλοκων μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών που ενέχονται στην καρκινογένεση. Όπως θα δούμε και στη συνέχεια , η έρευνα πάνω στους ογκογόνους ιούς είχε μια πολύ μεταβαλλόμενη πορεία κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα, με τους ογκογόνους ιούς να βρίσκονται στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος κατά την πρώτη δεκαετία του εικοστού αιώνα , και στη συνέχεια να υποχωρούν, αφήνοντας χώρο για τη μελέτη της χημικής καρκινογένεσης στον άνθρωπο. Μισό αιώνα αργότερα, το ενδιαφέρον για αυτούς τους παράγοντες αναζωπυρώθηκε, με αποκορύφωμα τον φρενήρη ρυθμό της έρευνας των ογκογόνων ιών κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970. Οι δυο αυτές προσεγγίσεις συνέβαλλαν στην ανακάλυψη της αιτιότητας του καρκίνου και άλλαξαν μια για πάντα την ανθρώπινη γνώση γύρω από τον καρκίνο, αναδιαμορφώνοντας έτσι και τη θεραπευτική προσέγγιση απέναντι στη νόσο. Αναλυτικότερα, οι ογκογόνες δυνάμεις των συγκεκριμένων ιών, οδήγησαν πολλούς ερευνητές στην αναζήτηση του ακριβούς μηχανισμού μέσω του οποίου οι ιοί κατορθώνουν να προκαλέσουν καρκινικό φαινότυπο. Φάνηκε, ότι οι περισσότεροι ογκογόνοι ιοί παρότι διαθέτουν σχετικά απλά γονιδιώματα με συνοδό μικρό αριθμό ιικών γονιδίων , είναι ικανοί να συντρίψουν ένα μολυσμένο κύτταρο καθώς και το πολύ πιο πολύπλοκο γονιδίωμα του, και να ανακατευθύνουν την κυτταρική αύξηση σε νέες κατευθύνσεις. Μια τέτοιου είδους συμπεριφορά έδειξε ότι οι ογκογόνοι ιοί έχουν αναπτύξει ορισμένα εξαιρετικά ισχυρά γονίδια με σκοπό να διαταράξουν-απορυθμίσουν το

σύνθετο ρυθμιστικό μηχανισμό των κυττάρων ξενιστών που μολύνουν. Μελετώντας τους ογκογόνους ιούς και τους μηχανισμούς δράσης τους, οι ερευνητές τροποποίησαν ολόκληρη τη νοοτροπία της έρευνας αναφορικά με τον καρκίνο. Οι ογκογόνοι ιοί προκάλεσαν μια πραγματική επανάσταση στη μελέτη της παθογένειας του καρκίνου και κατέστη σαφές ότι πρόκειται για μια πολύπλοκη γονιδιακή ασθένεια που μπορεί να μελετηθεί σε βάθος κάνοντας χρήση των εργαλείων της μοριακής βιολογίας και της γενετικής.

2.2.RNA ογκογόνοι ιοί-Ανακάλυψη του RSV

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες του δέκατου ένατου αιώνα, η έρευνα του Λουί Παστέρ και του Ρόμπερτ Κοχ ανέδειξε τους μολυσματικούς παράγοντες που ήταν υπεύθυνοι για την δυσεντερία, τη λύσσα, τη χολέρα και πολλές άλλες ασθένειες στον άνθρωπο. (25-27). Μέχρι το τέλος του αιώνα, αυτοί οι παράγοντες ομαδοποιήθηκαν σε δύο ξεχωριστές κατηγορίες, ανάλογα με τη συμπεριφορά τους κατά τη διήθηση μέσω ενός φίλτρου με λεπτούς πόρους. Τα διαλύματα των μολυσματικών παραγόντων που παγιδεύονταν στους πόρους των φίλτρων θεωρήθηκε ότι περιέχουν βακτήρια, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους που τα χαρακτηρίζει. Οι άλλοι παράγοντες, οι οποίοι ήταν αρκετά μικροί για να περάσουν μέσα από τα φίλτρα, ταξινομήθηκαν ως ιοί. Ο καρκίνος, επίσης, θεωρήθηκε αρχικά ως υποψήφια μολυσματική νόσος, καθώς ήδη από το 1876, ένας Ρώσος ερευνητής ανέφερε τη μετάδοση ενός όγκου από τον έναν σκύλο στον άλλο : τμήματα καρκινικού ιστού από το πρώτο σκυλί εμφυτεύθηκαν στο δεύτερο σκυλί, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός όγκου αρετές εβδομάδες αργότερα, Αύτη την επιτυχία διαδέχθηκαν πολλές άλλες που στηρίχθηκαν στη χρήση όγκων από αρουραίους και ποντικούς.

Ωστόσο η σημασία αυτών των πρώιμων πειραμάτων παρέμεινε αμφιλεγόμενη, καθώς κάποιοι ερμήνευσαν αυτά τα αποτελέσματα ως απόδειξη ότι ο καρκίνος αποτελεί μια μεταδοτική ασθένεια, ενώ άλλοι απέρριψαν τα πειράματα μεταμοσχεύσεων, θεωρώντας πως μια τέτοια υπόθεση αποδείκνυε μόνο ότι οι όγκοι όπως και οι φυσιολογικοί ιστοί, θα μπορούσαν να εισαχθούν και να αναπτυχθούν ως μοσχεύματα στο σώμα ενός δεύτερου οργανισμού Το 1908, δύο ερευνητές στην Κοπεγχάγη ανέφεραν την επιτυχία τους να εξαγάγουν έναν φιλτραριζόμενο παράγοντα από λευχαιμικά κύτταρα κοτόπουλου , τον οποίο στη συνέχεια εμφύτευαν σε άλλα πτηνά, τα οποία εμφάνισαν τη νόσο με ένα

προβλεπόμενο χρονοδιάγραμμα. Το 1909, στο Ινστιτούτο Ροκφέλερ, ο Peyton Rous ξεκίνησε τη μελέτη του για ένα σάρκωμα που είχε αναπτυχθεί στο μαστικό μυ μιας όρνιθας. Αρχή της ερευνάς του στάθηκε ένα τυχαίο γεγονός όπου ένας εκτροφέας κοτόπουλων από το Long Island της Νέας Υόρκης έφερε στο εργαστήριο του μια από τις εκτρεφόμενες κότες του προκειμένου να τη θεραπεύσει ο Rous από έναν αναπτυσσόμενο όγκο που παρατήρησε στο θωρακικό της μυ. Στα αρχικά του πειράματα, ο Rous κατόρθωσε να μεταδώσει τον όγκο σε αλλά πτηνά του ίδιου είδους μέσω εμφύτευσης των θραυσμάτων του όγκου σε αυτά. Σε επόμενα πειράματα που ακολούθησαν ανέπτυξε ένα σύντομο πρωτόκολλο : αρχικά αφαίρεσε ένα σάρκωμα από το μαστικό μυ ενός κοτόπουλου , το θραυσματοποίησε ,το διέλυσε με άμμο και πέρασε το προκύπτον ομογενοποίημα μέσα από ένα φίλτρο με τους λεπτούς πόρους. Τέλος, έγχυσε το διήθημα στο φτερό ενός νεαρού κοτόπουλου και παρατήρησε την ανάπτυξη ενός νέου όγκου. Έπειτα, επανέλαβε ακριβώς την ίδια διαδικασία, σε αυτό το καινούργιο σάρκωμα, μέσω ομογενοποίησης , διήθησης, έγχυσης, και παρατήρησε και πάλι την προβλεπόμενη ανάπτυξη ενός νέου ίδιου καθόλα με τον αρχικό όγκο. (22,23)

Εν τέλει, κατέληξε στην υπόθεση, ότι αυτός ο μετασχηματιστικός-ογκογόνος παράγοντας επρόκειτο για έναν ογκογόνο ιό, που χρονιά αργότερα έμελλε να γίνει γνωστός ως Rous sarcoma virus (RSV), εφόσον αυτός ο παράγοντας είχε την ικανότητα να διαπερνά πολύ λεπτούς πόρους φίλτρων, σε αντιδιαστολή με τα μεγαλύτερα σε μέγεθος βακτήρια ή κύτταρα κοτόπουλου, και να προκαλεί καρκίνο με ένα προβλεπόμενο χρονοδιάγραμμα (22,23). Η ανωτέρω ανακάλυψη ήταν σπουδαίας σημασίας καθώς συνιστά την πρώτη ισχυρή απόδειξη της ιικής ογκογένεσης , και αποτέλεσε το έναυσμα για την ανακάλυψη και άλλων ογκογόνων ιών, αρχικά σε πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου, όπως ποντίκια, γάτες και κουνέλια, (28-31) και εν συνεχεία και στον άνθρωπο με ορόσημο να αποτελεί η ανακάλυψή του πρώτου ανθρωπίνου ογκογόνου ιού Epstein Barr το 1964 (32). Εν συντομία, ο ιός Epstein Barr (EBV) , γνωστός επίσης και ως ανθρωπίνος ερπητοϊός τύπου 4 (HHV4) συγκαταλέγεται στην ευρύτερη κατηγορία των ανθρωπίνων ερπητοϊών μεταξύ των οποίων είναι ο ιός του έρπητα 1 και 2 (HSV1 and HSV 2), ο ιός της ανεμοβλογιάς-του έρπη ζωστήρα (VZV), ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) , καθώς και ανθρωπίνι ερπητοϊοί 6,7,8 (HHVs 6,7,8).(33). Αρχικά, πρώτο ανιχνεύτηκε σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Burkitt μέσω χρήσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας(33). Έχει παρατηρηθεί ότι η επίπτωση του ενδημικού

λεμφώματος Burkitt συχνά συνυπάρχει με ελονοσία και HIV λοίμωξη, γεγονός που υπαγορεύει μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ EBV σχετιζόμενων κακοηθειών και ενός υποστρώματος καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.(34,35). Επίσης λοίμωξη από EBV ανιχνεύεται σε ένα ποσοστό 30-40% των κλασικών λεμφωμάτων Hodgkin παγκοσμίως, σε έναν υποπληθυσμό της τάξεως του 10% των γαστρικών καρκίνων (EBV-associated gastric cancer, EBVaGC), καθώς και στο 100% των μη κερατινοποιημένων-αδιαφοροποίητων ρινοφαρυγγικών καρκινωμάτων (NPCs), που συνιστά μάλιστα και τον συχνότερο ιστολογικό τύπο που συναντάμε στις ενδημικές περιοχές.(34-36). Επιπλέον, EBV λοίμωξη αναγνωρίζεται σε T και NK λεμφώματα καθώς και σε σπάνια λειομυοσαρκώματα, και συχνά είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη λεμφουπερπλαστικών νοσημάτων μετά από μεταμόσχευση.(34).Ο ιός μπορεί εφόσον ενσωματωθεί στο DNA του κυττάρου ξενιστή να μπει σε λανθάνουσα φάση είτε να αρχίσει να αναπαράγεται προκαλώντας ενεργό συμπτωματολογία και λοίμωξη(37). Είναι γεγονός ότι η ισχυρότερη συσχέτιση μεταξύ EBV λοίμωξης και ανάπτυξης καρκίνου συναντάται στο αδιαφοροποίητο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα , το οποίο ενδημεί σε περιοχές όπως Νότια Κίνα και Νοτιοανατολική Ασία.(38,39). Τέλος αξίζει να επισημανθεί ότι αυτή η συσχέτιση ρινοφαρυγγικού ca με EBV προσβολή ανακαλύφθηκε με την παρατήρηση υψηλού τίτλου αντισωμάτων ορού έναντι αντιγόνων του ιού όπως είναι το αντίγονο του ιικού καψιδίου (VCA= viral capsid antigen) και το αντιγόνου πρώιμης διάχυσης (EAd/BMRF1)(40) και εν συνεχεία με τη διενέργεια πειραμάτων in situ υβριδισμού σε NPC κύτταρα (41)

Επιστρέφοντας πίσω στον RSV, εύκολα γίνεται αντιληπτό, ότι η ανεύρεση αυτού του πρώτου ογκογόνου ρετροϊού, άλλαξε ολοκληρωτικά την μελέτη του καρκίνου και έδωσε το έναυσμα για τη διεξοδική μελέτη των μοριακών μηχανισμών ογκογένεσης(42). Επιπλέον, η ανακάλυψη ενός ογκογόνου ιού αρχικά ενίσχυσε τις θεωρίες εκείνων που πίστευαν ότι όλες η σχεδόν όλες οι ασθένειες που προσβάλλουν τον άνθρωπο συσχετίζονται με κάποιο μολυσματικό παράγοντα .Μάλιστα το 1913 ένας Δανός ερευνητής Johannes Grib Fibiger επιχείρησε σε μια σειρά πειραμάτων του να αποδείξει ότι οι όγκοι στομάχου σε αρουραίους που μελετούσε είχαν αναπτυχθεί υστέρα από λοίμωξη από σκουλήκια του γένους *Spirpetra*. Ο Fibiger το 1926 βραβεύτηκε με το Νόμπελ ιατρικής φυσιολογίας, παρότι ένα χρόνο αργότερα από το θάνατο του, αποδείχθηκε ότι οι όγκοι που περιέγραφε στους αρουραίους επρόκειτο για μεταπλαστικό επιθήλιο ως απότοκο της ένδειας

βιταμινών που είχαν υποστεί οι συγκεκριμένοι αρουραίοι- ζούσαν σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας ζάχαρης και ως εκ τούτου τρέφονταν αποκλειστικά με ζαχαροκάλαμα(43)

Για σχεδόν μισό αιώνα, το ενδιαφέρον για την αιτιότητα του καρκίνου μετατοπίστηκε στη χημική καρκινογένεση (44-49). Η αναγέννηση της έρευνας για τους ογκογόνους ιούς ξεκίνησε το 1958 στο εργαστήριο του Renato Dulbecco, όπου ο μεταδιδακτορικός ερευνητής Harry Rubin και ο φοιτητής Howard Temin ανέπτυξαν μια βιοδοκιμασία ποσοτικού προσδιορισμού για τη μελέτη του μετασχηματισμού φυσιολογικών εμβρυικών ινοβλαστών κοτόπουλου όταν αυτοί βρεθούν υπό τη επίδραση του ιού RSV. Αναλυτικότερα, στο πείραμα τους παρατηρήθηκε ότι όταν ο ιός RSV εισήχθη σε πιάτα Petri , όπου καλλιεργούνταν με συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό εμβρυικοί ινοβλάστες, τα RSV(+) κύτταρα αποκτούσαν ένα εξελικτικό πλεονέκτημα και επιβίωναν για μεγάλο χρονικό διάστημα-ουσιαστικά ο ιός δρώντας με ένα δικό του μοναδικό μηχανισμό, παρασιτούσε εντός του κυττάρου ξενιστή εξωθώντας το σε επαναλαμβανόμενους κύκλους κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πιο συγκεκριμένα , σε επίπεδο μικροσκοπίου τα RSV (+) κύτταρα φέρονται να αποκτούν καρκινική μορφολογία. Για παράδειγμα ήταν συσσωρευμένα το ένα πάνω στο άλλο, με χαλαρές προσφύσεις μεταξύ τους, αποστρογγυλεμένα και διαθλαστικά με αυξημένο μέγεθος/αριθμό πυρηνίων και με μεταβολικό προφίλ συμβατό με αυτό του καρκινικού κυττάρου(50). Οι ανωτέρω παρατηρήσεις έμελλε να έρθουν σε αντιδιαστολή με το γνωστό μέχρι τότε μηχανισμό δράσης των άλλων ιών, όπου αρχικά ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο και εν συνεχεία πολλαπλασιάζεται εντός αυτού, σκοτώνοντας άμεσα το προσβεβλημένο κύτταρο ξενιστή και οδηγώντας στην απελευθέρωση μεγάλου πλήθους απογονικών ιικών σωματιδίων από το νεκρό κύτταρο -τα οποία με τη σειρά τους μολύνουν άλλα ευαίσθητα γειτονικά κύτταρα.- και έτσι αυτός ο κύκλος μόλυνσης, πολλαπλασιασμού και καταστροφής επαναλαμβάνεται με συνέπεια τη διασπορά του ιού και την πρόκληση κατά κανόνα συστηματικής συμπτωματολογίας. Πλέον μέσω του πειραματικού μοντέλου που όπως αναφέρθηκε ανέπτυξαν οι Harry Rubin και Howard Temin, κατέστη εφικτή η μελέτη του κυτταρικού μετασχηματισμού σε επίπεδο τρυβλίου και μεμονωμένων κυττάρων , πέραν του περίπλοκου και συνάμα δύσκολου στη μελέτη περιβάλλοντος ενός ζωντανού ιστού. Το 1966, ο Peyton Rous τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ για τη μελέτη του πάνω στον ιό RSV. Ο Peyton Rous σε μια ομιλία διαφορετική από τις άλλες επέλεξε να ξεκινήσει την ομιλία του ως έξης : Το καρκινικό κύτταρο καταστρέφει τον ανθρώπινο οργανισμό με

ένα μοναδικό και συνάμα ελκυστικό τρόπο , ως σάρκα της σάρκας του, έχοντας κατορθώσει να πολλαπλασιάζεται συνεχώς και ανεξέλεγκτα χωρίς να μπορεί να αναχαιτιστεί από τον ίδιο τον οργανισμό. (51) . Εν συνεχεία επικεντρώθηκε στην ιική ογκογένεση και στην ανακάλυψη του ιού RSV ,ενώ θέλησε να ολοκληρώσει την ομιλία του με ένα ελπιδοφόρο μήνυμα, καθώς όπως ανέφερε χαρακτηριστικά : Υπάρχουν λίγα παραδείγματα νεοπλασιών στον άνθρωπο όπως είναι ο καρκίνος του προστάτη , ή ορισμένες παιδικές λευχαιμίες , ή και το λέμφωμα Burkitt, που έχουν ήδη σημαντικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Τέλος υπογράμμισε την ανάγκη ανάδειξης των υποκείμενων μηχανισμών που εξωθούν ένα κύτταρο σε κακοήγη εξαλλαγή μετά την ιική προσβολή, καθώς και του μηχανισμού μέσω του οποίου μεταδίδεται ο καρκινικός φαινότυπος στα απογονικά κύτταρα κατά τη διαδικασία της διαίρεσης.(51)

Το επόμενο ερώτημα που αναδύθηκε ήταν το κατά ποσό ο κυτταρικός μετασχηματισμός οφείλετε ή όχι στην συνεχή παρουσία- επίδραση του γονιδιώματος του ιού RSV. Οι αρχικές εργασίες των Temin και Rubin κατέστησαν σαφές ότι οι απόγονοι ενός κυτάρου που είχε μολυνθεί από τον ιό RSV εξακολουθούσαν να φέρουν αντίγραφα του γονιδιώματος του. Το 1970 ένα πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο Berkeley ήρθε να διασαφηνίσει την κατάσταση. Για το συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε μια θερμοευαίσθητη μετάλλαξη του RSV , που ήταν ικανή να μετασχηματίσει τα κύτταρα κοτόπουλου όταν αυτά καλλιεργήθηκαν στην επιτρεπτή θερμοκρασία των 37°C , ενώ αντιθέτως όταν οι εν λόγω καλλιέργειες κυττάρων εκτέθηκαν στους 41°C , οι ινοβλάστες ανακτούσαν την αρχική τους μορφολογία. Τέλος παρατήρησαν ότι η επανέκθεση των καλλιεργειών στους 37°C οδηγούσε εκ νέου στην απόκτηση καρκινικού φαινοτύπου. Οι θερμοευαίσθητες μεταλλάξεις όπως αυτή κωδικοποιούν μερικώς ελαττωματικές πρωτεΐνες, οι οποίες διατηρούν την κανονική δομή τους και λειτουργούν σε μια επιτρεπτή θερμοκρασία , ενώ χάνουν τη λειτουργικότητα τους όταν εκτεθούν σε μια άλλη θερμοκρασία που ορίζεται ως μη επιτρεπτή, πιθανώς στα πλαίσια θερμικής μετουσίωσης της δομής της καθώς και μέσω επίδρασης στη τριτοταγή δομή της. Το συμπέρασμα που προέκυψε με την απώλεια του μετασχηματισμένου φαινοτύπου κατά την αλλαγή της θερμοκρασίας κατέδειξε ότι απαιτείται η συνεχής δράση ορισμένων θερμοευαίσθητων πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα μετασχηματιστικά γονίδια , για τη διατήρηση αυτού του φαινοτύπου. (52-54). Τέλος, το γεγονός της επαναφοράς του μετασχηματισμένου

φαινοτύπου με τη μείωση της θερμοκρασίας αποτελεί απόδειξη πως το ιικό γονιδίωμα εξακολουθεί να υπάρχει σε αυτά τα κύτταρα εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση , και παρά την κανονική τους μορφολογία. Χρόνια αργότερα, το Src ογκογονίδιο του RSV αποτέλεσε το πρότυπο για δεκάδες αλλά γονίδια μετασχηματισμού που φέρουν και άλλοι ογκογόνοι ιοί. Το προϊόν του ογκογονιδίου ανακαλύφθηκε από τους Brugge και Erikson το 1977 , και επρόκειτο για μια πρωτεΐνη με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης. (55,56)

2.3 DNA ογκογόνοι ιοί

Ο ρετροϊός RSV αποτέλεσε το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη των ογκογόνων ιών από τους ογκοβιολόγους , καθώς μέχρι το 1960 άλλες τέσσερις τάξεις ογκογόνων ιών βρέθηκαν στο προσκήνιο της κλινικής έρευνας. Αναλυτικότερα, το 1934 ο Richard Shope ανακάλυψε έναν νέο ιό ικανό να προκαλεί θηλώματα σε κουνέλια- έναν καλοήγη όγκο που όμως μπορεί σε σπάνιες περιπτώσεις να εξαλλαγεί σε καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του δέρματος (30). Περίπου δυο δεκαετίες αργότερα , κατέστη σαφές ότι ο ιός Shope διέφερε ουσιαστικά από τον ρετροϊό RSV, καθώς το γενετικό του υλικό ήταν DNA σε αντιδιαστολή με τον RSV ιό που όπως ήδη αναφέρθηκε ανήκει στην κατηγορία των RNA ιών, ενώ επιπλέον το πρωτεϊνικό του περίβλημά στερείται της επιπλέον λιπιδικής μεμβράνης που συναντάμε στον RSV. Στις δεκαετίες του 1950 και του 1960 απομονώθηκαν και άλλοι ογκογόνοι DNA ιοί -για παράδειγμα το 1953 έχουμε την ανακάλυψη του πολυιού , που όπως μαρτυράει και το όνομα του δύναται να προκαλέσει μια ποικιλία διακριτών όγκων στα ποντίκια.(57). Στα τέλη της δεκαετίας του 1950 σειρά έχει η ανακάλυψη του SV40 ιού , που αρχικά αναγνωρίστηκε ως μολυσματικός παράγοντας μέσα σε εμβόλια που είχαν αναπτυχθεί κατά του πολυιού και έκτοτε μελετήθηκε εις βάθος.(31) Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε πως σωματίδια του SV40 συχνά κρύβονταν στις καλλιέργειες των νεφρικών κυττάρων πιθήκων που είχαν χρησιμοποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό του πολυιού στο πλαίσιο της παρασκευής του εμβολίου, και η αναγνώριση του οφείλεται στο χαρακτηριστικό τους κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα. (31). Ο λυτικός κύκλος του ιού ξεκινά με τη δημιουργία πολλών και συνάμα μεγάλου μεγέθους κενοτοπίων και μέσα σε ένα εικοσιτετράωρο λαμβάνει χώρα η λύση του κυττάρου ξενιστή με συνοδό απελευθέρωση δεκάδων χιλιάδων θυγατρικών ιικών σωματιδίων . Προς μεγάλη έκπληξη των ερευνητών φάνηκε πως αυτό το χαρακτηριστικό λυτικό πρότυπο δεν αφορούσε κύτταρα που παρασκευάζονται από τρωκτικά-μη ευαίσθητος κυτταρικός πληθυσμός. Ο ιός SV40 δεν

μπορούσε να αναδιπλασιαστεί στα εν λόγω κύτταρα, τα οποίοι στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν και ως μη επιτρεπτοί ξενιστές. Παραδόξως, περιστασιακά, ένα κύτταρο μεταξύ αυτών μετασχηματιζόταν, αποκτούσε καρκινική μορφολογία, οδηγούταν σε ανεξέλεγκτους κύκλους κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με πλήρη αυτονόμηση από τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και έχοντας απωλέσει φυσικά την αναστολή λόγω επαφής. Επομένως ο ιός SV40 εμφάνιζε πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τον ήδη αναφερθέν ιό RSV, είχε την ικανότητα να επάγει την ανάπτυξη όγκων in vivo και για αυτό και έκτοτε ταξινομήθηκε στους DNA ογκογόνους ιούς.(31)

Ο ιός των θηλωμάτων του Shope (30) , ο πολυϊός του ποντικιού (57) και ο SV40 (31) ομαδοποιήθηκαν σε μια κοινή τάξη DNA ογκογόνων ιών γνωστή ως ραονα με κοινό χαρακτηριστικό την παρουσία κυκλικού δίκλωνου μορίου DNA στο γενετικό τους υλικό. (58). Από τα μέσα της δεκαετίας του 1960 και έπειτα οι ερευνητές εκμεταλλευόμενοι τα εύχρηστα αυτά μικρά κυκλικά μόρια, σε σύγκριση με τα πολύ μεγαλύτερα γραμμικά μόρια DNA που συναντάμε στα χρωμοσώματα των μολυσμένων κυττάρων-ξενιστών, μπόρεσαν να προβούν σε περαιτέρω μελέτη του ιικού γονιδιώματος και του καρκίνου. Ένας επιπλέον ιός, ο ανθρώπινος αδενοϊός , γνωστός ως τότε για τη πρόκληση λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού , ήρθε να προστεθεί το 1962 στη λίστα των ογκογόνων DNA ιών και μάλιστα με μηχανισμό δράσης ανάλογο με αυτό που αναφέρθηκε στον SV40. Με την εισαγωγή του σε μη επιτρεπτά κύτταρα(κύτταρα τρωκτικών) ο αδενοϊός δεν κατάφερε να αναδιπλασιαστεί ωστόσο μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη μετασχηματισμένων κλώνων με πολύ χαμηλή συχνότητα.(59). Τέλος, στη κατηγορία των ογκογόνων DNA ιών συμπεριλήφθηκαν μέλη της οικογένειας των ερπητοϊών. Ένας σχετικά απομακρυσμένος συγγενικός ερπητοϊός των πιθήκων Saimiri μπορούσε να προκαλέσει λεμφώματα με την έγχυση το σε πιθήκους άλλων ειδών.(60,61). Όπως έχει ήδη επισημανθεί και ένα άλλο απομακρυσμένο μέλος της οικογένειας των ερπητοϊών-ο ιός Epstein Barr EBV)-ανακαλύφθηκε ότι έχει αιτιολογική συσχέτιση και μάλιστα ισχυρή στην πρόκληση λεμφωμάτων Burkitt στα παιδιά με ενδημική κατανομή στην Ισημερινή Αφρική και στη Νέα Γουινέα, καθώς και σε ρινοφαρυγγικά νεοπλάσματα στην Νοτιοανατολική Ασία (32).Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σωματίδια του αδενοϊού και του ερπητοϊού περιέχουν μακρά γραμμικά δίκλινα μόρια DNA , πού όπως ακριβώς συμβαίνει και με τον RSV φέρουν γονίδια σχετικά με τον αναδιπλασιασμό του ιού, το σχηματισμό του καψιδίου του , αλλά

και γονίδια που σχετίζονται με τον επαγόμενο από ιούς κυτταρικό μετασχηματισμό. Το μεγάλο μέγεθος γονιδιώματος και καθ' επέκταση ο πολύ μεγαλύτερος αριθμός γονιδίων που φέρουν, τους καθιστά λιγότερο ελκυστικούς στη μελέτη της αιτιότητας της καρκίνου σε σύγκριση με τους ιούς ραονα. Λαμβάνοντας υπόψιν τους περιορισμούς της τότε εποχής η αλληλούχηση γονιδιωμάτων μεγάλης πολυπλοκότητας και η απομόνωση μεμονωμένων γονιδίων από αυτά ήταν πρακτικά ανέφικτη. Στο σήμερα η ταυτόχρονη μελέτη πολλών γονιδίων είναι σχεδόν ρουτίνα στην κλινική πρακτική (αλληλούχηση κατά Sanger) ενώ οδεύουμε σε μια νέα εποχή κατά τη οποία έχουμε τη δυνατότητα να αναλύουμε το συνολικό γονιδίωμα ενός κυττάρου μέσω next generation sequencing σε ελάχιστο χρόνο, έχοντας έτσι πρόσβαση στο σύνολο της γενετικής πληροφορίας και αποκτώντας ένα τεράστιο πλεονέκτημα στην διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. (42)

2.4. Ογκογόνοι ιοί στον άνθρωπο

Χρειάστηκε να μεσολαβήσουν περίπου 53 χρόνια μετά την αρχική παρατήρηση του Peyton Rous για την ανάπτυξη σαρκώματος με προβλεπόμενο χρονοδιάγραμμα από τον ιό RSV στο κοτόπουλο μέχρις ότου έρθει στο φως ο πρώτος ανθρώπινος ογκογόνος ιός, Epstein Barr, γνωστός και ως EBV ή ανθρώπινος ερπητοϊός 4 (HHV4). Οι Anthony Epstein, Bert Achong and Yvonne Barr το 1964 μέσω χρήσης ηλεκτρονικού μικροσκοπίου κατόρθωσαν να ταυτοποιήσουν τμήματα του ιού EBV σε κυτταρικές σειρές ασθενών Αφρικάνικης καταγωγής που νοσούσαν με λέμφωμα Burkitt (32). Οι επιστήμονες οδηγούμενη από την ιδιόμορφη γεωγραφική κατανομή αυτής της νόσου πρότειναν ως περιβαλλοντική επίδραση στην ανάπτυξη κακοήθειας, την προσβολή από έναν τέτοιο ογκογόνο ιό, που ήταν ικανός να μετασχηματίζει τα ανθρώπινα κύτταρα. Αυτή η παρατήρηση σε επίπεδο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ώθησε και άλλους ερευνητές να αναζητήσουν πιθανούς ανθρώπινους ογκογόνους ιούς με τον ίδιο τρόπο, παρότι όπως αποδείχθηκε στη πορεία οι περισσότεροι εξ αυτών δεν μπορούν να ανιχνευτούν σε επίπεδο ηλεκτρονικής μικροσκόπησης καθώς δεν χρειάζεται να πολλαπλασιαστούν για να προκαλέσουν κακοήθη εξαλλαγή του κυττάρου. Ωστόσο, λίγο καιρό αργότερα φάνηκε πως ενώ τα λεμφώματα Burkitt της Αφρικής και της Νέας Γουινέας ήταν κατά κανόνα EBV (+), κάτι τέτοιο δεν ίσχυε και για τα σποραδικά λεμφώματα που συχνά παρουσιάζονταν ως EBV(-), και έφεραν ως γονιδιακή υπογραφή την διαμετάθεση *MYC-IgH* ή *MYC-IgLs* (62). Έτσι δημιουργήθηκε ένα ερωτηματικό

αναφορικά με το εάν η EBV λοίμωξη αποτελεί αναγκαία και ικανή συνθήκη για την πρόκληση καρκίνου στον άνθρωπο(63).

Στο σήμερα, έξι επιπλέον ογκογόνοι ιοί έχουν ταυτοποιηθεί ικανοί να επάγουν την ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο. Επιπλέον ιοί συνεχώς προτείνονται ως υποψήφιοι ογκογόνοι ιοί στον άνθρωπο, παρόλα αυτά η συμμετοχή τους είναι αμφιλεγόμενη και μένει να αποδειχθεί σε προσεχείς μελέτες το κατά ποσό συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη όγκου. Για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα οι ογκοβιολόγοι επικεντρώθηκαν στην ανακάλυψη και άλλων ρετροϊών όπως ο RSV που επάγουν την καρκινογένεση με αποτέλεσμα την ανάδειξη άλλων δυο μελών: του HTLV-1 (ανθρώπινος T λεμφοτρόπος ιός) και του HIV-1 και HIV-2(ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας). Όπως φάνηκε ο ιός HIV δεν προκαλεί άμεσα καρκίνο, ωστόσο μέσω της επαγόμενης από τον ιό ανοσοκαταστολής δημιουργείται ένα υπόστρωμα για την ανάπτυξη όγκων από άλλους παράγοντες καθώς και από άλλους ιούς(64).

Επίσης αξίζει να επισημανθεί ότι όλοι σχεδόν οι ογκογόνοι ιοί έχουν στενούς συγγενικούς ιούς οι οποίοι δεν σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενώ πολλοί ιοί έχουν τη δυναμική να προκαλέσουν καρκίνο τελικά ένα πολύ μικρό ποσοστό εξ αυτών προκαλούν. Όπως ήδη επισημάνθηκε οι παραδοσιακές ιολογικές τεχνικές έχουν περιορισμένες δυνατότητες στην ανίχνευση ογκογόνων ιών , και πλην του EBV , μόνο ο ιός HTLV-1 μπόρεσε να ανιχνευθεί και να μελετηθεί σε επίπεδο κυτταροκαλλιιεργειών και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας(65,66).Λίγο καιρό αργότερα η ανακάλυψη του ογκογόνου ιού επιβεβαιώθηκε σε μια νέα σειρά πειραμάτων από τους Hinuma, Isao Miyoshi και τους συνεργάτες του (67).Αναλυτικότερα, το 1980 ο ιός HTLV-1 ανακαλύφθηκε από τους Bernard Poiesz, Robert Gallo και τους συνεργάτες τους από κυτταρικές σειρές που δημιουργήθηκαν από μια περίπτωση του πρόσφατα περιγραφέντος κλινικού συνδρόμου T κυτταρικής λευχαιμίας/λεμφώματος των ενήλικων, που μέχρι τότε χαρακτηριζόταν ως σπογγοειδής μυκητίαση (66,68-70). Λίγο καιρό αργότερα η ανακάλυψη του ογκογόνου ιού επιβεβαιώθηκε σε μια νέα σειρά πειραμάτων από τους Hinuma, Isao Miyoshi και τους συνεργάτες τους(67).

Η σπογγοειδής μυκητίαση, γνωστή και ως σύνδρομο Alibert-Bazin, είναι ένα T-δερματικό non-Hodgkin λέμφωμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από διήθηση του δέρματος από κακοήθη

T-λεμφοκύτταρα. Η μετάπτωση σε σύνδρομο Sezary ορίζεται ως αριθμός κακοηθών κυττάρων («εγκεφαλοειδή» μονοπύρηνια, κύτταρα Sezary) που κυκλοφορούν στο αίμα σε επίπεδα πάνω από 1000 κύτταρα/mm³. Παρόλο που η σπογγοειδής μυκητίαση είναι το πιο συχνό T-δερματικό λέμφωμα παραμένει μία πολύ σπάνια νόσος. Η επίπτωσή της είναι 6 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος και υπολογίζεται ότι αυτό αντιστοιχεί στο 4% όλων των non-Hodgkin λεμφωμάτων. (71)

Στα μέσα της δεκαετίας του 1960, σειρά είχε η ανακάλυψη του ιού HBV, λίγο καιρό έπειτα από την ανακάλυψη του EBV, από τον Baruch Blumberg, ο οποίος μάλιστα τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1976. Ο ιός HBV μόλις πρόσφατα απομονώθηκε σε κυτταρικές καλλιέργειες, ενώ αρχικά είχε συσχετιστεί μόνο με την ανάπτυξη οξείας ηπατίτιδας και όχι με την ανάπτυξη καρκίνου(72,73). Η συσχέτιση του HBV με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, καθιερώθηκε περίπου μια δεκαετία αργότερα από τον Besley και τους συνεργάτες του(74)μέσω διαχρονικών μελετών σε κοόρτες ασφαλιστικών εταιρειών της Ταϊβάν. Οι εναπομείναντες τέσσερις ιοί(που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπό) εντοπίστηκαν μέσω της μοριακής βιολογίας σαν γενετικά στοιχεία, χωρίς να γίνει χρήση των παλαιότερων ιολογικών τεχνικών.

Ήδη από το 1840, υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις ότι η σεξουαλική δραστηριότητα αποτελούσε έναν καθοριστικό παράγοντα κινδύνου στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Μάλιστα ο ερευνητής Harald zur Hausen συσχέτισε το γεγονός αυτό με τους papillomaviruses, λόγω του κεντρικού ρόλου που διαθέτουν στην ανάπτυξη των σεξουαλικά μεταδιδόμενων κονδυλωμάτων των γεννητικών οργάνων(75). Αυτός και οι συνεργάτες του προχώρησαν σε πειράματα συν-υβριδοποίησης μεταξύ DNA που προερχόταν από ιούς των κονδυλωμάτων και από κύτταρα καρκίνου τράχηλου της μήτρας, με αποτέλεσμα την ανακάλυψη δύο στελεχών υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του τράχηλου της μήτρας (HPV-16 and HPV-18), στις αρχές του 1980(76,77). Ουσιαστικά σε αυτά τα πειράματα παρατηρήθηκε ότι στους περισσότερους καρκίνους τράχηλου μήτρας ήταν ανιχνεύσιμα τα συγκεκριμένα στελέχη. Ομοίως με τον HBV και ο ιός HPV διαδίδεται κατά κανόνα ελάχιστα στην καλλιέργεια, στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, παρότι ανιχνεύεται ως ενσωματωμένος μη παραγωγικός ιός στα κύτταρα HeLa (76,77). Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, οι Qui-Lim Choo, Michael Houghton,

Daniel Bradley και οι συνεργάτες τους, ανέδειξαν επιπλέον παράγοντες που σχετίζονταν με την πρόκληση ηπατίτιδας σχετιζόμενης με μετάγγιση , μέσω ανίχνευσης ενός πάνελ αντισωμάτων μια τυχαίας εκκινημένης βιβλιοθήκης cDNA από τον ορό των πειραματικά μολυσμένων χιμπατζήδων. Αυτός ο ιός αρχικά χαρακτηρίστηκε με τον περιγραφικό όρο ως μηΑ -μηΒ ιός της ηπατίτιδας , που μετονομάστηκε έπειτα το 1989 με την απομόνωση του γενετικού του υλικού σε HCV (ή αλλιώς ιό της ηπατίτιδας C). (78).Όπως αποδείχθηκε, και ο εν λόγω ιός σχετίζεται με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στον άνθρωπο, ενώ μόλις πρόσφατα κατορθώσαμε να τον απομονώσουμε σε κυτταρικές σειρές(79).Τέλος, το 1994 έγινε η ανακάλυψη του KSHV που εμπλέκεται στην ανάπτυξη σαρκώματος Karosi (80) για να ακολουθήσει το 2008 η ανακάλυψη του ιού MSV που συναντάμε στο καρκίνωμα από κύτταρα Merkel (81).Η απομόνωση και των δύο αυτών ιών βασίστηκε σε πειράματα εξαγωγής DNA από το κύτταρο, παρότι η συνολική πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε διέφερε ολοκληρωτικά. Έτσι για άλλη μια φορά γίνεται αντιληπτό, πως οι νεότεροι μέθοδοι γενετικής μπορούν να ανιχνεύσουν ογκογόνους ιούς με μεγαλύτερη ευαισθησία, ενώ οι καθιερωμένες τακτικές όπως η ανάπτυξη καλλιιεργειών και η μετέπειτα παρακολούθηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο συχνά αποτυγχάνουν στο πεδίο της ιικής ογκολογίας.

Μια επιπλέον παρανόηση ήταν η καθυστερημένη διαπίστωση ότι η μεμονωμένη ιική προσβολή δεν επαρκεί για την ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο, πέραν εξατομικευμένων περιπτώσεων ιών, όπως είναι ο KSHV στο σάρκωμα Karosi και αντιστοίχως ο HPV στον καρκίνο του τράχηλου της μήτρας. Σε αντιδιαστολή , οι ιοί HBV, HCV καθώς και τα χημικά καρκινογόνα συμμετέχουν στη διαμόρφωση του συνολικά αποδιδόμενου κίνδυνου για ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος, χωρίς όμως κανένας από αυτούς τους παράγοντες να αρκεί για την ανάπτυξη καρκίνου(82). Τέλος σημαντική συνιστώσα για τον εάν τελικά θα τελεσφορήσει η εξαλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου προς ένα καρκινικό κύτταρο συνιστά η κατάσταση ετοιμότητας που βρίσκεται το ανοσοποιητικό σύστημα του κάθε ατόμου, κατά τη στιγμή της έκθεσης σε ένα εν δυνάμει ογκογόνο ιό. Το ανωτέρω επιβεβαιώνεται με την αναγνώριση μετάλλαξης της SAP πρωτεΐνης (signalling lymphocytic activation molecule- associated protein) σε άντρες ασθενείς που οδηγεί σε ανοσοανεπάρκεια και στην εκδήλωση φυλοσύνδετου λεφουπερπλαστικού συνδρόμου μετά από EBV λοίμωξη(83,84).Η συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στην

εκδήλωση σαρκώματος Karosi έπειτα από προσβολή από τον ιό KSHV εξακριβώθηκε με την απλή παρατήρηση ότι η συχνότητα του σαρκώματος Karosi πριν την εμφάνιση του AIDS δεν ξεπερνούσε τα τρία περιστατικά ανά ένα εκατομμύριο πληθυσμό τον χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, με την επίπτωση του να αυξάνεται κατά δεκάδες χιλιάδες φορές περισσότερο μεταξύ των ασθενών που είχαν προσβληθεί από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας.(85-93).

Ιοί	Γονιδίωμα	Κακοήθεια	Έτος ανακάλυψης	Πηγή
Erstein-Barr (EBV : επίσης γνωστός ως ανθρώπινος ερπητοϊός 4(HHV4)	Διπλόκλωνο DNA	Στην πλειοψηφία των λεμφωμάτων Burkitt καθώς και των ρινοφαρυγγικών καρκινωμάτων, στις περισσότερες λεμφουπερπλαστικές διαταραχές, και σε ορισμένα Hodgkin και non Hodgkin λεμφώματα , καθώς και σε ορισμένα λεμφώματα του ΓΕΣ	1964	32
Ιός της ηπατίτιδας Β (HBV)	Μονόκλωνο και Διπλόκλωνο DNA	Ορισμένες Περιπτώσεις Ηπατοκυτταρικού Καρκινώματος	1965	72
Ανθρώπινος λεμφοτρόπος ιός Ι (HTLV-I)	Θετικό Μονόκλωνο RNA	Τ κυτταρική λευχαιμία των ενηλίκων	1980	66
Υψηλού ρίσκου στελέχη των ιών των ανθρωπίνων κονδυλωμάτων (HPV16, HPV18) καθώς και ορισμένα επιπλέον δυνητικά καρκινογόνα στελέχη)	Διπλόκλωνο DNA	Στους περισσότερους καρκίνους τραχήλου μήτρας, στους περισσότερους καρκίνους του πέους, και σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνων της ουρογεννητικής οδού καθώς και κεφαλής τραχήλου	1983-1984	76,77
Ιός της ηπατίτιδας C (HCV)	Θετικό Μονόκλωνο RNA	Σε ορισμένες περιπτώσεις ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων και σε ορισμένες κατηγορίες λεμφωμάτων	1989	78
Ιός του σαρκώματος Karosi KSHV : επίσης γνωστός ως ανθρώπινος ερπητοϊός 8 (HHV8)	Διπλόκλωνο DNA	Στο σάρκωμα Karosi, σε ορισμένα λεμφώματα και στη νόσο Castleman	1994	80
Merkel cell πολιοϊός (MSV)	Διπλόκλωνο DNA	Στα περισσότερα καρκινώματα από κύτταρα Merkel	2008	81

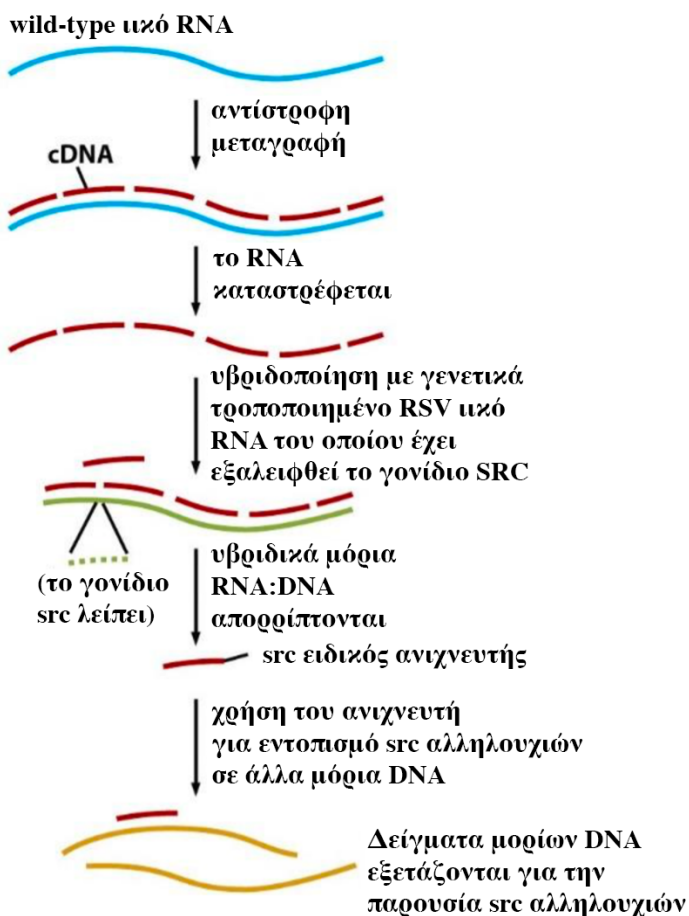
Πίνακας Προσαρμοσμένος από άρθρο : Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology, DOI: [10.1038/nrc2961](https://doi.org/10.1038/nrc2961)

3)Κυτταρική προέλευση των ρετροϊκών ογκογονιδίων

Το 1961, αποδείχθηκε ότι ο RSV διαθέτει μονόκλωνο RNA γενετικό υλικό (94), του οποίου η συνεχής παρουσία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του κυτταρικού μετασχηματισμού. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου το ιικό RNA κατορθώνει να ενσωματωθεί στο DNA γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή παρέμεινε αδιευκρίνιστο, μέχρι την ανακάλυψη του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το 1970, η ταυτόχρονη έρευνα των Temin και Baltimore, οδήγησε στην ανακάλυψη της αντίστροφης μεταγραφάσης, ενός ενζύμου που όπως αποδείχθηκε ήταν ικανό να καταλύει μια διαδικασία μεταγραφής από ιικό RNA σε ιικό DNA (95). Το εν λόγω ένζυμο ήταν όπως φάνηκε παρόν στον ιό RSV, εξυπηρετώντας την μετατροπή του μονόκλωνου RNA του ιού σε δίκλωνο DNA. Αναλυτικότερα, η αντίστροφη μεταγραφάση σε πρώτη φάση φτιάχνει ένα μονόκλωνο DNA, χρησιμοποιώντας το ιικό RNA σαν καλούπι για τη διαδικασία της μεταγραφής, και εν συνεχεία βάση του νόμου της συμπληρωματικότητας λειτουργώντας σαν μια DNA πολυμεράση, συνθέτει το συμπληρωματικό κλώνο, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός δίκλωνου αντιγράφου DNA από το αρχικό ιικό RNA. Ακολούθως, το αντίστροφα μεταγραμμένο DNA μετακινείται στον πυρήνα και μέσω της ιντεγκράσης (ενός άλλου ενζύμου που επίσης κωδικοποιείται στο γενετικό υλικό του RSV) ενσωματώνεται στο χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου ξενιστή.(96). Τέλος, ο προκύπτων ενσωματωμένος ιός επωφελείται των μηχανισμών και των ενζύμων του κυττάρου ξενιστή, όπως είναι η RNA πολυμεράση για να μεταγραφεί προκειμένου να παραχθούν απογονικά ιικά μόρια RNA, τα οποία αφότου εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα θα χρησιμεύσουν είτε ως mRNAs δημιουργώντας έτσι νέες ιικές πρωτεΐνες, είτε θα πακεταριστούν σε απογονικά ιικά σωματίδια που θα εγκαταλείψουν το κύτταρο προκειμένου να ξεκινήσουν έναν νέο κύκλο μόλυνσης.

Αρχικά, εθεωρείτο δεδομένο ότι αντίγραφο του γονιδίου Src θα μπορούσαμε να συναντήσουμε μόνο σε μολυσμένα από τον ιό κύτταρα, ή αλλιώς RSV(+) κύτταρα, ωστόσο αποδείχθηκε ότι μια έκδοση του γονιδίου Src που διαθέτει ο ιός RSV, είναι παρούσα και σε μη μολυσμένα από τον ιό κύτταρα, ή αλλιώς RSV (-) κύτταρα. (97-100). Το 1974, μετά και την ανακάλυψη της αντίστροφης μεταγραφάσης, που όπως αποδείχθηκε αποτέλεσε ένα εξαιρετικό εργαλείο στα χέρια των ογκοβιολόγων, ο J.Michael Bishop και ο Harold Varmus, ανέλαβαν να σχεδιάσουν μέσω αυτής, έναν ειδικό ανιχνευτή DNA που θα μπορούσε να

αναγνωρίζει ειδικά τις αλληλουχίες του γονιδιώματος του RSV που σχετίζονται με το μετασχηματισμό- εν προκειμένω το γονίδιο Src . Θεώρησαν ότι μέσω αυτού του ειδικού ανιχνευτή θα κατόρθωναν να διαλευκάνουν την προέλευση του μετασχηματιστικού γονιδίου και την ακριβή λειτουργία του. Το πρωτόκολλο κατασκευής αυτού του ιχνηθέτη - Src DNA ανιχνευτή ήταν το εξής: αρχικά το RNA του RSV άγριου τύπου(wild type) μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης μετατράπηκε σε μονόκλωνο συμπληρωματικό μόριο DNA (cDNA), το οποίο εν συνεχεία υβριδοποιήθηκε με το ικό RNA ενός γενετικά τροποποιημένου RSV ιού- μεταλλάγματος RSV , στον οποίο είχε εξαλειφθεί το γονίδιο Src και επομένως είχε απωλέσει την ικανότητα μετασχηματισμού. Έπειτα ακολούθησε μέσω ειδικής κατεργασίας η απόρριψη αυτών των υβριδίων, αφήνοντας πίσω ουσιαστικά το μοναδικό τμήμα που δεν είχε κατορθώσει να υβριδοποιηθεί βάση του νόμου της συμπληρωματικότητας με το RNA του μεταλλάγματος. Τέλος , αυτό το εναπομένον θραύσμα σημάνθηκε με ραδιενέργεια , συνιστώντας έτσι έναν ειδικό ανιχνευτή σχετιζόμενο με το Src ,που θα ήταν ο οδηγός μας στη διαδικασία σήμανσης της αλληλουχίας σε διάφορα κυτταρικά DNA.

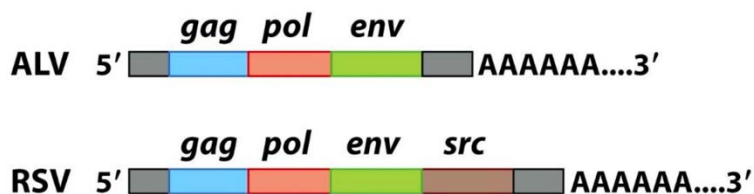


Reference :The biology of cancer, 2nd edition, Robert A. Weinberg

Προς έκπληξη όλων, οι Bishop και Varmus σε πειράματα που διενέργησαν το έτος 1975, παρατήρησαν ότι ο ανιχνευτής αυτός του γονιδίου Src μπορούσε να υβριδοποιηθεί και με γενετικό υλικό που προερχόταν και από μη μολυσμένα από τον RSV ιό κύτταρα κοτόπουλου καθώς και άλλων εξελικτικά κοντινών ειδών(δηλαδή δύο αντίγραφα των σχετικών με το Src αλληλουχιών υπήρχαν ανά γονιδίωμα διπλοειδούς κυττάρου κοτόπουλου) (97,99,100). Αρχικά υπέθεσαν ότι η ανίχνευσή τους οφειλόταν σε εισαγωγή τους μέσω κάποιου ρετροϊού, γεγονός που όμως απορρίφθηκε γρήγορα, μετά από τον προσεκτικό χαρακτηρισμό αυτών των αλληλουχιών Src. Επιπλέον, η παρουσία αλληλουχιών Src δεν μπορούσε να αποδοθεί σε κάποιο πιθανό λάθος της διαδικασίας υβριδισμού, η οποία ενώ έλαβε χώρα για επανειλημμένους κύκλους , δεν παρουσίασε καμία διαφοροποίηση, και η αλληλουχία συνέχιζε να παραμένει ανιχνεύσιμη σε μη μολυσμένα από τον ιό κύτταρα. Επίσης , παρατήρησαν ότι ο βαθμός υβριδοποίησης του ανιχνευτή Src με το DNA του κυττάρου ήταν πιο ισχυρός με το κύτταρο του κοτόπουλου, και γινόταν ασθενέστερος όσο πιο απομακρυσμένη ήταν η εξελικτική συγγένεια ενός είδους με το κοτόπουλο. Ως εκ τούτου πρότειναν ότι το γονίδιο Src προϋπήρχε στα κύτταρα του κοτόπουλου και ο ιός έκλεψε το γονίδιο αυτό από το κοτόπουλο. Αύτη ήταν εν προκειμένω και η αναμενόμενη συμπεριφορά ενός κυτταρικού γονιδίου που υπήρχε στο γονιδίωμα ενός κοινού προγονικού είδους, και παρότι καλά συντηρημένο είχε αποκτήσει κάποιες όλο και πιο αποκλίνουσες αλληλουχίες DNA καθώς τα απογονικά είδη εξελίχθηκαν προοδευτικά, με το πέρασμα εκατομμυρίων ετών. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, διατυπώθηκε η ιδέα ότι οι Src αλληλουχίες που εντοπίζονταν στο γονιδίωμα των μη μολυσμένων κυττάρων, διέθεταν όλες τις ιδιότητες ενός φυσιολογικού γονιδίου . Αυτή η παρατήρηση έμελλε να αλλάξει σε βάθος τη θεώρηση που είχαμε μέχρι τότε για την αιτιότητα του καρκίνου, ενώ ανέδειξε την ύπαρξη κυτταρικής εκδοχής του Src. (c-Src) (97-101).

Επόμενο λογικό ερώτημα που τέθηκε ήταν το σε τι διαφέρει το κυτταρικό γονίδιο (c-Src) σε σχέση με την ιική εκδοχή του (v-Src), που μεταφέρεται από το γονιδίωμα του RSV, και τι καθιστά το μεν πρώτο ένα φυσιολογικό κυτταρικό γονίδιο , απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη του κυττάρου, και το δε άλλο μεταλλαξιγόνο-καρκινογόνο, με δραστικότητα ισχυρού ογκογονιδίου. Μεταξύ των ετών 1976-1980 το ενδιαφέρον των

ερευνητών επικεντρώθηκε στη σύγκριση μεταξύ αυτών των δύο γονιδίων που ενώ μοιάζανε εκπληκτικά πολύ, διέφεραν εξολοκλήρου ως προς τη δράση που ασκούσαν στο κύτταρο. Η εξήγηση που δόθηκε ήταν απλή : υπέθεσαν ότι το γονίδιο Src του RSV δεν ήταν φυσικώς παρόν στον αρχέγονο ρετροϊό RSV(RSV ιός=Src positive). Έπειτα αποδείχθηκε ότι ουσιαστικά υφίσταντο ένας προϋπάρχον ιός Src αρνητικός, που ονομάστηκε ALV ιός(ALV ιός =Src negative), , που μέχρι τότε ήταν υπεύθυνός για την πρόκληση λεύκωσης στα πτηνά. Αυτός ο ιός μέσω χρήσης γενετικών τεχνασμάτων κατόρθωσε να ενσωματώσει αλληλουχίες από το γονιδίωμα ενός μολυσμένου κύτταρου πτηνού με λεύκωση , κερδίζοντας έτσι ένα τέταρτο ουσιαστικά γονίδιο που ενσωματώθηκε σε μια τυχαία θέση στο γονιδίωμα του, και ήταν ικανό από μόνο του να του προσδώσει την ικανότητα μετασχηματισμού και εξαλλαγής του φυσιολογικού φαινοτύπου προς ένα καρκινικό φαινότυπο. Διαδοχικά πειράματα επιβεβαίωσαν τα ανωτέρω και πιστοποίησαν τη στενή σχέση μεταξύ της δομής του RSV και αυτού του κοινού μολυσματικού παράγοντα των πτηνών. (97-102). Κοινά γονίδια που συναντάμε και στους δύο ιούς είναι τα εξής τρία: gag, pol, env . Ουσιαστικά το γονίδιο gag κωδικοποιεί πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του νουκλεοπρωτεϊνικού πυρήνα μαζί με το ιικό RNA , το γονίδιο pol κωδικοποιεί τα ένζυμα ιντεγκράση και αντίστροφη μεταγραφάση, και τέλος το γονίδιο env που καθορίζει τις προεκβολές της γλυκοπρωτεΐνης του ιοσωματίου. Η μόνη ανιχνεύσιμη διαφορά μεταξύ των δύο γονιδιωμάτων έγκειται στην παρουσία του Src γονιδίου που προσδίδει στον ιό την ικανότητα να μετασχηματίζει τα προσβεβλημένα κύτταρα σε καρκινικά κύτταρα. (101,102). Το 1975 , αποδόθηκε το βραβείο Νόμπελ στους Temin και Baltimore για την ανακάλυψη της αντίστροφης μεταγραφάσης. (95,96).



Reference :The biology of cancer, 2nd edition, Robert A. Weinberg

Οι ανωτέρω παρατηρήσεις οδήγησαν τους ερευνητές σε τρία πολύτιμα συμπεράσματα, επαναστατικά σύμφωνα με την μέχρι τότε γνώση. Πρώτον , όπως ήδη αναφέρθηκε οι ρετροϊοί είχαν την ικανότητα να συλλέγουν και να εκμεταλλεύονται προϋπάρχοντα

κυτταρικά γονίδια για δικό τους σκοπό(=απόκτηση ικανότητας μετασχηματισμού). Δεύτερον, κατέστη σαφές ότι όλες οι μετασχηματιστικές δυνάμεις του RSV ήταν απότοκος της ύπαρξης ενός και μόνο γονιδίου στο γονιδίωμα του(v-Src γονίδιο). Τρίτον, και ίσως και το σημαντικότερο εισήχθη για πρώτη φορά η έννοια του πρώτο-ογκογονιδίου, ενός γονιδίου που ουσιαστικά φαίνεται να αποτελεί τη πρόδρομη μορφή ενός ενεργού ογκογονιδίου, και προκύπτει ύστερα από κάποια ελαφρά αναδιαμόρφωση, όπως είναι πχ η ενσωμάτωση ενός προιού. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι η γενετική πληροφορία για ανάπτυξη καρκίνου είναι ήδη παρούσα στον κυτταρικό οργανισμό και μέσω κάποιων μηχανισμών δύναται να ενεργοποιηθεί και να προάγει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και την ανάπτυξη μεταστατικού φαινοτύπου.

4)Χημική καρκινογένεση

Από το 1980 και έπειτα, οι ρετροϊοί χρησιμοποιήθηκαν ως ραδιοϊχνηθέτες για την ανίχνευση των αντίστοιχων πρώτο-ογκογονιδίων στον άνθρωπο, και το ενδιαφέρον της έρευνας μετατοπίστηκε στη χημική καρκινογένεση. (103-105). Οι ιοί πλέον αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των ερευνητών προκρινόμενου να μπορέσουν να ανιχνεύσουν τα γονίδια αυτά. Ένα νέο πεδίο έρευνας, αυτό της χημικής καρκινογένεσης έρχεται στο επίκεντρο με διαδοχικά πειράματα να λαμβάνουν χώρα και να εμπλουτίζουν τη γνώση μας γύρω από τον καρκίνο. Αναλυτικότερα, οι πρώτες αναφορές σε σχέση με τη χημική καρκινογένεση χρονολογούνται ήδη από το 1761 όταν ο δρ J.Hill παρατήρησε πως άτομα που εισπνέου καπνό αναπτύσσουν πολύ συχνότερα καρκίνο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Ενώ το 1775 ο Sir Percival Pott, συσχετίζει την αιθάλη με την ανάπτυξη όγκων του όσχεου σε καπνοδοχοκαθαριστές.(106) Έπειτα, το 1917 ακολούθησε το πείραμα του Ιάπωνα ιατρού K.Yamagiwa , όπου σύμφωνα με το πρωτόκολλο 137 κουνέλια αλείφθηκαν με πίσσα από κάρβουνο 2-3 φορές την ημέρα για τρεις μήνες συνεχόμενα και ένα χρόνο αργότερα παρατήρησε ότι 7 εξ αυτών είχαν αναπτύξει καρκίνο. (107)Το 1933, ο Cook και οι συνεργάτες του κατόρθωσαν να κρυσταλλώσουν από την πίσσα το βενζοπυρένιο, το οποίο συγκαταλέγεται στην οικογένεια των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων , που είναι μέχρι σήμερα γνωστοί για τη πρόκληση μιας μεγάλης ομάδας κακοηθειών στον άνθρωπο.(108)

Αναλυτικότερα, το 7,12- διμέθυλο-βενζοανθρακένιο (DMBA) είναι ένα ισχυρό χημικό καρκινογόνο, της οικογένειας των αρωματικών πολυκυκλικών υδρογονανθράκων, το οποίο απαντάται τόσο στον καπνό του τσιγάρου, όσο και στα ψημένα καπνιστά κρέατα και χρησιμοποιείται ευρέως στα πλαίσια των πειραμάτων χημικής καρκινογένεσης. Μάλιστα αποδείχθηκε ότι το DMBA είναι υπεύθυνο για τη μετάλλαξη του γονιδίου Harvey-Ras, που όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια εκτενώς, ευθύνεται για την πρόκληση πολλών διαφορετικών τύπων καρκίνου στον άνθρωπο με συχνότερη εμφάνιση στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ακολούθησαν μια σειρά πειραμάτων επαγωγής χημικής καρκινογένεσης και εν συνεχεία επιμόλυνσης κυτταρικών σειρών, όπου αποδείχθηκε ότι η ικανότητα των μετασχηματισμένων κυττάρων να μεταφέρουν τον φαινότυπο που είχαν αποκτήσει ύστερα από την επίδραση συγκεκριμένων χημικών καρκινογόνων οφείλεται σε ενεργοποιημένα αλληλόμορφα γονίδια που λειτουργούν μάλιστα με επικρατή τρόπο. (109). Πιο συγκεκριμένα, στο πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες ποντικού, αρουραίου και κοτόπουλου, οι οποίοι μετά τη επίδραση κάποιων συγκεκριμένων χημικών καρκινογόνων όπως είναι το DMBA, μετασχηματίστηκαν και απέκτησαν καρκινικό φαινότυπο. Στη συνέχεια, κάνοντας χρήση της μεθόδου φωσφορικού ασβεστίου, κατόρθωσαν να μειώσουν την αντίσταση της κυτταρικής μεμβράνης, προκειμένου να ανοίξουν οι μεμβρανικοί πόροι και να εξαχθεί το DNA του μετασχηματισμένου από χημικά καρκινογόνα κυττάρου. Έπειτα, κάνοντας εκ νέου χρήση της μεθόδου αυτής στη μεμβράνη κυττάρων NIH3T3, κατόρθωσαν να εισαγάγουν το DNA που είχαν απομονώσει, και παρατήρησαν ότι τα κύτταρα αυτά αρχίσαν να εξαλλάσσονται σε καρκινικά, με μορφολογία και δραστικότητα όμοια των αρχικών καρκινικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, επιβεβαιώθηκε η μεταλλαξιγόνο δράση των χημικών καρκινογόνων, τα οποία δρουν σε επίπεδο DNA γενετικού υλικού.(109,110)

Επομένως στόχος, η απομόνωση των μεμονωμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών-γονιδίων που ευθύνονται για την εξαλλαγή του φαινοτύπου. Πληθώρα εργασιών έλαβαν χώρα, προκειμένου να αποκαλυφθούν τα υπεύθυνα γονίδια, με εμβληματικότερη όλων την ανακάλυψη του ογκογονιδίου που ήταν ομόλογο με το αντίστοιχο γονίδιο Ras του ιού του σαρκώματος Harvey, και μπορούσε να προάγει την ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστεως στον άνθρωπο.(111-114) Επομένως επιβεβαιώθηκε εκ νέου το συμπέρασμα των υποστηρικτών της ιικής ογκολογίας περί κυτταρικής προέλευσης των ρετροϊκών

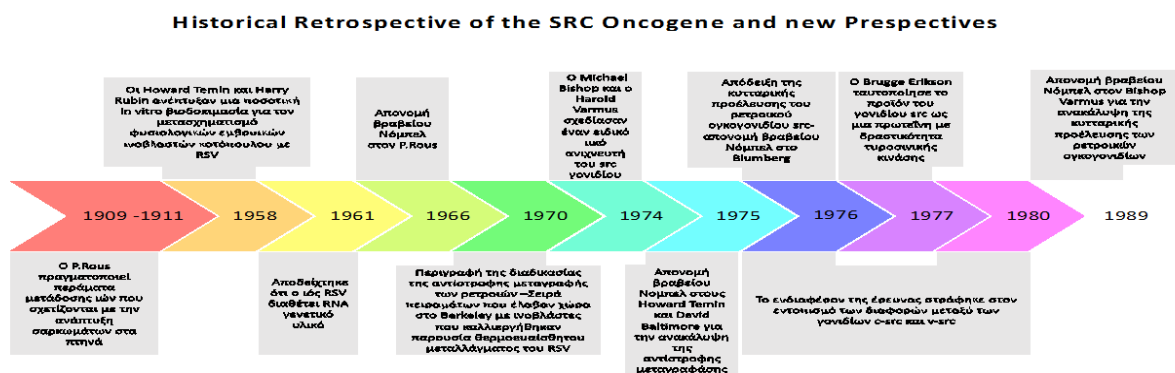
ογκογονιδίων. Μάλιστα το 1982 δυο πρωτότυπες εργασίες αναδεικνύουν πιθανούς μηχανισμούς ενεργοποίησης πρώτο-ογκογονιδίων στον άνθρωπο , δίνοντας έμφαση κυρίως σε σημειακές μεταλλάξεις,(115-116)ενώ το 1983 ο Daniel J. Caron και οι συνεργάτες του θα δημοσιεύσουν σχετική εργασία όπου για πρώτη φορά θα παρουσιαστεί η πλήρη αλληλούχηση του γονιδίου H-ras (117).Τέλος, τα ανωτέρω διαδέχθηκαν πειράματα του A.Balmain και των συνεργατών του που επιβεβαίωναν και σε ζωντανούς οργανισμούς , και συγκεκριμένα σε ποντίκια, τον ρόλο του ογκογονιδίου H-ras στον μετασχηματισμό των κυττάρων με χημικά καρκινογόνα, και μάλιστα την εμπλοκή του συγκεκριμένου πρώτο-ογκογονιδίου σε συγκεκριμένο στάδιο της καρκινογένεσης.(118,119). Ο Allan Balmain σε μετέπειτα πειράματα ανέδειξε την επαγόμενη μετάλλαξη του κυτταρικού γονιδίου H-ras στο κωδικόνιο 61 μετά τη έκθεση του κυττάρου σε DMBA.(120). Ουσιαστικά φάνηκε ότι ένα ποσοστό άνω του 90% των καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων και των θηλωμάτων παρουσίαζαν αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου αδενίνης σε ένα νουκλεοτίδιο θυμίνης στη θέση δύο του κωδικόνιου 61 του Harvey-ras γονιδίου με συνέπεια την αντικατάσταση του αμινοξέως της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης από γλυκίνη σε λευκίνη, με συνέπεια την τροποποίηση της δραστηριότητας της τελικής πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη ήταν ετερόζυγη στα περισσότερα θηλώματα αλλά ομόζυγη ή ενισχυμένη στα καρκινώματα. Η εργασία αυτή αποτέλεσε ορόσημο στην ιστορία της χημικής καρκινογένεσης καθώς για πρώτη φορά αναδεικνύεται η σχέση μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης με ένα συγκεκριμένο χημικό καρκινογόνο (120).Την ίδια χρονιά μια άλλη εργασία του ίδιου κατέδειξε ότι ενεργοποιημένα ιικά ras γονίδια δρουν ως επαγωγείς του καρκίνου στα ποντίκια, και ως εκ τούτου αντικαθιστούν τη δράση των χημικών καρκινογόνων.(121) Το 1990 μια ακόμη εργασία έρχεται να επιβεβαιώσει την εμπλοκή του H-ras στην έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου, καθώς παρατηρείται ότι οι χρωμοσωμικές μεταβολές ιδίως στο χρωμόσωμα 7 οδηγούν στην ενίσχυση του μεταλλαγμένου H-ras ή στην απώλεια του φυσιολογικού αλληλομόρφου με απότοκο την ανάπτυξη καρκίνου σε κύτταρα ποντικού.(122).Τέλος, το 1993 σε μια νέα μελέτη του A.Balmain αναδεικνύεται ότι το p53 ογκοκατασταλτικό γονίδιο δεν εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της χημικά επαγόμενης καρκινογένεσης αλλά στην εξέλιξή της σε μετέπειτα στάδια. Έτσι αποσαφηνίστηκε ότι η εξέλιξη του καρκίνου περνάει από διάφορα στάδια, καθένα εκ των οποίων συνδέεται με μια συγκεκριμένη γονιδιακή υπογραφή -συγκεκριμένες μεταλλάξεις γονιδίων. Ένα λογικό μοντέλο που αναπαριστά τα παραπάνω είναι το ακόλουθο : φυσιολογικά κύτταρα επιδερμίδας αρχικά εκτίθενται σε

ένα χημικό καρκινογόνο όπως το DMBA, εν συνεχεία μετατρέπονται σε αθανατοποιημένα κύτταρα στα οποία επιδρούν είτε μεταλλάξεις του H-ras , είτε μεταλλάξεις της κυκλίνης D1, είτε τρισωμία του χρωμοσώματος 6 , προκειμένου να σχηματιστεί ένα καλοήθες θήλωμα. Έπειτα η εξέλιξη της καρκινογένεσης λαμβάνει χώρα μέσω άλλων μηχανισμών όπως είναι η απώλεια ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 11, μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 σε συγκεκριμένα πάντα κωδικόνια (236,246,231) και τέλος μεταλλάξεις μεταγραφικών παραγόντων και κινασών του σηματοδοτικού μονοπατιού του ras, όπως είναι ο ATF-2 και η ERK κινάση, με αποτέλεσμα την εξέλιξη σε πλακώδες καρκίνωμα. Τέλος η μετέπειτα εξέλιξη σε ατρακτοειδές καρκίνωμα αποδίδεται στην απώλεια κερατινών και της E-cadherin , σε υπερέκφραση βιμεντίνης και σε απώλεια του p16 (123). Το πολυσταδιακό σύστημα καρκινογένεσης της επιδερμίδας του ποντικού φαίνεται πως προσομοιάζει με έναν απλό και κατανοητό τρόπο με μεγάλη ομοιότητα, το μοτίβο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου στον άνθρωπο(124,125).

Αυτή η δεύτερη θεωρία περί αιτιότητας του καρκίνου ήρθε να επιβεβαιώσει την κυτταρική προέλευση των ρετροϊκών ογκογονιδίων και επιπλέον συνέβαλε στην ανάδειξη πιθανών μηχανισμών ενεργοποίησης των πρώτο-ογκογονιδίων, όπως είναι για παράδειγμα : η ενίσχυση, η ενσωμάτωση ενός προϊόντος , πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου-αντικατάσταση μιας νουκλεοτιδικής βάσης, και η αντιμετάθεση (103-105, 126,127). Δύο τόσο διαφορετικές θεωρίες με κοινό όμως παρονομαστή τη γενετική βάση του καρκίνου, δύο διαφορετικές προσεγγίσεις μιας κοινής παραδοχής περί κυτταρικής προέλευσης των ρετροϊκών ογκογονιδίων. Οι δύο αυτές σχολές , έμελλε να αλλάξουν για πάντα την γνώση της ανθρωπότητας γύρω από τον καρκίνο και ενώ κανείς δεν το πίστευε η μια ήρθε να συμπληρώσει- να επιβεβαιώσει την άλλη με μια τρομερή μαεστρία ρίχνοντας φως στα μέχρι τότε σκοτεινά μονοπάτια της ανθρώπινης καρκινογένεσης. Σήμερα είναι κοινώς αποδεκτό χάρη σε αυτούς, ότι ο καρκίνος αντικατοπτρίζει μια παραβίαση της ροής της γενετικής πληροφορίας και ως εκ τούτου οι σύγχρονες θεραπείες πρέπει να στρέφονται έναντι αυτής της παραβίασης. Στενευμένες θεραπείες που μπλοκάρουν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια που προάγουν την καρκινογένεση , και που εάν αναχαιτιστούν μπορούν να οδηγήσουν στην ίαση και στην εξάλειψη του καρκίνου, χωρίς να εκτίθεται ο ασθενής στην ισοπεδωτική δράση της χημειοθεραπείας , η οποία ως γνωστό δρα μην εκλεκτικά , στοχεύοντας κάθε ταχέως πολλαπλασιαζόμενο κύτταρο Τέλος, το έτος 1989 ως

μα αναγνώριση και των ανωτέρω, οι Bishop και Varmus τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ για την ανακάλυψη της κυτταρικής προέλευσης των ρετροϊκών ογκογονιδίων(128,129) Στην ομιλία του κατά την απονομή του βραβείου Νόμπελ , ο Bishop ανέφερε χαρακτηριστικά: τόσο εγώ όσο και ο Harold Varmus και οι συνεργάτες μας βρισκόμαστε στην ευχάριστη θέση να μπορούμε να βοηθήσουμε στη διεύρυνση της γνώσης μας γύρω από τον καρκίνο, χρησιμοποιώντας μια μέχρι πρότινος περιφρονημένη ιδέα , που όπως αποδείχτηκε έμελλε να γίνει ο οδηγός ενός νέου κόσμου. Η αντίληψη ότι οι γενετικές αλλαγές είναι σημαντικές για τη γένεση του καρκίνου, αντιμετώπισε έντονη αντίσταση τα τελευταία χρόνια. Μέσω του ερευνητικού μου έργου συνειδητοποίησα ότι δεν υπάρχει ενιαίος δρόμος για τη δημιουργικότητα καθώς και ότι δεν περιοριζόμαστε από την απαραίτητη πειθαρχία της αυστηρότητας, αλλά από τα προσωπικά όρια της φαντασίας μας και το πνευματικό μας θάρρος.(130).

Τα σημαντικότερα ορόσημα στην ιστορία της έρευνας του Src παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



5) Ενθετική Μεταλλαξιόγνεση και ανάδειξη πρώτο-ογκογονιδίων

Μελετώντας αναλυτικά όγκους σε πειραματόζωα και κατοικίδια ζώα οι ογκοβιολόγοι κατόρθωσαν κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα να φέρουν στο προσκήνιο μια ευρεία σειρά DNA και RNA ιών που έχουν την ικανότητα να προκαλούν καρκίνο. Όπως ήδη αναφέρθηκε εκτενώς, μια μεγάλη κατηγορία των ρετροϊών είναι οι ογκογόνοι ιοί ή αλλιώς οι οξείος

μετασχηματίζοντες ιοί, οι οποίοι φέρονται να αφομοιώνουν φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια και να μετατρέπουν αυτά τα απαχθέντα γονίδια σε άκρως μετασχηματιστικά ογκογονίδια.. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί και ο ιός του σαρκώματος Rous (RSV) , του οποίου το ογκογονίδιο v-Src βρέθηκε να έχει προέλθει από το φυσιολογικό κυτταρικό γονίδιο c-Src , με την ανακάλυψη αυτή να αναδεικνύει πως ένας αρχικά μη μετασχηματιστικός- βραδέως ογκογόνος ιός όπως ο ALV (ιός της λεύκωσης των πτηνών) αφού έκλειψε ένα φυσιολογικό κυτταρικό γονίδιο , απέκτησε την ικανότητα του μετασχηματισμού και της ανάπτυξης καρκίνου. Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα που εμπίπτει στην ίδια κατηγορία συνιστά και ο ιός AMV(ιός της μυελοκυτομάτωσης των πτηνών) ο οποίος επίσης αποτελείται από ένα υβριδικό γονιδίωμα και είναι ικανός να προάγει τη ταχεία κακοήγη εξαλλαγή και ανάπτυξη όγκου εντός ημερών ή εβδομάδων μετά την ένεση του σε ζωικούς ξενιστές. (131)

Ωστόσο σύντομα γεννήθηκε η ιδέα ότι κι οι πρόδρομοι μη ογκογόνοι ιοί όπως ο ALV(ιός της λεύκωσης των πτηνών) ή ο MLV (ο ιός της λευχαιμίας του ποντικού)μπορούν επίσης να προάγουν την ανάπτυξη καρκίνου σε βάθος χρόνου, παρότι δεν κωδικοποιούν ογκογονίδια στο γονιδίωμα τους. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου αυτοί οι βραδέως μετασχηματίζοντες ογκογόνοι ιοί δύνανται να επάγουν την ανάπτυξη καρκινικού φαινοτύπου αποσαφηνίστηκε μόλις το 1981, σε μια σειρά πειραμάτων που αφορούσαν την ανάπτυξη λευχαιμιών στα κύτταρα κοτόπουλου από τον ιό ALV . Αναλυτικότερα, μέσω της λεπτομερούς ανάλυσης των γονιδιωμάτων DNA των λευχαιμικών κυττάρων φάνηκε ότι εντός του κυτταρικού γονιδιώματος υπήρχαν ενσωματωμένα αντίγραφα του ιού ALV. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η ενσωμάτωση των προϊών συμβαίνει τυχαία σε ολόκληρο το χρωμοσωμικό DNA των μολυσμένων κυττάρων ξενιστών ,καθώς και ότι κάθε μολυσμένο λευχαιμικό κύτταρο μπορεί να φέρει έναν ή και περισσότερους ιούς στο γονιδίωμα του, το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στη χαρτογράφηση των πιθανών θέσεων ενσωμάτωσης του προιού σε αυτά τα κύτταρα. Οι ερευνητές αρχικά θεώρησαν ότι λόγω του τεράστιου μεγέθους του κυτταρικού γονιδιώματος η τυχαία ενσωμάτωση ενός προιού θα μπορούσε κάθε φορά να λαμβάνει χώρα και σε ένα εντελώς διαφορετικό γενετικό τόπο ασκώντας κάθε φορά μια τελείως διαφορετική επίδραση στο κύτταρο. Ωστόσο , αυτή η εκτεταμένη μοριακή ανάλυση μιας σειράς σχετιζόμενων με τον ALV ιό λευχαιμιών , αποκάλυψε μια αναπάντεχη συνθήκη. Αντί να παρατηρηθεί μια εκτεταμένη συλλογή τυχαίων σημείων ενσωμάτωσης, φάνηκε ότι

σε μια πλειοψηφία μεγαλύτερη του 80% ο προϊός είχε ενσωματωθεί σε μια συγκεκριμένη θέση στο χρωμοσωμικό DNA ακριβώς γειτονικά με το γνωστό πρώτο-ογκογονίδιο c-myc. Αποδείχθηκε μάλιστα ότι μετά την ενσωμάτωση αυτή ο ικός μεταγραφικός υποκινητής ενθεμένος εντός του προϊού ALV , διέκοπτε τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς ελέγχου της έκφρασης του γονιδίου c-myc με αποτέλεσμα το κυτταρικό γονίδιο c-myc να τίθεται υπό τον έλεγχο του ικού υποκινητή. Ως εκ τούτου, το γονίδιο αυτό διέφευγε του αυστηρού κυκλώματος ελέγχου του κυττάρου, και εξαναγκαζόταν σε μια συνεχή έκφραση και μάλιστα με υψηλό ρυθμό. Έτσι αυτό το υβριδικό ικό-κυτταρικό γονίδιο που είχε προκύψει στα χρωμοσώματα των λευχαιμικών κυττάρων λειτουργούσε ομοίως με το ογκογονίδιο v-myc που φέρει ο ιός της μυελοκυττωμάτωσης των πτηνών. Έτσι αποκαλύφθηκε μια νέα ομάδα ρετροϊών -γνωστή πλέον και ως αργά μετασχηματίζοντες ρετροϊοί οι οποίοι μέσω της διαδικασίας της ενθετικής μεταλλαξιογένεσης ενεργοποιούν τα πρώτο-ογκογονίδια και επάγουν με ένα πιο εκτεταμένο χρονοδιάγραμμα την ανάπτυξη καρκίνου. (132,133)

Το σενάριο που ακολουθεί μπορεί να αποδώσει μια λογική εξήγηση αναφορικά για την αργή κινητική με την οποία προκύπτουν αυτές οι λευχαιμίες μετά την αρχική ική μόλυνση ενός πτηνού. Σαφέστερα , κατά τη διάρκεια της μόλυνσης ενός κοτόπουλου, ο ALV προσβάλλει εκατομμύρια κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος του πτηνού. Εν συνεχεία εφόσον ευοδωθεί η λοίμωξη, το πτηνό καθίσταται αιμικό, καθώς μεταφέρει υψηλές συγκεντρώσεις ικών σωματιδίων στην περιφέρεια. Το γονιδίωμα καθενός εξ αυτών εισαγάγεται σε κάποια τυχαία θέση στο γονιδίωμα ενός μολυσμένου κυττάρου. Κατά κανόνα η εν λόγω ενσωμάτωση του προϊού δεν έχει καμία επίδραση, στο προσβεβλημένο κύτταρο-ξενιστή, πλην του εξαναγκασμού του σε παραγωγή μεγάλου αριθμού απογονικών ικών σωματιδίων. Εν αντιθέσει, σε σπάνιες περιπτώσεις , φάνηκε ότι ο ιός είχε ενσωματωθεί τυχαία δίπλα στο γονίδιο c-myc . Αυτό το τυχαίο γεγονός, οδηγούσε στη μετατροπή του φυσιολογικού έως τότε κυτταρικού γονιδίου σε ένα ισχυρό ογκογονίδιο, που είχε τεθεί υπό τον έλεγχο του ικού υποκινητή και είχε οδηγηθεί σε έναν ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό χωρίς φρένα , που σε βάθος χρόνου θα προκαλούσε την ανάπτυξη λευχαιμίας. Αυτός ο μηχανισμός ενθετικής μεταλλαξιογένεσης, ερμηνεύει τις λευχαιμογονικές δυνάμεις και άλλων ρετροϊών βραδείας δράσης, όπως είναι ο MLV. (132-135).

Μάλιστα, σε μια πρόσφατη εργασία ο T. Tsuruyama και οι συνεργάτες του επιχείρησαν να ταυτοποιήσουν με μεγάλη ακρίβεια τις επικρατέστερες θέσεις ενσωμάτωσης του ιού MLV στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, προσπαθώντας έτσι να οδηγηθούν στην ανακάλυψη και εκ νέου ταυτοποίηση γνωστών και νέων ογκογονιδίων,. Πιο συγκεκριμένα αφού απομόνωσαν το DNA γενετικό υλικό από όγκους που είχαν αναπτυχθεί σε μοντέλα ποντικών όπως τα BXH2, AKXD και SL/Kh, χρησιμοποίησαν μια μέθοδο αντίστροφης PCR (136-139) με τη ταυτόχρονη εμπλοκή ενζύμων όπως το SacII και της T4 λιγάσης, που τεμαχίζουν σε επιμέρους τμήματα το DNA του κυττάρου ξενιστή καθοδηγούμενα από νησίδες νουκλεοτιδίων πλούσιες σε κυτοσίνες και γουανίνες, προκειμένου να εντοπίσουν τις περιοχές που εντοπίζονται κωδικεύοντα γονίδια, δίπλα στα οποία διεισδύει και ο ιός. Η χρήση αυτής της σύνθετης μεθόδου οδήγησε στην ταυτοποίηση νέων περιοχών ενσωμάτωσης του προιού πλησίον σε πρώτο ογκογονίδια του κυττάρου ξενιστή, και συνακόλουθα στην ανακάλυψη νέων εν δυνάμει ογκογονιδίων, όπως είναι τα :Stat5a, Hirk2, Fiz1 και το Zfp521 (136, 139-141). Τέλος, φάνηκε ότι πέραν της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κεντρικό ρόλο στον καθορισμό της θέσης ενσωμάτωσης του προιού MLV διαδραματίζει και η διακύμανση της διαμόρφωσης της δομής του DNA καθώς φάνηκε ότι όσο πιο ανοικτή ήταν η δομή της χρωματίνης, τόσο πιο εύκολα προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες ήταν και η γενετική περιοχή, ευοδώνοντας έτσι την ενσωμάτωση του προιού σε μια μεταγραφικώς εύκολα προσβάσιμη και συνάμα ενεργή περιοχή.(142,143).

Σε αντίστοιχη εργασία λίγα χρόνια νωρίτερα, η Anna Narezkina και οι συνεργάτες της επιχείρησαν να ταυτοποιήσουν τις πιθανές θέσεις ενσωμάτωσης ενός ακόμη βραδέως μετασχηματίζοντα ογκογόνου ιού, τον ASV (avian sarcoma virus), προκειμένου να οδηγηθούν σε χρήσιμα συμπεράσματα γύρω από τα πρώτο-ογκογονίδια. Δυστυχώς, παρότι ταυτοποιήθηκαν περίπου 226 θέσεις εισόδου στο ανθρώπινο γονιδίωμα, καμία εξ αυτών δεν μπόρεσε να συσχετιστεί ισχυρά με κάποιο ογκογονίδιο, και το μόνο πιθανό συμπέρασμα που εξήχθη ήταν η προτίμηση του ιού να ενσωματώνεται κοντά σε γονίδια που κωδικοποιούσαν τις επιμέρους πρωτεϊνικές υποομάδες της RNA πολυμεράσης 2. Τέλος παρότι τα εκφραζόμενα-ενεργά γονίδια αποτελούσαν θέσεις ενσωμάτωσης του προιού, δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων έκφρασης

ενός γονιδίου και της αυξημένης πιθανότητας ενσωμάτωσης του προιού στην εν λόγω γενετική περιοχή. (144).

Ολοκληρώνοντας την ενθετική μεταλλαξιγένεση, η μελέτη του ιού MMTV που είχε φανεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνων μαστού σε θηλυκά ποντίκια ήρθε να επιβεβαιώσει τη συμβολή της στην ανάδειξη νέων πρώτο-ογκογονιδίων. Αναλυτικότερα, οι ερευνητές στο ίδιο μοτίβο θέλησαν να χαρτογραφήσουν για άλλη μια φορά τις θέσεις ενσωμάτωσης των προϊών MMTV στα γονιδιώματα των καρκίνων του μαστού ποντικών που είχαν επιβεβαιωμένη λοίμωξη από τον ιό αυτό. Στο συγκεκριμένο πείραμα οι περισσότεροι ιοί βρέθηκαν να είναι ενσωματωμένοι σε μια εκ τριών χρωμοσωμικών θέσεων, που εδράζονταν δίπλα σε κυτταρικά γονίδια που στη συνέχεια ονομάστηκαν int-1, int-2 και int-3 αντίστοιχα. Και τα τρία γονίδια σε επόμενα πειράματα φάνηκε ότι εμπλεκόταν στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με αποτέλεσμα η απορυθμισμένη έκφραση τους ύστερα από την παρακείμενη ενσωμάτωση του προιού MMTV να οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού στα ποντίκια. Αργότερα το γονίδιο int-1 βρέθηκε να είναι ομόλογο με το γονίδιο wingless της *Drosophila* και μετονομάστηκε σε Wnt-1, που σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι μέλος μιας μεγάλης οικογένειας γονιδίων wnt που όλα σχετίζονται με τη μορφογένεση των σπονδυλωτών. Μέχρι σήμερα, η μελέτη των λοιμώξεων που προκαλούνται από ρετροϊούς σε πτηνά και ποντίκια έχουν αναδείξει περισσότερα από 25 διακριτά κυτταρικά πρώτο-ογκογονίδια, ενώ πλέον είναι σαφές ότι η ενθετική μεταλλαξιγένεση αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στην προσπάθεια των ερευνητών για ανακάλυψη και εξερεύνηση νέων πρώτο-ογκογονιδίων. Επιπλέον, κάποιοι επιστήμονες, ορμώμενοι από την ανωτέρω παρατήρηση υπέθεσαν ότι είναι πιθανόν και κάποιοι μη ιικοί καρκινογόνοι παράγοντες όπως είναι οι ακτίνες X και τα χημικά καρκινογόνα, να μπορούν μέσω ανάλογου μηχανισμού να μεταβάλουν τη δραστικότητα των κυτταρικών πρώτο-ογκογονιδίων, ενώ αυτά συνεχίζουν να κατέχουν τη συνήθη θέση τους στα κυτταρικά χρωμοσώματα. (145-148)

Στην πραγματικότητα, πέραν αυτών των δύο διακριτών κατηγοριών ρετροϊών που έχουμε ήδη αναφερθεί εκτενώς, υπάρχει και μια τρίτη κατηγορία ρετροϊών που δεν συμμορφώνεται με καμία εξ αυτών, με κύριο αντιπρόσωπο της τον ιό της λευχαιμίας T κυττάρων του ανθρώπου (HTLV-1). Ο ιός αυτός συναντάται κυρίως σε ένα νησί της Ιαπωνίας με μία επίπτωση της τάξης του 1%, καθώς επίσης και σε ορισμένα νησιά της

Καραϊβικής. Είναι γεγονός ότι η δια βίου λοίμωξη από τον ιό HTLV-1 σχετίζεται με έναν κίνδυνο 3-4% για ανάπτυξη λευχαιμίας από Τ κύτταρα σε ενήλικες, ενώ φαίνεται να διατηρείται στον πληθυσμό μέσω μετάδοσης από τη μητέρα στο βρέφος μέσω της διαδικασίας του θηλασμού. Ομοίως με τον ιό ASV και παρά την πληθώρα μοριακών ερευνών που έλαβαν χώρα δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι τα σημεία ενσωμάτωσης του προϊόντος συγκεντρώνονται σε κάποιες συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές. Συνειρμικά το ενδεχόμενο να ασκεί την ογκογόνα δράση του μέσω της διαδικασίας της ενθετικής μεταλλαξιογένεσης καθίσταται εξαιρετικά απομακρυσμένο. Αποδείχθηκε ότι η ικανότητα του να διεγείρει την ανάπτυξη λευχαιμιών σχετίζεται μάλλον με ογκογονίδια που φέρει ο ίδιος ο ιός εκ φύσεως και κωδικοποιούν αντίστοιχες ογκοπρωτείνες, προάγοντας έτσι την ανάπτυξη κακοηθειών κυρίως του αιμοποιητικού συστήματος. Το καλύτερα μελετημένο εξ αυτών είναι το ογκογονίδιο tax του οποίου το προϊόν ασκεί διπλή δράση :1) ενεργοποιεί την μεταγραφή προ-ικκών αλληλουχιών DNA ,επιτρέποντας έτσι την παραγωγή απογονικών γονιδιωμάτων RNA 2) ενεργοποιεί την μεταγραφή δύο κυτταρικών γονιδίων που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, και συγκεκριμένα την IL-2(ιντερλευκίνη 2) και τον GM-CSF (παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων μακροφάγων). Ως απότοκος της απελευθέρωσης αυτών των αυξητικών παραγόντων, παρατηρείται ένας έντονος ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με το κύτταρο να πέρνα γρηγορά από τη φάση G1 στη φάση S, χωρίς όμως το γεγονός αυτό να αρκεί για την ανάπτυξη καρκίνου και λευχαιμίας στον άνθρωπο. Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι τα διεγερμένα από τον HTLV-1 ιό κύτταρα μπορούν μέσω αυτής της πίεσης που τους ασκείται για συνέχεις και γρήγορους κύκλους πολλαπλασιασμού να οδηγηθούν σε λάθη κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, τα οποία δεν προλαβαίνουν να διορθώσουν μέσω των επιδιορθωτικών τους μηχανισμών και ενζύμων, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων και την πρόκληση με χαμηλή αλλά προβλέψιμη συχνότητα κακοήθους εξαλλαγής. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται παραδείγματα κυτταρικών γονιδίων που ενεργοποιούνται μέσω ενθετικής μεταλλαξιογένεσης. (149,150)

Γονίδιο	Ενθετική Μεταλλαξιογένεση	Τύπος καρκίνου	Είδη	Τύπος ογκοπρωτεΐνης
<i>myc</i>	ALV	B κυτταρικό λέμφωμα	κοτόπουλο	μεταγραφικός παράγοντας
<i>myc</i>	ALV, FeLV	T κυτταρικό λέμφωμα	κοτόπουλο, γάτα	μεταγραφικός παράγοντας
<i>nov</i>	ALV	νεφροβλάστωμα	κοτόπουλο	αυξητικός παράγοντας
<i>erbB</i>	ALV	ερυθροβλάστωμα	κοτόπουλο	υποδοχέας TK
<i>mos</i>	IAP	πλασματοκύττωμα	ποντίκι	κινάση ser/thr
<i>int-1^a</i>	MMTV	καρκίνωμα μαστού	ποντίκι	αυξητικός παράγοντας
<i>int-2^b</i>	MMTV	καρκίνωμα μαστού	ποντίκι	αυξητικός παράγοντας
<i>int-3</i>	MMTV	καρκίνωμα μαστού	ποντίκι	υποδοχέας c
<i>int-H/int-5</i>	MMTV	καρκίνωμα μαστού	ποντίκι	ένζυμο d
<i>pim-1</i>	Mo-MLV	T κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	κινάση ser/thr
<i>pim-2</i>	Mo-MLV	B κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	κινάση ser/thr
<i>bmi-1</i>	Mo-MLV	T κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	μεταγραφικός καταστολέας
<i>tpl-2</i>	Mo-MLV	T κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	non-receptor TK
<i>lck</i>	Mo-MLV	T κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	non-receptor TK
<i>p53</i>	Mo-MLV	T κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	μεταγραφικός παράγοντας
<i>GM-CSF</i>	IAP	μυελομονοκυτταρική λευχαιμία	ποντίκι	αυξητικός παράγοντας
<i>IL2</i>	GaLV	T κυτταρικό λέμφωμα	χιμπαντζής	κυτοκίνη e
<i>IL3</i>	IAP	T κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	κυτοκίνη
<i>K-ras</i>	F-MLV	T κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	μικρή G πρωτεΐνη
<i>CycD1</i>	F-MLV	T κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	κυκλίνη G1
<i>CycD2</i>	Mo-MLV	T κυτταρικό λέμφωμα	ποντίκι	κυκλίνη G1

Συντομογραφίες: ALV, ιός λεύκωσης των πτηνών. FeLV, ιός λευχαιμίας αιλουροειδών. F-MLV, φίλος ιός λευχαιμίας ποντικού. GaLV, ιός λευχαιμίας πιθήκου *gibbon GF*, αυξητικός παράγοντας. IAP, ενδοκοιλιακό σωματίδιο A (γονιδίωμα που προσομοιάζει με αυτό ρετροϊού, το οποίο είναι ενδογενές στα κύτταρα). Mo-MLV, ιός λευχαιμίας ποντικού *Moloney*. MMTV, ιός όγκων μαστού ποντικού. *ser / thr*, σερίνη / θρεονίνη. TK, κινάση τυροσίνης.

a Ακολούθως μετονομάστηκε σε *Wnt-1*.

b Ακολούθως αναγνωρίστηκε ως γονίδιο που κωδικοποιεί έναν αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (FGF).

c Σχετιζόμενο με τους υποδοχείς *Notch*.

d Ένζυμο που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα.

e Οι κυτοκίνες είναι GF που ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό διάφορους τύπους αιματοποιητικών κυττάρων.

Προσαρμοσμένος εν μέρει από τον J. Butel, *Carcinogenesis* 21: 405-426, 2000; και από τους N. Rosenberg and P. Jolicœur, στο J. M. Coffin, S.H. Hughes and H.E. Varmus (eds), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Επίσης εν μέρει από G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2nd ed. Boston: Jones και Bartlett Publishers, 1995.

6) MicroRNAs

6.1) Εισαγωγή στα MicroRNAs

Η πρόσφατη ανάπτυξη της τεχνολογίας των «omics», όπως η πρωτεωμική και η μεταγραφωματική, ανέδειξαν νέα επιστημονικά πεδία για τους ερευνητές που ασχολούνται με τον καρκίνο. Γεγονός αξιοσημείωτο συνιστά η ανακάλυψη της συσχέτισης των microRNAs με τους μηχανισμούς που οδηγούν στην καρκινογένεση, επιτρέποντας έτσι την καλύτερη κατανόηση των μοριακών μονοπατιών που αλληλοεπιδρούν και λαμβάνουν χώρα στην πορεία της καρκινογένεσης. Τα MicroRNAs (miRNAs) είναι μονόκλινα μόρια RNA που αποτελούνται από ~22 νουκλεοτίδια, και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Συνιστούν μία νέα τάξη γονιδιακών ρυθμιστών που συναντάται στους φυτικούς και ζωικούς

οργανισμούς. Αποδείχθηκε η ικανότητα τους να ρυθμίζουν αρνητικά τους στόχους τους με δύο εναλλακτικούς μηχανισμούς, ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας ανάμεσα στο miRNA και το mRNA στόχο. Η βιολογία των microRNAs αποτελεί θέμα αιχμής και πεδίο δημιουργικής αντιπαράθεσης στο τομέα της βιοϊατρικής έρευνας. Η απορρύθμιση των αυστηρά ελεγχόμενων επιπέδων έκφρασης των miRNAs έχει αναδυθεί ως ένας μετασχηματιστικός μηχανισμός της δραστηριότητάς τους, με αποτέλεσμα να δρουν άλλοτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και άλλοτε ως ογκογονίδια. Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα MicroRNAs αποτελούν μικρά καλά συντηρημένα μη κωδικεύοντα μονόκλιωνα μόρια RNA και εμφανίζουν τέλεια ή σχεδόν τέλεια συμπληρωματικότητα με τα mRNAs των γονιδίων-στόχων τους (τα οποία εννοείται κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες). Τότε επάγεται το RNAi (RNA interference) μονοπάτι. Συνοπτικά, τα μετάγραφα μόρια mRNA ενώνονται με τα συμπληρωματικά τους miRNAs, γεγονός που στέλνει σήμα προκειμένου να αρχίσει η διάσπαση τους από ριβονουκλεάσες του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου miRISC (multiprotein RNA induced silencing complex). Ο παραπάνω μηχανισμός συναντάται με υψηλή συχνότητα στους φυτικούς οργανισμούς καθώς και σε μερικά θηλαστικά. Ωστόσο τα περισσότερα miRNA των ζωικών οργανισμών χρησιμοποιούν ένα δεύτερο μηχανισμό που βασίζεται κυρίως στην ατελή συμπληρωματικότητα τους με τα mRNAs των γονιδίων στόχων τους. Αυτά τα miRNAs προσδένονται με ατελή συμπληρωματικότητα στις περιοχές 3' UTRS (3' untranslated regions) των mRNA-στόχων, καταστέλλοντας τη μετάφραση τους σε πρωτεΐνες, μέσω ενός συμπλόκου RISC παρόμοιου με εκείνο που χρησιμοποιείται στο RNAi μονοπάτι. Σ' αυτή την περίπτωση, παρατηρείται αναστολή στη σύνθεση πρωτεϊνών σε αντιδιαστολή με τα επίπεδα των mRNA που παραμένουν σταθερά, καθώς το επίπεδο ρύθμισης της έκφρασης έχει τοποθετηθεί σε μεταγενέστερο σημείο ελέγχου.(151,152)

6.2) Ιστορική αναδρομή MicroRNAs

Τα miRNAs ανακαλύφθηκαν το 1993, από τον Lee και συνεργάτες του, στο νηματώδη *Caenorhabditis Elegans* (153). Σε αυτούς τους οργανισμούς, η αρνητική -προς τα κάτω ρύθμιση της πρωτεΐνης lin-14 βρέθηκε ότι είναι απαραίτητη για την πρόοδο από τη αρχική φάση των προνυμφών (L1) προς στην L2 φάση. Επιπλέον, η καθοδική ρύθμιση του lin-14 βρέθηκε να ελέγχεται από την μεταγραφή ενός δεύτερου γονιδίου που ονομάζεται lin-4. Προς έκπληξη των ερευνητών, αποδείχθηκε ότι το μετάγραφο lin-4 δεν μεταφράστηκε σε

μια βιολογικώς ενεργή πρωτεΐνη, ενώ αντίθετα, δημιούργησε 2 μικρά RNAs (~21 και 61 μήκους νουκλεοτίδια). Η μακρύτερη αλληλουχία δημιούργησε μια δομή μίσχου-θηλιάς (stem-loop structure) που δρούσε ως πρόδρομος για το βραχύτερο RNA. Έπειτα, το 1993, η γνωστή ομάδα των Lee, Feinbaum, & Ambros μαζί με τον Wightman και τους συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι το μικρότερο RNA είχε συμπληρωματικότητα αντίθετης φοράς (antisense Complementarity) σε πολλαπλές θέσεις στην 3' UTR του lin-14 mRNA. (153,154) . Η σύνδεση μεταξύ αυτών των συμπληρωματικών περιοχών μείωσε την έκφραση της πρωτεΐνης lin-14 αναστέλλοντας με κάποιο μηχανισμό τη σύνθεση της, διατηρώντας όμως πάντα τα επίπεδα του mRNA σταθερά. Αυτές οι δύο μελέτες, ανέδειξαν ένα νέο μοντέλο γονιδιακής ρύθμισης, όπου σύζευξη των βάσεων σημειώθηκε μεταξύ πολλαπλών lin-4 μικρών RNA σε συμπληρωματικές θέσεις στην 3' UTR του lin-14 mRNA, προκαλώντας έτσι μεταφραστική καταστολή (translational repression) του lin-14 και συνακόλουθα τη πρόοδο της ανάπτυξης του C.Elegans από τη L1 στην L2 φάση του κύκλου ζωής του. Αρχικά, διατυπώθηκε ο ισχυρισμός ότι η νέα λειτουργία ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης συνιστά ένα φαινόμενο που συναντάμε αποκλειστικά στο C. Elegans. Το έτος 2000, δύο ξεχωριστές ομάδες ερευνητών σε επόμενους κύκλους πειραμάτων , ανακάλυψαν ότι ένα μικρό RNA, το οποίο ονόμασαν let-7, ήταν απαραίτητο για την ανάπτυξη στο όψιμο στάδιο της προνύμφης σε C. Elegans(155-156). Ωστόσο, ομόλογα αλληλόμορφα αυτού του γονιδίου ανακαλύφθηκαν έπειτα και σε πολλούς άλλους οργανισμούς μεταξύ των οποίων και στον άνθρωπο (157). Τα επόμενα χρόνια ένας νέος τομέας γύρω από την έρευνα του καρκίνου προσέλκυσε όλο και περισσότερους νέους επιστήμονες με πολλά εργαστήρια να απομονώνουν και να ταυτοποιούν μεσώ διαδικασιών κλωνοποίησης και υβριδοποίησης πολυάριθμα μικρά RNAs, από ανθρώπους, σκουλήκια και μύγες. Όπως ήδη αναφέρθηκε, αυτά τα RNAs δεν κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες, και ήταν συμπληρωματικά με ένα μεγαλύτερο πρόδρομο με δομή μίσχου-θηλιάς (stem-loop) (152). Πολλά μάλιστα εμφάνιζαν ειδικότητα κυτταρικού τύπου. Η αναγνώριση και η επιβεβαίωση ύπαρξης αυτών των μικρών RNAs, που ονομάζονται MicroRNAs (miRNAs), οδήγησαν άμεσα τους ερευνητές στον εντοπισμό νέων μελών αυτής της οικογένειας και στη διάκριση τους μεταξύ διαφορετικών ειδών, φυτών και ζώων. Το 2002 έχουμε πλέον τη σύσταση μιας παγκόσμιας γενετικής βάσης miRNA, που ονομάζεται miRBase, και αποτελεί το κύριο online αποθετήριο για όλες τις πιθανές miRNA ακολουθίες (158,159). Πρόκειται ουσιαστικά για ένα παγκόσμιο μητρώο , με τη τρέχουσα έκδοση (miRBase20) να περιέχει 24.521 εγγραφές,

αντιπροσωπεύοντας την πρόδρομη φουρκέτα MicroRNAs που εκφράζουν 30.424 ώριμα miRNA προϊόντα σε 206 είδη.

6.3) Βιογένεση miRNAs και Μηχανισμός δράσης

Εν συντομία, ένα το μονοπάτι βιογένεσης miRNA αρχίζει με τη μεταγραφή των γονιδίων των miRNAs από την RNA πολυμεράση II. Αποδείχθηκε ότι η μεγάλη πλειοψηφία των miRNAs στον άνθρωπο προέρχεται από εσώνια, που ανήκουν στις μη κωδικές περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος. Έτσι, ένα εσώνιο μήκους περίπου 400 νουκλεοτιδίων αποκόπτεται από το αρχικό μετάγραφο και γίνεται το πρωταρχικό miRNA (primary miRNA, pri-miRNA). Το pri-miRNA κατόπιν επιδέχεται διάσπαση από την RNάση Drosha και καταλήγει σε μια νέα διαμόρφωση με χαρακτηριστική δομή θηλειάς-φουρκέτας με μήκος περίπου 70 νουκλεοτίδια, σχηματίζοντας το πρόδρομο pre-miRNA. Το pre-miRNA εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξπορτίνη 5 (exportin-5), μιας πρωτεΐνης της πυρηνικής μεμβράνης. Αφού μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα, πραγματοποιείται η τελική επεξεργασία από την RNάση Dicer, έτσι ώστε να προκύψει το ώριμο miRNA με τη τελική μορφή που το συναντάμε στους κυτταρικούς οργανισμούς.(160)

Τέλος, αξίζει να αποσαφηνιστεί ότι τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω δύο διακριτών μηχανισμών: είτε μέσω παρεμπόδισης της μετάφρασης, είτε μέσω προώθησης της αποδόμησης των mRNAs-στόχων. Απαρχή της μεταμεταγραφικής γονιδιακής σιώπησης συνιστά η επιστράτευση του συμπλέγματος RISC (RNA-induced silencing complex, επαγόμενο από το RNA σύμπλοκο σιώπησης), από ένα μόριο miRNA, το οποίο διαμεσολαβεί στην τοποθέτηση του miRNA επάνω στη συμπληρωματική αλληλουχία του mRNA-στόχου. Για τα νουκλεοτίδια 2–8 του miRNA, γνωστά και υπό τον όρο περιοχή εκβλάστησης (seed region, SR), είναι απαραίτητη προϋπόθεση να αναγνωρίζονται συνεχώς σε ένα τέλεια συμπληρωματικό τμήμα του mRNA-στόχου. Οι αντίστοιχες θέσεις σύνδεσης για την περιοχή SR του miRNA βρίσκονται στην 3'-UTR περιοχή του mRNA, και έχει παρατηρηθεί ότι συμπληρωματική αλληλουχία συναντάται σε πολλαπλά αντίγραφα μέσα στην περιοχή αυτή. Η επιλογή του μηχανισμού δράσης μέσω του οποίου ασκεί ρυθμιστικό ρόλο ένα miRNA και προωθεί την αποδόμηση ή καταστέλλει τη μετάφραση του mRNA-στόχου του εξαρτάται από το βαθμό συμπληρωματικότητας που εμφανίζει σε σχέση με το 3' άκρο του mRNA. Ειδικότερα, ο μηχανισμός σιώπησης πιθανόν υπαγορεύεται από

τον αριθμό, τον τύπο και τη θέση των αταίριαστων ζευγών βάσεων μεταξύ miRNA και mRNA. Παρά το γεγονός ότι η καταστολή της μετάφρασης φαίνεται να είναι η κύρια δράση κατά τη γονιδιακή σίωπηση, είτε κατά την έναρξη είτε στη φάση της επιμήκυνσης της αμινοξικής αλληλουχίας, η αποδόμηση του mRNA αποτελεί έναν επίσης σημαντικό μηχανισμό και φαίνεται να προτιμάται όταν η αλληλουχία του miRNA παρουσιάζει τέλεια συμπληρωματικότητα και με την υπόλοιπη 3'UTR περιοχή του mRNA πέρα από την περιοχή εκβλάστησης(SR domain). Η αποδόμηση αυτή περιλαμβάνει τα εξής βήματα :αποαδενυλίωση, αφαίρεση του καλύμματος και εξωνουκλεολυτική πέψη του mRNA-στόχου. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της συγκεκριμένης διαδικασίας δεν έχει διαλευκανθεί ακόμα πλήρως. (161)

6.4) MicroRNAs ως ρυθμιστές της Src σηματοδότησης στον καρκίνο

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, το c-SRC αποτελεί το πρώτο πρώτο-ογκογονίδιο που ταυτοποιήθηκε σε όλη την διάρκεια της ιστορίας της καρκινογένεσης, με το προϊόν του να συνιστά την πρώτη πρωτεΐνη με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης που μπόρεσε να απομονωθεί (162).

Είναι γεγονός, ότι σε πληθώρα κακοηθειών που αναπτύσσονται στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως είναι οι καρκίνος του γαστρεντερικού σωλήνα, ο καρκίνος του μαστού, ο παγκρεατικός καρκίνος, καρκίνοι που αφορούν την κεφαλή τράχηλο, καρκίνος του πνεύμονα, γλοιώματα και μελανώματα, έχει διαπιστωθεί υπερέκφραση του γονιδίου SRC καθώς και αυξημένη σηματοδοτική ενεργότητα του αντίστοιχου μοριακού μονοπατιού. Στην πραγματικότητα, η απορρύθμιση του θα μπορούσε να αποτελεί και μια μοναδική γονιδιακή υπογραφή του συγκεκριμένου καρκίνου, καθώς αποτελεί ένα μόριο κλειδί στην έναρξη και στην εξέλιξη της καρκινογένεσης(9,11,163). Ωστόσο μέχρι και σήμερα οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τη λειτουργία του και προάγουν την εξαλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε ένα καρκινικό κύτταρο δεν έχουν ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί. Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν αρκετά μικρά μόρια RNA, γνωστά και ως miRNAs, ως πιθανούς διαμεσολαβητές της SRC επαγόμενης ογκογένεσης (164). Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα miRNAs απαρτίζουν μια οικογένεια από μικρά, καλά συντηρημένα, μη κωδικεύοντα μόρια RNA, (που περιέχουν περίπου 22 νουκλεοτίδια) και φέρονται να εμπλέκονται στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών, μεταξύ των οποίων είναι : ο

κυτταρικός πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, επιβίωση και η κυτταρική απάντηση στο stress. Τα αρχικά pre-miRNAs, υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία από διάφορα ένζυμα πριν αποκτήσουν τη τελική τους διαμόρφωση σε ώριμα miRNAs, που ασκούν τη δράση τους είτε μέσω αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης, είτε μέσω επαγωγής της αποδόμησης του συμπληρωματικού mRNA στόχου(165), δρώντας άλλοτε ως ισχυρά ογκογονίδια και άλλοτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια.(166) Σε επαναλαμβανόμενα πειράματα με τη χρήση microarray τεχνικών ανακαλύφθηκε ότι το c-SRC ρυθμίζει την έκφραση μιας ομάδας miRNAs , που φυσιολογικά δρουν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι στους περισσότερους καρκίνους η έκφραση των miRNAs έχει αποσιωπηθεί μέσω σημειακών μεταλλάξεων, μεθυλίωσης, απώλειας ετεροζυγωτίας και μέσω άλλων μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων. (167). Μελέτες αναφορικά με τη λειτουργία αυτών των miRNAs αποκάλυψαν την miRNA διαμεσολαβούμενη c-SRC ογκογόνα σηματοδότηση και την αλληλεπίδραση μεταξύ του SRC σηματοδοτικού μονοπατιού με άλλα γνωστά μοριακά μονοπάτια που προάγουν την καρκινογένεση όπως είναι το μονοπάτι ρύθμισης της εστιακής πρόσφυσης (focal adhesion pathway)και το μονοπάτι mTOR (mammalian target of rapamycin) (164).

Προσφάτως, αναδείχθηκαν κάποια miRNAs ως υποκείμενοι μηχανισμοί που τελούνται κατά τη διάρκεια της SRC επαγόμενης ενεργοποίησης της mTOR σηματοδότησης που αποτελεί βέβαια έναν γνωστό μετέπειτα τελεστή του μονοπατιού της PI3K σε ένα μεγάλο πλήθος κακοηθειών (168,169). Πιο συγκεκριμένα, μέσω πειραμάτων λειτουργικής ανάλυσης αποδείχθηκε ο ρόλος του μορίου miR-99a στην SRC επαγόμενη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού του EGFR, ενώ βρέθηκαν χαρακτηριστικά μειωμένα τα επίπεδα έκφρασής του σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου στον άνθρωπο. Μάλιστα φάνηκε ότι το miR-99a συνιστά μόριο με θεμελιώδη ρόλο στη σηματοδότηση του mTOR και του FGFR3(υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών 3),όπου και αυτά με τη σειρά τους αποτελούν σημαντικά επιτελεστικά μόρια στη δαιδαλώδη μοριακή σηματοδότηση που σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου (170,171). Συμπερασματικά, αποδείχθηκε ότι το miR-99a είναι ο σύνδεσμος που έλειπε μεταξύ των μονοπατιών SRC και mTOR, που εμπλέκονται στην ανθρώπινη καρκινογένεση, με τα υψηλά επίπεδα SRC να οδηγούν σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης miR-99a και αυτό με τη σειρά του να ενισχύει την έκφραση των σηματοδοτικών οδών mTOR και FGFR3.(εν προκειμένου το miR-99a δρα ως ένα

ογκοκατασταλτικό γονίδιο). Νέες μελέτες, αναδεικνύουν επιπλέον μόρια miRNA που ενέχονται στη μέσω SRC ρύθμιση του μονοπατιού mTOR, όπως το miR-100 και το miR-199-3p (172,173)

Σε επόμενη σειρά πειραμάτων, προτάθηκε ότι τα miRNAs επίσης κατέχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της τοπικής πρόσφυσης-συνοχής (focal-adhesion) των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και με την εξωκυττάρια θεμέλεια ουσία, μέσω της ενεργοποίησης κατώτερων επιτελεστικών μορίων της SRC σηματοδότησης οδού σε SRC ενεργοποιημένα καρκινικά κύτταρα. Αναλυτικότερα ομοίως με πριν, παρατηρήθηκε ότι σε SRC ενεργοποιημένα κύτταρα, έχει ανασταλεί η έκφραση του miR-542-3p και συνακόλουθα έχει ευοδωθεί η ILK (integrin linked kinase) σηματοδότηση που προάγει την επιθήλιο-μεσεγγυματική μετατροπή (EMT), μια διεργασία κλειδί στην ανάπτυξη καρκινικού φαινοτύπου. (174-177). Μάλιστα τα ανωτέρω επιβεβαιώθηκαν και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που προήλθαν από καρκινικό ιστό παχέος εντέρου που απομονώθηκε στον άνθρωπο, ενώ φάνηκε να υπάρχει ένας βρόγχος θετικής ανατροφοδότησης, όπου ογκογόνα σήματα όπως αυξητικοί παράγοντες και ιντεγκρίνες επάγουν τη μείωση της έκφρασης του miR-524-3p, το οποίο επάγει την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κινασών, με εναρκτήρια την ILK κινάση και αυτό με τη σειρά του επάγει εκ νέου την ενεργοποίηση της SRC σηματοδότησης (feedback loop).

Ένα ακόμα παράδειγμα το miR-27b το οποίο βρέθηκε κατεσταλμένο σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές πνεύμονα, μαστού, προστάτη και παχέος εντέρου (178-180). Το μόριο αυτό φυσιολογικά αναστέλλει τη δράση της *raxillin*, ενός μορίου που δρα σαν πλατφόρμα πάνω στην οποία προσφύονται άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες που επάγουν την EMT μετατροπή και την ανάπτυξη μεταστατικού φαινοτύπου. Αποδείχθηκε λοιπόν ότι σε κάποιους καρκίνους η αυξημένη SRC σηματοδότηση οδηγούσε σε χαμηλή έκφραση του miR-27b, με συνακόλουθη προς τα πάνω ρύθμιση της έκφρασης της *raxillin* και ως εκ τούτου την μετάδοση ευοδωτικών μοριακών σημάτων μέσω κινασών, όπως η PI3K και η AKT, για την προαγωγή της απώλειας συνοχής μεταξύ των κυττάρων και την απόκτηση διηθητικού και μεταστατικού δυναμικού. (181-184)

Τέλος, προς μεγάλη έκπληξη της επιστημονικής κοινότητας, αποδείχθηκε ότι πιθανώς τα miRNAs εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης του ίδιου του Src , δίνοντας έτσι και μια λογική εξήγηση στην ανάπτυξη αντοχής που συχνά παρατηρείται μετά τη χορήγηση στοχευμένης θεραπείας έναντι του Src. Σαφέστερα, το μόριο miR-23b φέρεται να δρα άλλοτε ως ένα ισχυρό ογκοκατασταλτικό γονίδιο και άλλοτε ως μόριο υπεύθυνο για την ανάπτυξη μεταστατικού δυναμικού σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές.(178). Όπως ήδη αναφέρθηκε, το miR27b στοχεύει τη raxillin, μια πρωτεϊνική πλατφόρμα πρόσδεσης ,μέλος του γενικότερου συμπλέγματος τοπικής πρόσφυσης του κυττάρου, που βρίσκεται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο του μοριακού μονοπατιού της PI3K(179-182). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι και τ δύο αυτά μόρια miRNA βρίσκονται κατεσταλμένα στον ευνοχοάντοχο καρκίνο του προστάτη,(185) το c-Src θα μπορούσε να ρυθμίζεται από το miR-23b/27b 24-1 σύμπλοκο γονίδιο με δύο διαφορετικούς τρόπους: είτε μέσω της miRNA επαγόμενης ρύθμισης της raxillin και των μετέπειτα μορίων , είτε μέσω της απευθείας ρυθμιστικής δράσης επί του c-SRC γονιδίου μέσω μιας αγκύλης θετικής ανατροφοδότησης.(164)

6.5) miRNA-διαμεσολαβούμενη Src ογκογόνα σηματοδότηση σε επιλεγμένους τύπους καρκίνου

Όπως είναι ήδη σαφές, αυτά τα μικρά μη κωδικεύοντα μόρια RNA αποτελούν σημαντικούς γονιδιακούς ρυθμιστές και μετέχουν ενεργά στη μεταγωγή σημάτων από και προς τον πυρήνα του κυττάρου , όπου τελικά το σήμα απαρτιώνεται αλληλοεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση των πρωτεϊνών. Καθώς οι επιστήμονες παρατήρησαν ότι πολλά και διαφορετικά miRNAs παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση σε πολλούς ανθρώπινους Src θετικούς καρκίνους, μέσω μιας πληθώρας γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων, όπως μεθυλίωση, απώλεια ετεροζυγωτίας κλπ. το ενδιαφέρον της κλινικής έρευνας επικεντρώθηκε στο πιθανό ρόλο που αυτά κατέχουν στην ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο.(167) Διαδοχικά πειράματα υπογράμμισαν το κομβικό ρόλο του miR-137 στην ανάπτυξη Src θετικού καρκίνου του παχέος εντέρου στον άνθρωπο, καθώς αποδείχθηκε ότι φυσιολογικά δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο είτε αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της AKT2 κινάσης και την raxillin, είτε στοχεύοντας απευθείας το c-Src, είτε αλληλοεπιδρώντας με άλλα κρίσιμα μόρια miRNA όπως το miR-99a, miR-27b, miR-503 και miR-542-3p (186). Προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος του miR-137 και η συσχέτιση του με τη Src σηματοδότηση, η κυτταρική σειρά HCT116 εκτέθηκε στο miR-137 και

παρατηρήθηκε πλήρης καταστολή στην έκφραση του Src μάρτυρα με απευθείας πρόσδεσης του miRNA μέσω της περιοχής εκβλάστησης (seed region) με τη συμπληρωματική του αλληλουχία στην 3' αμετάφραση περιοχή του Src mRNA. Αντιθέτως , μόλις εισήχθη ένα αντινοσηματικό miRNA που απενεργοποιούσε το miRNA, σημειώθηκε ενίσχυση της έκφρασης του Src μάρτυρα. Αυτό αποτέλεσε και την πιο ισχυρή απόδειξη αναφορικά με την απευθείας επίδραση του miR-137 στο Src. Τέλος, οι ίδιες κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν σε anti-sense miRNAs και στο dasatinib (που αποτελεί ένα ειδικό αναστολέα της SRC κινάσης). Μέσω πολλαπλών συνδυασμών των ανωτέρων φαρμάκων αποδείχθηκε ότι το dasatinib μπορούσε να αναστείλει τη σηματοδότηση και καθ' επέκταση την κακοήθη εξαλλαγή με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ η προσθήκη του μορίου miR-137 προκαλούσε μια περαιτέρω ευαισθητοποίηση των κυττάρων στο dasatinib. Επιπλέον, όταν απενεργοποιήθηκε η δραστηριότητα του miR-137 χρησιμοποιώντας ένα αντινοσηματικό miRNA παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση του Src και της AKT2 . Τέλος φάνηκε ότι το miR-137 υφίσταται καταστολή ήδη από τα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης και κατέχει κομβικό ρόλο στην κακοήθη εξαλλαγή , στην απώλεια της τοπικής πρόσφυσης και στην ανάπτυξη διηθητικού-μεταστατικού δυναμικού(186).

Σε επόμενο πείραμα, η ρόλος του miR-129-1-3p στον καρκίνο του παχέος εντέρου στον άνθρωπο αξιολογήθηκε μέσω σύγκρισης της διαφοράς στην έκφραση του miR-129-1-3p μεταξύ 10 καρκινικών ιστών σε σχέση με 10 παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, χρησιμοποιώντας qRT-PCR και western blot ανάλυση για την εκτίμηση της δραστηριότητας των κινασών SFK (SRC pY418). Στους καρκινικούς ιστούς η έκφραση του miR-129-1-3p ήταν αξιοσημείωτα χαμηλή, ενώ η δραστηριότητα των SFK ήταν εξαιρετικά υψηλή. (187).

Επιπρόσθετες εργασίες , ανέδειξαν ότι ορισμένα miRNAs πιθανότατα ασκούν την ογκογόνα δράση τους μέσω στόχευσης και καταστολής της SRCIN1(κινάση που φυσιολογικά δρα ανασταλτικά της SRC σηματοδότησης). Για παράδειγμα, το miR-665 καταστέλλει την έκφραση της SRCIN1, που υπό φυσιολογικές συνθήκες δρα αναχαιτίζοντας το μονοπάτι MAPK/ERK στον καρκίνο των ωοθηκών(188).Στον καρκίνο των ωοθηκών η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου άξονα (MAPK/ERK) έχει συσχετιστεί με ισχυρό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη μεταστατικού δυναμικού. (189). Η western blot ανάλυση , επιβεβαίωσε τα ανωτέρω, καθώς έδειξε ότι η αναστολή του miR-665 οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της SRCIN1, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνικό, ενώ

ταυτόχρονα απενεργοποιήθηκε το μοριακό μονοπάτι MAPK/ERK στον καρκίνο των ωοθηκών.(190). Ανάλογα ευρήματα καταγράφηκαν και στην περίπτωση της μελέτης του miR-150, το οποίο προάγει τον μετασχηματισμό των πνευμονικών κυττάρων προς κακοήθη κύτταρα , τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση αυτών σε δευτεροπαθείς εστίες, μέσω στόχευσης (191). Έπειτα , διαλευκάνθηκε ο ρόλος του miR-17-5p στην εξέλιξη του οστεοσαρκώματος, με το μόριο αυτό να αποτελεί αναπόσπαστο μέλος του άξονα σηματοδότησης miR-17-5p/SRCIN1/EMT. Επιπροσθέτως, κλασσικοί ανοσοϊστοχημικοί δείκτες ενδεικτικοί EMT μετατροπής, όπως είναι N-cadherin, E-cadherin και το Snail, ποσοτικοποιήθηκαν μέσω western blot ανάλυσης, για να αποδειχθεί τελικά ότι η SRCIN1 συνιστά πράγματι απευθείας στόχο του μορίου miR-17-5p, του οποίου η σίγαση συνοδεύεται με αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και ταυτόχρονη μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των EMT δεικτών.(192). Μελέτες σε καρκίνο του μαστού , συνηγορούσαν υπέρ της χαμηλής έκφρασης της SRCIN1 στα δείγματά που μελετήθηκαν (193). Το ίδιο και με το μόριο miR-374a, το οποίο προάγει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διήθηση και μετάστασή, σε πολλές περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου, μέσω στόχευσης της SRCIN1 (194). Επιπλέον, φαίνεται πως με ανάλογο μηχανισμό μέσω του άξονα 374a/SRCIN1/EMT, συμμετέχει ενεργά στην ανάπτυξη καρκίνου και στο πάγκρεας.(195) Τέλος, ακόμα μια μελέτη επικεντρώθηκε στη ταυτοποίηση των επιπέδων του miR-373 σε ιστολογικά παρασκευάσματα που προήλθαν από μεταστατικό νευροβλάστωμα, και της πιθανής συσχέτισης του με το μόριο SRCIN1 (196).

Συμπερασματικά, είναι πλέον κοινώς αποδεκτό ότι διαταραχές στην εύρυθμη λειτουργία των miRNAs , σχετίζονται συχνά με κακοήθη εξαλλαγή , με τα τελευταία να δρουν άλλοτε ως ισχυρά ογκογονίδια προωθώντας την καρκινογένεση και άλλοτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια που προφυλάσσουν την γονιδιακή ακεραιότητα. (197,198). Επίσης πλέον γνωρίζουμε ότι ένα μόνο miRNA μπορεί να ρυθμίζει ταυτόχρονα με φοβερή μαεστρία πολλαπλά γονίδια και αντιστρόφως ένα και μόνο γονίδιο μπορεί να επιδέχεται ταυτόχρονη ρύθμιση από πολλαπλά miRNAs.(199). Εξαιτίας της εμπλοκής τους στη διατήρηση της κυτταρικής ανάπτυξης και της αντίστοιχης σηματοδότησης, τα miRNAs συνιστούν πιθανούς αναδυόμενους βιοδείκτες και θεραπευτικούς στόχους για την καταπολέμηση του καρκίνου. (200).

7) Τα εξωσώματα ως ρυθμιστές της Src σηματοδότησης στον καρκίνο

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το Src δρα ως ένας μοριακός διακόπτης και διαδραματίζει ένα κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στη διαφοροποίηση, στον καθορισμό των τοπικών συνάψεων και στη μετανάστευση των φυσιολογικών κυττάρων, ενώ συχνά παρατηρείται σημαντική αύξηση στην έκφρασή του σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου (16). Όπως είναι λογικό, η ενεργοποίηση του Src βρίσκεται υπό αυστηρό έλεγχο, και πολλοί μοριακοί μηχανισμοί συμπράττουν προκειμένου να εξασφαλιστεί η εύρυθμη λειτουργία αυτού του τόσο κομβικού μορίου. Αναλυτικότερα, η δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης του Src ρυθμίζεται αρνητικά μέσω της φωσφορυλίωσης ενός συντηρημένου κατάλοιπου τυροσίνης στο c καρβοξυτελικό άκρο, από την CSK (201,202). Από την άλλη, στους θετικούς ρυθμιστές της Src σηματοδότησης συγκαταλέγονται πολλαπλά εξωκυττάρια σήματα όπως: αυξητικοί παράγοντες και προϊόντα της εξωκυττάριας ουσίας, που οδηγούν στη αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες πρόσδεσης, μεταξύ των οποίων οι FAK και Cas (163,203), με συνακόλουθή ενεργοποίηση και μεταγενέστερων σηματοδοτικών μορίων. Επίσης η τοποθεσία της SRC στο κύτταρο φαίνεται να σχετίζεται και με τη δραστηριότητα της. Έτσι η ανενεργή πρωτεΐνη Src εντοπίζεται γύρω από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και μόλις ενεργοποιηθεί μετακινείται στην πλασματική μεμβράνη, υπό τον έλεγχο της οικογένειας των Rho πρωτεϊνών.(204) Νέες μελέτες απέδειξαν ότι μείωση των επιπέδων της Src διαμεσολαβείται μέσω αποδόμησης που λαμβάνει χώρα είτε στα λυσοσώματα είτε στο πρωτεώσωμα, με τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ των δύο να παραμένουν αδιευκρίνιστες (18,205-207). Πιο συγκεκριμένα, η E3 ουβικουιτινική λιγάση Cbl διαμεσολαβεί στην ουβικουιτίνωση της Src, επάγοντας έτσι την αποδόμηση της μέσω του συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεοσώματος(206,207). Σε μια πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι η ουβικουιτίνωση της Src στο κατάλοιπο λυσίνης 429 προάγει την έκκριση της από μικρά εξωκυττάρια οχήματα (small extracellular vesicles =sEVs), γνωστά και ως εξωσώματα (208). Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν MDCK κύτταρα τα οποία εκφράζουν μια γενετικά τροποποιημένη Src εκδοχή, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί μετά την έκθεση σε υδροξυταμοξιφαίνη, προκειμένου να μιμηθεί τα Src θετικά καρκινικά κύτταρα. Αναλυτικότερα, όταν χορηγήθηκε κάποιο φαρμακευτικό σκεύασμα που δρα ως αναστολέας πρωτεασώματος, όπως για παράδειγμα το σκεύασμα (MG132), προς έκπληξη την ερευνητικής ομάδας δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση ουβικουιτινωμένης Src πρωτεΐνης. Αυτό το γεγονός κατέδειξε ότι πιθανώς η ουβικουιτίνωση της Src προωθεί κατά προτίμηση την έκκριση της μέσω των εξωσωμάτων παρά την αποδόμηση της στο

πρωτεόσωμα. Μέσω του εν λόγω μηχανισμού προωθείται η μείωση των επιπέδων της Src πρωτεΐνης. Επίσης αποδείχθηκε ότι η λυσίνη 429 είναι μια θέση κριτικής σημασίας για τη διαδικασία της ουβικουτίνωσης, προκειμένου να λάβει χώρα η ρύθμιση των επιπέδων της Src μέσω απέκκρισης της με μικρά εξωκυττάρια οχήματα (sEVs). Μάλιστα, σε μια προσπάθεια της ερευνητικής ομάδας να αποδείξει πως μια πιθανή μετάλλαξη στη θέση 429 επηρεάζει τη συμπεριφορά του κυττάρου, προχώρησαν σε γενετική τροποποίηση κυττάρων στο εργαστήριο, και παρατήρησαν ότι τα κύτταρα που παρουσίαζαν σημειακή μετάλλαξη στην εν λόγω θέση (R429), εμφάνιζαν αντίσταση στην ουβικουτίνωση και μειωμένη έκκριση μέσω sEVs. Επιπροσθέτως, φάνηκε ότι η απάλειψη της cbl λιγασής προκαλούσε μια λιγότερο ισχυρή καταστολή της μέσω εξωσωμάτων έκκρισης, υποδεικνύοντας την πιθανή συμμετοχή επιπλέον E3 λιγασών στη διαδικασία σήμανσης με μόρια ουβικουτίνης. Έτσι παρά την απενεργοποίηση της cbl οι υπόλοιπες λιγασές θα διατηρούσαν τη δραστηριότητα τους, και θα συνέχιζε ως ένα βαθμό η μέσω εξωσωμάτων ρύθμιση της Src. Επιπλέον τα R429 κύτταρα καθώς εμφανίζουν αντίσταση στη ουβικουτίνωση, οδηγούν σε συσσώρευση Src και προάγουν την εξαλλαγή του κυττάρου σε Src θετικό διηθητικό κύτταρο με ισχυρή ενεργοποίηση μετέπειτα μοριακών παραγόντων όπως ο FAK κατά τα αρχικά στάδια. (203,208). Τα ανωτέρω ήρθαν να ρίξουν φως στο σύνδεσμο που έλειπε και να αποσαφηνίσουν ότι η ουβικουτίνωση της Src πέραν της γνωστής κλασσικής οδού ουβικουτίνης πρωτεασώματος, πιθανώς αποτελεί μήνυμα για επαγωγή έκκρισης μέσω εξωσωμάτων, συμβάλλοντας έτσι στην καταστολή της Src επαγόμενης καρκινογένεσης. Τέλος, το γεγονός της ανίχνευσης Src πρωτεΐνης στα εξωσώματα πολλών διαφορετικών ειδών καρκίνου, όπως κολοροθικού καρκίνου(209), καρκίνου προστάτη(210) και καρκίνου μαστού(211), υποδεικνύει ότι η έκκριση της Src μέσω εξωσωμάτων αποτελεί ένα κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό των επιπέδων της Src και ταυτόχρονα ένα πολλά υποσχόμενο μελλοντικό θεραπευτικό στόχο.(212)

8) Src αναστολείς ως αντικαρκινικοί παράγοντες σε κλινικές μελέτες

Η αποδεδειγμένη συμμετοχή του ογκογονιδίου Src στην ογκογένεση έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στον εντοπισμό και χαρακτηρισμό και άλλων μελών της οικογένειας των Src πρωτεϊνικών κινασών και στο σχεδιασμό στοχευμένων

αναστολέων τους ως πιθανή αντικαρκινική θεραπεία. Ως εκ τούτου, οι περισσότεροι αναστολείς του Src και των υπόλοιπων σχετικών κινασών της οικογενείας, που έχουν λάβει έγκριση από τον FDA, στοχεύουν έναντι γνωστών νεοπλασματικών ασθενειών. Ωστόσο έχει φανεί ότι η μετάλλαξη του Src ογκογονιδίου δεν είναι η οδηγός μετάλλαξη που προάγει την κυτταρική διαίρεση, διήθηση, μετανάστευση και επιβίωση, αλλά ένας σημαντικός συμπαράγοντας της κακοήθους εξαλλαγής, με τους αναστολείς Src να μην έχουν λάβει για αυτό το λόγο ακόμα κάποια έγκριση ως μονοθεραπεία στην αντιμετώπιση των νεοπλασματικών ασθενειών. (213) Επιπλέον δεν έχουμε καταφέρει να εντοπίσουμε ακόμα αποτελεσματικούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς βιοδείκτες που να σχετίζονται με την Src δραστικότητα, προκειμένου να κατηγοριοποιηθούν οι ασθενείς σε επιμέρους ομάδες, ανάλογα με το αναμενόμενο κλινικό όφελος και να λάβουν την αντίστοιχη θεραπεία. Ένα τέτοιο εγχείρημα εξατομικευμένης ογκολογικής προσέγγισης ανάλογα με τα ιδιαίτερα κλινικά αλλά και μοριακά χαρακτηριστικά του ασθενούς, καθώς και βάση του ιστοπαθολογικού και ανοσολογικού προφίλ του, αποτελεί τον πλέον σύγχρονο ογκολογικό χειρισμό, συμβάλλοντας στην ολιστική διαχείριση του ασθενή και αποτρέποντας την εναλλαγή μη αποδοτικών θεραπευτικών σχημάτων που επιβαρύνουν σε σωματικό και ψυχολογικό επίπεδο τον ασθενή.

Προσφάτως τέσσερις ξεχωριστοί παράγοντες που λαμβάνονται από το στόμα και αποτελούν ειδικοί αναστολείς των Src κινασών έλαβαν έγκριση από το FDA για την αντιμετώπιση ποικίλων κακοηθειών. Αρχικά το Bosutinib, ένας BCR-Abl, SRC, Lyn, Hck, Kit, και PDGFR αναστολέας, εγκεκριμένος ήδη για τη Philadelphia θετική χρόνια μυελογενή λευχαιμία (Ph⁺CML) και αντιστοίχως για τη Philadelphia θετική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Ph⁺ALL), εξετάζεται σε κλινικές μελέτες ως πιθανή θεραπευτική επιλογή στον καρκίνο μαστού, γλοιοβλάστωμα και άλλους συμπαγείς όγκους. (214-216). Dasatinib, ένας άλλος επίσης αναστολέας των of BCR-Abl, SRC, Lck, Fyn, Yes, PDGFR και πολλών άλλων κινασών, που έχει ήδη λάβει έγκριση στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία και μελετάται ως ενδιαφέρουσα εναλλακτική θεραπευτική επιλογή σε κακοήθεις όγκους (217). Μάλιστα ο συγκεκριμένος αναστολέας έχει προταθεί και σε συγχορήγηση με το αντίσωμα AMG479, (αντίσωμα έναντι του υποδοχέα του ινσουλινο-μιμητικού αυξητικού παράγοντα τύπου 1 (IGF-1R)), σε επιλεγμένες περιπτώσεις ασθενών με εμβρυικό ή κυψελιδικό ραβδομυοσάρκωμα. Σειρά έχει το μόριο Ponatinib, ένας αναστολέας των BCR-Abl, PDGFR,

VEGFR και άλλων μελών της οικογένειας των Src κινασών, που ήδη χορηγείται στην ΧΜΛ και στην ΟΛΛ , και πρόσφατες κλινικές μελέτες εξετάζουν το ενδεχόμενο επέκτασης της χρήσης του και στις υπόλοιπες κατηγορίες λευχαιμιών (218). Vandetanib, ένας επίσης αναστολέας των EGFR, VEGFR, RET και άλλων κινασών που έχει λάβει έγκριση και χορηγείται στο επιθετικό μυελοειδές καρκίνωμα του θυροειδούς προσφάτως εκτιμήθηκε ως εναλλακτική στρατηγική σε άλλους συμπαγείς όγκους (219-221). Saracatinib (AZD0530) ένας SRC και BCR-Abl αναστολέας , δοκιμάζεται για συγχορήγηση σε κολοορθικό καρκίνο, γαστρικό καρκίνο , αδενοκαρκίνωμα ωοθήκης, μικροκυτταρικό και μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα και στο μεταστατικό οστεοσάρκωμα στο πνεύμονα.(222-224). Ένα ανάλογο φαρμακευτικό σκεύασμα (AZD0424) , έχει φτάσει μέχρι κλινική μελέτη φάσης I, ως μονοθεραπεία ή και ως συνδυαστική θεραπεία σε συμπαγείς όγκους. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το μόριο KX2-391, το οποίο παρότι συνιστά έναν ακόμη από του στόματος χορηγούμενο αναστολέα τυροσινικής κινάσης, παρουσιάζει ουσιώδη διαφοροποίηση στο μηχανισμό δράσης του. Πιο συγκεκριμένα , αντί να ενσωματώνεται στο ATP pocket εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση του ATP , όπως δρουν οι περισσότεροι Src αναστολείς που αναφέρθηκαν ήδη, το μόριο KX2-391 προσκολλάται ειδικά στη θέση δέσμευσης του πεπτιδικού υποστρώματος, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου και καταστέλλοντας την ανάπτυξη δευτεροπαθών εντοπίσεων . Το εν λόγω μόριο πιθανότατα εμφανίζει συνέργεια με την πακλιταξέλη, ενώ εξετάζεται επίσης σε κλινικές μελέτες το ενδεχόμενο χορήγησης του ως μονοθεραπεία σε ασθενείς που το performance status αποκλείει τη χορήγηση χημειοθεραπείας.(225)

Στην παρούσα φάση , είναι σε εξέλιξη μεγάλη πληθώρα κλινικών μελετών , (Table I) (225-236) που μελετούν τη θεραπευτική αξία των Src αναστολέων ή και άλλων Src σχετιζόμενων αναστολέων ως αντικαρκινικούς παράγοντες, μόνοι ή σε συνδυασμό με άλλα αντινεοπλασματικά φάρμακα. Ωστόσο η αποτελεσματικότητά τους δεν έχει ακόμα πλήρως διασαφηνιστεί και μένει να εδραιωθεί ή να απορριφθεί σε επόμενες κλινικές μελέτες αναλόγως των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν σε ένα στατιστικά σημαντικό δείγμα ασθενών.

SRC αναστολέας	Συνδυαστική θεραπεία	Επιπλέον μοριακός/οι στόχοι	Τύπος Καρκίνου	Κλινική Φάση	ClinicalTrials.gov Identifier	Αποτελέσματα/Κόριες Ανεπιθύμητες Ενέργειες
Dasatinib	Afatinib	EGFR	Μη μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα	Φάση I	NCT01999985	Η μέγιστη ανεκτή δόση του Afatinib σε συνδυασμό με το Dasatinib ορίστηκε στα 40 mg και στα 140 mg, αντίστοιχα. Όλες οι μελέτες έδειξαν ORR στους 6 μήνες.. PFS ποσοστό σε συμμετέχοντες με επίκτητη EGFR αντίσταση μετρήθηκε γύρω στο 5.5 (2.6 to 8.5)μήνες. Κατά βάση Α.Ε μετρίου βαθμού συμπεριλαμβανοντας αναιμία, διάρροια, ναυτία, έμετους, βήχα και κούραση.
	Trastuzumab, Paclitaxel	HER2, Χημειοθεραπευτική Αγωγή	Μεταστατικός Καρκίνος Μαστού	Φάση I/II	NCT01306942	ORR ήταν 79.3% (95% CI 60.3-92), ποσοστό κλινικού οφέλους 82.8% (95% CI 64.2-94.2). Μέσο χρονικό διάστημα μέχρι την πρόοδο νόσου 23.9 μήνες. Τοξικότητα grade 4 δεν παρατηρήθηκε. Grade 3 τοξικότητα στα εξής :μείωση κλάσματος εξώθησης, ουδετεροπενία, υπονατριάμια, κούραση, αισθητήριακη νευροπάθεια και μια περίπτωση αριστερής κοιλιακής συστολικής δυσλειτουργίας. Φωσφορυλιωμένο (p)-SRC ήταν μειωμένο στα μονοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Φωσφορυλιωμένο SRC, ERK and AKT μειώθηκαν επίσης στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα.
	Ixabepilone	Χημειοθεραπευτική Αγωγή	Μεταστατικός Καρκίνος Μαστού	Φάση I/II	NCT00924352	Η μέγιστη ανεκτή δόση (MTD) του dasatinib (το οποίο λαμβάνεται καθημερινά συνεχώς) όταν χορηγείται σε συνδυασμό με ixabepilone (χορηγούμενο τις Days 1, 8, και 15 του 28 ημερών κύκλου) προσδιορίστηκε στα 100 mg. Αντιστοίχως, η μέγιστη ανεκτή δόση (MTD) του ixabepilone ήταν 20 mg/m ² . Το PFS του συνδυασμού Dasatinib και Ixabepilone (Phase II) ήταν 6.01 (2.92 to 8.08) μήνες. Ένα ποσοστό 19.64% αντιμετώπισε σοβαρές Α.Ε, ενώ πολλοί ασθενείς αντιμετώπισαν διάρροια, ναυτία, κούραση, αναιμία και ουδετεροπενία.
	Docetaxel	Χημειοθεραπευτική Αγωγή	Μεταστατικός Ευνοχοάντοχος Καρκίνος Προστάτη	Φάση I/II	NCT00439270	13 από τους 46 ασθενείς (28%) είχαν grade 3-4 τοξικότητα. Διάρκεια μείωση της τάξης του 50% του PSA συνέβη στους 26 από τους 46 ασθενείς (57%). 60% είχαν μια μερική ανταπόκριση (PR). Στο 30% είχε εξαφανιστεί μια βλάβη στη σάρωση των οστών. Κατά την αξιολόγηση των οστών 33 στους 38 (87%) και 26 of 34 (76%) παρουσίασαν μείωση των επιπέδων του urinary N-telopeptide ή των επιπέδων του bone-specific alkaline phosphatase, αντίστοιχα.. 61% έλαβε μονοθεραπεία με dasatinib μετά τη διακοπή της docetaxel, και παρουσίασαν σταθεροποίηση της νόσου για ένα επιπλέον χρονικό διάστημα που κυμαινόταν από 1-12 μήνες..

	Erlotinib	EGFR	Μη μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα	Φάση I/II	NCT00826449	MTD ήταν 150 mg για το erlotinib και 70 mg για το dasatinib ημερησίως, βασιζόμενοι σε 12 ασθενείς που μελετήθηκαν στη φάση 1. Οι 35 ασθενείς με NSCLC που θεραπεύτηκαν στη φάση 2 παρουσίασαν ένα συνολικό ποσοστό ελέγχου της νόσου 59% στις 6 εβδομάδες. 5 ασθενείς (15%) εμφάνισαν μερική ανταπόκριση, ενώ όλοι εμφάνισαν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του EGFR. Μέσο PFS στους 3.3 μήνες
Bosutinib	Exemestane	Ορμονοθεραπεία	Μεταστατικός Ορμονοευαίσθητος, HER2 αρνητικός καρκίνος μαστού (σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες)	Φάση II	NCT00793546	93% παρουσίασαν σχετιζόμενες με τη θεραπεία Α.Ε, συμπεριλαμβανομένου διαρροϊκών κενώσεων και ηπατοτοξικότητας. Ένα 10% αντιμετώπισε σοβαρές Α.Ε.. ένας μόλις ασθενής (300 mg/ήμερα) παρουσίασε επιβεβαιωμένη μερική ανταπόκριση. Τρεις ασθενείς (400 mg/ημέρα, n = 2; 300 mg/ημέρα, n = 1) διατήρησαν σταθερή νόσο για χρονικό διάστημα >24εβδομάδες. Μια καλύτερη ανταπόκριση της προοδευτικής νόσου εμφανίστηκε στο 36% των ασθενών. Μέσω PFS στις 12.3 εβδομάδες (80% να κυμαίνεται μεταξύ 11.0-15.6).
	Letrozole	Ορμονοθεραπεία	Καρκίνος μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες	Φάση II	NCT00880009	69% των συμμετεχόντων παρουσίασαν σχετιζόμενες με τη θεραπεία Α.Ε, με πιο κοινή τη διάρροια. Σχετιζόμενη με τη θεραπεία ηπατοτοξικότητα σε ένα ποσοστό 38%. Ένας ασθενής κατόρθωσε επιβεβαιωμένη μερική ανταπόκριση, ενώ άλλος ένας παρουσίασε σταθερή πορεία νόσου για χρονικό διάστημα >24 εβδομάδες.
	Capecitabine	Χημειοθεραπευτική Αγωγή	Προχωρήμενοι Όγκοι Συμπαγών Οργάνων	Φάση I/II	NCT00959946	Δεν παρατηρήθηκε περιοριστική δόση ως προς την τοξικότητα., μόνο ένα 6% εμφάνισαν περιοριστικές δόσεις τοξικότητας. Οι πιο κοινές σχετιζόμενες με τη θεραπεία Α.Ε ήταν η διάρροια, ναυτία, εμετός, κόπωση και η παλαμο-πελματιαία ερυθροδυσαιμία (PPE). Η καλύτερη συνολική επιβεβαιωμένη μερική ανταπόκριση ή σταθερή πορεία νόσου >24 εβδομάδες (σε όλους τους καρκινικούς τύπους) παρατηρήθηκε στο 6 και αντιστοίχως στο 13% των ασθενών που συμμετείχαν στο εν λόγω clinical trial.
	Imatinib	BCR-ABL	Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ)	Φάση III	NCT02130557	Το ποσοστό MMR στους 12 μήνες ήταν σημαντικά υψηλότερο μεταξύ των ασθενών που έλαβαν bosutinib σε σχέση με αυτούς που έλαβαν imatinib (47.2% v 36.9%, αντιστοίχως, P = .02), όπως ήταν και στο ποσοστό complete cytogenetic response (CCyR) στους 12 μήνες (77.2% v 66.4%, αντιστοίχως, P = .0075). Η αθροιστική επίπτωση ήταν ευνοϊκή με το bosutinib με γρηγορότερο χρόνο απόκρισης 1.6% των ασθενών που ελάμβανε bosutinib και 2.5% από

						τους ασθενείς που ελάμβανε imatinib, παρουσίασε εξέλιξη της νόσου σε επιταχυνόμενη φάση/ βλαστική έκρηξη. Ένα 22.0% μεταξύ των ασθενών που ελάμβανε bosutinib και αντίστοιχα το 26.8% των ασθενών που ελάμβανε imatinib διέκοψε τη θεραπεία λόγω σχετιζόμενης με τη θεραπεία τοξικότητας (12.7% και 8.7%, αντίστοιχα). Καρδιαγγειακή τοξικότητα ήταν ασυνήθης
Saracatinib (AZD0530)	Carboplatin, Paclitaxel	Χημειοθεραπευτική Αγωγή	Προχωρημένος Καρκίνος Ωοθηκών	Φάση II	NCT00610714	ORR για τους ασθενείς που έλαβαν τριπλή αγωγή ήταν στο 53,4%. PFS για τη τριπλή θεραπεία στο 8.28 (0 έως 11.04) μήνες, άνω του 7.79 (0.72 έως 12.12) μήνες για τη διπλή χωρίς το Saracatinib. Σοβαρές Α.Ε καταγράφηκαν στο 43.81% των ασθενών, με κυριότερη την εμπύρετο ουδετεροπενία. Μη σοβαρές Α.Ε παρατηρήθηκαν στο 97.14% των ασθενών που συμμετείχαν.
	Paclitaxel	Χημειοθεραπευτική Αγωγή	Καρκίνος Ωοθηκών – σαλίγγων, πρωτοπαθής όγκος του περιτοναίου	Φάση II/III	NCT01196741	Εξάμηνο PFS rate στο 29% (PxI + S) έναντι 34% (wPxI + P) (P = 0.582). Μέσο PFS ήταν στο 4.7 σε σχέση με το 5.3 μήνες (hazard ratio 1.00, 95% μεταξύ των 0.65-1.54; P = 0.99). Ποσοστό ανταπόκρισης (μερικής +πλήρης) ήταν 29% (wPxI + S) έναντι 43% (wPxI + P), P value = 0.158. Grade 3/4 Α.Ε στο 36% έναντι του 31% (P = 0.624); οι συχνότερες G3/4 τοξικότητες ήταν οι κάτωθι: έμετος, κοιλιακός πόνος και διάρροια. Εμπύρετος ουδετεροπενία παρατηρήθηκε συχνότερα στο group που έλαβε θεραπεία με saracatinib (4.3%) έναντι placebo (0%). Ανταπόκριση, PFS και Overall survival ήταν όλα σημαντικά υψηλότερα P < 0.05 σε ασθενείς που έλαβαν ταξάνη για διάστημα ≥6 μήνες/όχι προηγούμενη λήψη ταξάνης, (n = 85) από αυτούς που έλαβαν για χρονικό διάστημα <6 μηνών (n = 22), ανεξάρτητα από την τυχαιοποίηση.

9) Στρατηγικές διπλής στόχευσης σε Src θετικούς καρκίνους

9.1) Εισαγωγή

Λαμβάνοντας υπόψιν τη διαπιστωμένη συμμετοχή του Src σηματοδοτικού μονοπατιού στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, έλαβαν χώρα πολλαπλές μελέτες και σχεδιάστηκαν πολλά μικρά μόρια που αναστέλλουν ειδικά το συγκεκριμένο μονοπάτι. Ωστόσο ενώ αποδείχτηκε ότι συνιστά μια πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική στρατηγική,

υπάρχουν ακόμα πολλά στοιχεία της ογκοβιολογίας του Src που αγνοούμε. Ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας του είναι η ανάδειξη κατάλληλων προβλεπτικών βιοδεικτών ανταπόκρισης στη θεραπεία, προκειμένου να σχεδιαστούν εκ νέου προ-κλινικές και κλινικές μελέτες, αυτή τη φορά με κατάλληλα επιλεγμένους ασθενείς, που αναμένεται να έχουν το μέγιστο κλινικό όφελος καθώς υπερκεράζουν το εν λόγω μοριακό μονοπάτι. Μάλιστα, σε μια ανάλογα σχεδιασμένη εργασία όπου χρησιμοποιήθηκαν 23 δείγματα από κυτταρικές σειρές κολορθικού καρκίνου που υπερεκφράζουν το Src, παρατήρησαν απόλυτη ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων κατά την έκθεση σε saracatinib, επιβεβαιώνοντας έτσι τη σημαντικότητα της επιλογής του κατάλληλου δείγματος ασθενών κατά τη στόχευση με αυτά τα μόρια. (237). Αντίθετα, μειωμένη Src δραστηριότητα, ως απότοκος αρνητικής ρύθμισης από άλλα ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγεί στην de novo ανάπτυξη αντίστασης σε Src αναστολείς. Για παράδειγμα, σε ένα πείραμα όπου εξετάστηκαν 346 διαφορετικά δείγματα μεταστατικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος, φάνηκε ότι το Src σηματοδοτικό μονοπάτι υπερεκφράζεται στις περιπτώσεις νεφροκυτταρικού καρκίνου που χαρακτηρίζονταν από wild type von Hippel-Lindau (VHL) γονιδιακή έκφραση(238). Έτσι τα VHL wild type RCC(renal cell carcinoma) κύτταρα που είναι Src θετικά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητά στη θεραπεία με dasatinib, εν αντιθέσει με τα VHL μεταλλαγμένα Src θετικά RCC κύτταρα που εμφανίζουν αντίσταση στη θεραπεία με dasatinib. Μάλιστα προτάθηκε ως πιθανός μηχανισμός ανάπτυξης αντίστασης η μέσω του παράγοντά HIF απενεργοποίηση του PTP1B με επακόλουθη απενεργοποίηση του καταρράκτη του Src και απευαισθητοποίηση του καρκινικού κυττάρου από τη στοχευμένη θεραπεία(238). Συνεχώς ανακαλύπτονται και άλλοι γενετικοί πολυμορφισμοί που φαίνεται να σχετίζονται με την απάντηση των καρκινικών κυττάρων στους Src αναστολείς. Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις γαστρικού καρκίνου με ενίσχυση του γονιδίου c-Met παρατηρήθηκε ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία με dasatinib.(239). Προσφάτως, το μονοπάτι της αυτοφαγίας φάνηκε επίσης να μετέχει στην επαγωγή αντίστασης στους Src αναστολείς, με την καταστολή του να οδηγεί σε εκ νέου ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων σε αυτούς(240). Τέλος, σε περιπτώσεις ορμονοευαίσθητου καρκίνου μαστού παρατηρήθηκε ανάπτυξη αντίστασης στο saracatinib μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού mTOR(241,242). Ως συνέπεια των ανωτέρω, εύκολα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη αντίστασης σε Src αναστολείς είναι αποτέλεσμα πολλαπλών γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων που συμβαίνουν στα καρκινικά κύτταρα.

9.2) Στρατηγική διπλής στόχευσης στον καρκίνο του μαστού

Είναι ευρέως γνωστό ότι στη καθημερινή κλινική πρακτική έχει εισαχθεί εδώ και χρόνια το Trastuzumab, ένα ανασυνδιασμένο εξανθρωποποιημένο IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα -human epidermal growth factor receptor 2-HER2) ως standard of care σε συνδυασμό με τη κλασική χημειοθεραπεία στους HER2 θετικούς καρκίνους μαστού, αλλάζοντας δραματικά το διάστημά ελευθέρως νόσου καθώς και την συνολική επιβίωση των ασθενών αυτών. Δεδομένου μάλιστα ότι εμφανίζεται ενίσχυση του γονιδίου HER2 ή αλλιώς ERBB2, σε ένα ποσοστό 15-20 % επί των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου μαστού, με την παρουσία του να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση των γυναικών αυτών , εύκολα συμπεραίνει κανείς τη σημασία σωστής κατηγοριοποίηση των ασθενών βάση του ανοσοϊστοχημικού προφίλ έκφρασης και τεχνικών in situ υβριδισμού, προκειμένου να καταταχθούν σε επιμέρους ομάδες αναλόγως του αναμενόμενου κλινικού οφέλους από τη λήψη τραστουζουμάμπης. Ωστόσο φαίνεται να αναπτύσσονται διάφοροι μηχανισμοί επίκτητης αντίστασης στο Trastuzumab , μειώνοντας έτσι περαιτέρω τον αριθμό των ασθενών εκείνων που αναμένεται να ωφεληθούν σημαντικά από τη λήψη αντι -HER2 θεραπείας.(243). Παρόλα αυτά το επίπεδο έκφρασης του HER 2 παραμένει ο σημαντικότερος προβλεπτικός παράγοντας στην καθημερινή κλινική πράξη για την επιλογή ασθενών που πρόκειται να λάβουν στοχευμένη θεραπεία με αντί -HER 2 αντίσωμα. (244) Πολλαπλές μελέτες ανέδειξαν τη πιθανή συμβολή του Src στην ανάπτυξη αντίστασης σε HER 2 θετικούς καρκίνους μαστού(245-250) μέσω κάποιων μεταλλάξεων του PTEN που επηρεάζουν άμεσα την Src δραστικότητα.(245). Μάλιστα δεν αποκλείεται η έκφραση του Src να σχετίζεται και με την ανάπτυξη αντίστασης στο lapatinib, ενός διπλού αναστολέα του HER1 και του HER2.(251)

Το 2016 ο Rong Li και οι συνεργάτες του σε μια πρωτότυπη εργασία συνέδεσαν το μονοπάτι RANK-RANKL με το Src σε επιλεγμένες περιπτώσεις καρκίνου μαστού. Αναλυτικότερα, ο άξονας RANK-RANKL είναι γνωστός για τον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζει στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης και στην επαγωγή οστεολυτικών μεταστάσεων. Επιπροσθέτως συμμετέχει στην ανάπτυξη και διαμόρφωση του φυσιολογικού μαστικού αδένου ενώ ρυθμίζει την μέσω προγεστερόνη επαγόμενη καρκινογένεση στο μαστό. (252-255).Από την άλλη μεριά , όπως ήδη αναφέρθηκε το μόριο

Src κατέχει ένα κεντρικό ρόλο σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης καθώς επάγει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαίρεση, τη διήθηση, την αγγειογένεση καθώς και την ανάπτυξη μεταστατικού φαινοτύπου(256). Μάλιστα τα δύο αυτά μόρια φάνηκε να συνδέονται μεταξύ τους, καθώς το RANKL ενεργοποιεί την αντί-αποπτωτική κινάση Akt μέσω του Src, με ταυτόχρονη ενεργοποίηση και άλλων κρίσιμων σηματοδοτικών μορίων όπως: NF-κB, MAP κινάση και NFATc1(257). Στην συγκεκριμένη εργασία φάνηκε ότι παρατηρείται συχνά ενισχυμένη έκφραση του RANK-RANKL άξονα ιδιαίτερα στους triple negative καρκίνους μαστού, με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του να σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση και με την ανάπτυξη δευτεροπαθών εντοπίσεων ιδίως στον εγκέφαλο (258). Επίσης παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του RANK και του Src καθώς και χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του RANKL στους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού σε σχέση με τους άλλους ιστολογικούς υπότυπους. Έτσι λαμβάνοντας υπόψιν την επικοινωνία μεταξύ των δύο αυτών μορίων προτείνεται μια στρατηγική διπλής στόχευσης των RANK+Src+ τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού με denosumab -dasatinib προκειμένου να εξεταστεί μια επιπλέον εναλλακτική επιλογή της συστηματικής χημειοθεραπείας σε επιλεγμένους ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού.(256,259-263)

Τέλος, σε μια πρόσφατη εργασία του 2019, ο Shabnam Shahrokh και οι συνεργάτες του εξέτασαν την πιθανή συμβολή των Src αναστολέων ως μια στρατηγική αύξησης της δραστηριότητας της ακτινοθεραπείας στον καρκίνο του μαστού. Αναλυτικότερα, εδώ και πολλά χρόνια έχει καθιερωθεί σε συντηρητικές επεμβάσεις καρκίνου του μαστού να ακολουθεί επικουρική ακτινοθεραπεία, με ή χωρίς συνοδό ακτινοβολία του αποχετευτικού λεμφαγγειακού δικτύου, προκειμένου να αποστειρωθεί η εν λόγω περιοχή και να μειωθεί ο κίνδυνος τοπικής υποτροπής. Επίσης σε ορισμένες επιλεγμένες περιπτώσεις ενδείκνυται και μετά από μαστεκτομή η ακτινοβολία της περιοχής προκειμένου να μειωθεί ο τοποπεριοχικός κίνδυνος και να αυξηθεί το διάστημα ελευθέρως νόσου. Τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν: περιπτώσεις με ιδιαίτερα μεγάλο μέγεθος της πρωτοπαθούς εστίας >5 cm, σε φλεγμονώδες ca και όταν μέσω μαγνητικής μαστογραφίας αναδεικνύεται διήθηση του δέρματός ή του θωρακικού τοιχώματος. Επίσης όσον αφορά τις ενδείξεις ακτινοβολίας της μασχάλης, απόλυτη ένδειξη συνιστά η N2 νόσος, όπου ανευρίσκονται >4 διηθημένοι λεμφαδένες, ενώ σε πολλά κέντρα έχει επεκταθεί η ένδειξη

και στη N1 νόσο , ειδικά σε περιπτώσεις όπου ανευρίσκονται κατά τον λεμφαδενικό καθαρισμό 3 διηθημένοι λεμφαδένες. (264,265). Επιπλέον αποδείχθηκε ότι η προσθήκη RT αύξησε σημαντικά της αποτελεσματικότητας της συστηματικής χημειοθεραπείας στον καρκίνο του μαστού. (265). Ωστόσο ορισμένοι τύποι καρκίνου εμφανίζουν αντίσταση στην ακτινοβολία μέσω ενεργοποίησης συγκεκριμένων μοριακών μονοπατιών, με το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας να είναι στραμμένο στην ανάδειξη και τη στόχευση των πολύπλοκων αυτών μοριακών μηχανισμών, προκειμένου να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της RT (266-268). Έτσι στη συγκεκριμένη εργασία , ο Shabnam Shahrokh και οι συνεργάτες του εκτίμησαν την επίδραση μιας συγκεκριμένης δόσης RT (10 Gy) στην καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB-231, και μέσω πρωτεομικής ανάλυσης ταυτοποίησαν 14 διαφορετικές πρωτεΐνες που παρουσίαζαν σημαντική ενίσχυση μετά την έκθεση των κυττάρων στην ακτινοβολία. (269,270). Μάλιστα παρατήρησαν επιπλέον 10 γειτονικά μόρια τα οποία επίσης εμφάνιζαν ενίσχυση της έκφρασής τους. Περαιτέρω αναλύσεις ανέδειξαν τους FN1, CSPG4, LRP1, GSN, RTN4, και CTSD ως μόρια κλειδιά στην ανάπτυξη αντίστασης στην RT. Τέλος φάνηκε πως τα εν λόγω μόρια σχετίζονταν με ενεργοποίηση του Src καθώς και άλλων σημαντικών ογκογονιδίων όπως του AKT1. Συμπερασματικά, η αναστολή του άξονα Src αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική διπλής στόχευσης , προκειμένου να ευαισθητοποιηθούν τα καρκινικά κύτταρα στη χορηγούμενη ακτινοβολία. (271)

9.3) Στρατηγική διπλής στόχευσης σε καρκίνους του γαστρεντερικού σωλήνα

Η σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση του μεταστατικού κολοορθικού καρκίνου περιλαμβάνει τη χειρουργική εκτομή, τη χημειοθεραπεία , μονοκλωνικά αντισώματα, όπως αντί-αγγειογενετικούς παράγοντες(anti -VEGF παράγοντες) - bevacizumab, αντισώματα έναντι του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR , όπως είναι το cetuximab και το ranitumumab και ανοσοθεραπεία. Έτσι τα τελευταία χρόνια η συνολική επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο έχει αυξηθεί σημαντικά , παρότι υπάρχουν ακόμα αρκετοί ασθενείς που εμφανίζουν αντίσταση στις καθιερωμένες θεραπείες ,. Ως εκ τούτου, γίνεται συνεχής προσπάθεια για ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων και συνοδό ανάπτυξη μικρών μορίων που θα αναστέλλουν ειδικά κινάσες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη αντίστασης. (272,273).Μέχρι το 2012 δεν είχε καταστεί εφικτή η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού αναστολέα κινασών . Το 2012 λαμβάνει χώρα μια κλινική μελέτη φάσης

3, που αναδεικνύει ένα μικρό μόριο αναστολέα πολλαπλών κινασών ως μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση σε ασθενείς με μεταστατικό ανθεκτικό κολορροθικό καρκίνο .(274) Έτσι το regorafenib, ένας από του στόματος χορηγούμενος αναστολέας πολλαπλών κινασών μεταξύ των οποίων είναι οι : VEGFR1-3, TIE2, KIT, RET, RAF1 ,BRAF, PDGFR και FRGFR (275), αποτέλεσε το πρώτο πολλά υποσχόμενο αναστολέα κινασών για τις περιπτώσεις εκείνες που οι συνήθεις θεραπευτικοί χειρισμοί είχαν αποτύχει, ενώ προτάθηκε η συγχορήγηση του με άλλες στοχευμένες θεραπείες προκειμένου να εξασφαλιστεί το μέγιστο κλινικό του όφελος.(274-276).

Σε πρόσφατη εργασία αποδείχθηκε ότι ενώ ο άξονας HGF/MET ενέχεται αποδεδειγμένα στην ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία με anti-EGFR παράγοντες(277) , η αναστολή του άξονα από μικρά μόρια δεν ήταν επαρκής για την αναχαίτηση της καρκινογένεσης. Πιο συγκεκριμένα αποδείχθηκε ο διπλός μηχανισμός ενεργοποίησης του MET μέσω του προσδέτη HGF καθώς και μέσω της ενεργοποίησης των EGF και IGF-1. Στη συνέχεια αποδείχθηκε η εμπλοκή του Src στην άνευ προσδέτη ενεργοποίηση του άξονα MET ,καθώς διαμεσολαβεί στην αλληλεπίδραση του MET με τους EGFR και IGF-1R. Επομένως, όταν χορηγήθηκε στις καρκινικές κυτταρικές σειρές από wild type (HT-29) αλλά και mutant RAS(HCT-116) κύτταρα συνδυασμένη θεραπεία με αναστολείς MET και Src ,παρατηρήθηκε αυξημένη αναστολή της βιωσιμότητας των κυττάρων και επαγωγή της απόπτωσης, παρέχοντας έτσι μια νέα στρατηγική διπλής στόχευσης που υπερνικά τους μηχανισμούς αντίστασης που αναπτύσσει το καρκινικό κύτταρο του παχέος εντέρου.(278-281) Μάλιστα η εμπλοκή του Src στην ανάπτυξη αντίστασης ήταν ήδη γνωστή από προηγούμενες εργασίες που μελετούσαν μηχανισμούς διαφυγής του καρκινικού κυττάρου που είχε εκτεθεί σε anti-EGFR παράγοντες(282,283).

Όπως ήδη αναφέρθηκε , σημαντική είναι η συμβολή του Src κατά την ανάπτυξη αντίστασης σε αντί-HER2 θεραπείες στον μαστό(284). Μια νέα μελέτη ήρθε να αναδείξει τη εμπλοκή του Src στην επαγωγή αντίστασης, αυτή τη φορά όχι στο μαστό, αλλά σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που είχαν προέλθει από HR γαστρικό καρκίνο και HR καρκίνο χοληφόρων. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής σειρές : NU-216, NCI-N87, SNU-2670 και SNU-2773 με αυξημένη φωσφορυλίωση του Src να παρατηρείται μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης ενώ η πρώτη και η τέταρτη χαρακτηρίζονταν από ενίσχυση της FAK και όχι της Src . Ωστόσο είναι ήδη γνωστό το γεγονός ότι η Src αλληλοεπιδρά με τη FAK επάγοντας έτσι τη

ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κινασών μεταξύ των οποίων είναι: AKT, ERK και STAT3. Κατά τη χορήγηση bosutinib υπήρξε άρση της αντίστασης στο trastuzumab τόσο στα Src +/HR + όσο και στα Src -/ HR +FAK +κύτταρα. Συμπερασματικά , φάνηκε ότι σε HR κύτταρα που έχουν προκύψει είτε μέσω ενεργοποίησης του Src , είτε μέσω ενεργοποίησης του FAK ,η αντίσταση μπορεί να αντιστραφεί μέσω της χορήγησης ενός αναστολέα του Src , όπως είναι το bosutinib.(243, 285-287)

9.4) Στρατηγική διπλής στόχευσης στο καρκίνο των ωοθηκών

Άλλη μια μεγάλη μελέτη, αυτή τη φορά γύρω από τον καρκίνο των ωοθηκών , ήρθε να αναδείξει νέες στρατηγικές προκειμένου να καταπολεμηθεί ο πιο θανατηφόρος γυναικολογικός καρκίνος (288). Παρά την εισαγωγή των στοχευμένων θεραπειών όπως για παράδειγμα είναι οι PARP αναστολείς, ο καρκίνος των ωοθηκών παραμένει εξαιρετικά δυσοίωνος, με τις περισσότερες ασθενείς να εμφανίζουν υποτροπή της νόσου τους μόλις δύο χρόνια έπειτα από τον αρχικό χειρισμό (288,289) . Στο σήμερα, το υψηλού βαθμού κακοηθείας ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών (HGSO) αποτελεί τον πλέον συνήθη και ταυτόχρονα κακοήγη ιστολογικό τύπο, ενώ χαρακτηρίζεται από μεγάλη γενομική αστάθεια και ελάχιστες εν δυνάμει στοχεύσιμες γονιδιακές μεταλλάξεις.(290). Αποδείχθηκε ότι συχνά παρουσιάζει ενεργοποίηση τόσο του Src όσο και του άξονα της MAPK(291,292). Εύλογα λοιπόν προτάθηκε και δοκιμάστηκε στη συγκεκριμένη μελέτη η διπλή στόχευση μέσω των μορίων Selumetinib (AZD6244) και του Saracatinib (AZD0530). Αποδείχθηκε μέσω των in vitro πειραμάτων η συνεργική δράση των δύο αυτών μικρών μορίων σε περιπτώσεις HGSO, που επάγουν την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, μην επιτρέποντας την μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, ενώ υπήρξαν ενδείξεις για δραστικότητα τους και σε περιπτώσεις ενδομητριοειδούς και διαυγοκυτταρικού καρκίνου των ωοθηκών. Πιο αναλυτικά φάνηκε μέσω της διπλής στόχευσης να ενεργοποιείται αρχικά ο μηχανισμός της αυτοφαγίας , που μετά από παρατεταμένο stress οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, καθώς και αυτός της κυτταρικής απόπτωσης σε δεύτερο χρόνο.(293) Περαιτέρω μελέτες , κλινικής φάσης 1 με διπλή στόχευση επιβάλλεται να διενεργηθούν προκειμένου να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα, σε συνδυασμό με την ανεκτικότητα στη θεραπεία ,καθώς και η βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό.(294)

9.5) Στρατηγική διπλής στόχευσης στον καρκίνο κεφαλής -τραχήλου

Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρατηρείται σε περιπτώσεις καρκίνου κεφαλής τραχήλου, όπου πρόκειται για μια κατηγορία καρκίνου από πλακώδη κύτταρα που αναπτύσσεται στο έδαφος του βλεννογόνου που επενδύει τη στοματική κοιλότητα και επεκτείνεται μέχρι το φάρυγγα και τον λάρυγγα, συνιστώντας τον έκτο σε σειρά συχνότητας εμφάνισης καρκίνο παγκοσμίως. (HNSCC). Είναι γνωστό, ότι οι κλασσικοί θεραπευτικοί χειρισμοί (ΧΜΘ+ΑΚΘ) οδηγούν στην εμφάνιση σημαντικών επιπλοκών όπως : διαταραχές μάσησης, αλλαγή της φωνής και παραμόρφωση προσώπου, χωρίς να έχουν καταφέρει να αυξήσουν σημαντικά τη συνολική επιβίωση των ασθενών αυτών (295-297). Προκειμένου λοιπόν να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα και συνάμα να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες της τοξικής συστηματικής χημειοθεραπείας που επηρεάζουν αισθητά την ποιότητα ζωής των ασθενών αυτών, έχουν προταθεί πολλά διαφορετικά μικρά μόρια αναστολείς που στοχεύουν έναντι της τυροσινικής κινάσης του Src, που συχνά υπερεκφράζεται σε περιπτώσεις HNSCC.(298-302) Ωστόσο η μονοθεραπεία με Src αναστολείς αποδέχθηκε αναποτελεσματική σε πρόσφατες κλινικές μελέτες σε μεγάλο δείγμα ασθενών, υποδεικνύοντας έτσι της ύπαρξη σύνθετων υποκείμενων μοριακών μηχανισμών που αλληλοεπιδρούν και επάγουν την ανάπτυξη αντίστασης(300-302). Έτσι το 2019 μια πρωτότυπη εργασία των Liwei Lang και των συνεργατών του, ήρθε να προτείνει μια στρατηγική διπλής στόχευσης μέσω χρήσης ειδικών νανοσωματιδίων που μετέφεραν εκλεκτικά δύο αναστολείς των Src και AKT. Αναλυτικότερα, καθώς είχαν ήδη αποδείξει την ενισχυμένη έκφραση και των δύο κινασών επέλεξαν να σχεδιάσουν ειδικά ευαίσθητα στη καθρυψίνη νανοσωματίδια που θα μετέφεραν στοχευμένα τους αναστολείς saracatinib (AZD0530) και capivasertib (AZD5363) στο καρκινικό κύτταρο στόχο. Παρατήρησαν ότι καθώς το μόριο Capivasertib απενεργοποιούσε την AKT σηματοδότηση οδηγούσε και στην επανευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων στο saracatinib, οδηγώντας στην καταστολή της καρκινικής ανάπτυξης πολύ πιο αποτελεσματικά σε σχέση με τη μονοθεραπεία.(303)

10) Συμπεράσματα

Η έρευνα στο ρετροϊό RSV και στο ογκογονίδιο Src αποτέλεσε το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη και ανακάλυψη νέων ογκογονιδίων, και σηματοδότησε την κατανόηση της γενετικής βάσης του καρκίνου. Όπως είναι ήδη γνωστό, πολλαπλοί μοριακοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και μετανάστευση του καρκινικού κυττάρου. Παρά το γεγονός ότι το ογκογονίδιο Src έχει αποτελέσει αντικείμενο διεξοδικής μελέτης από πολλές ομάδες επιστημόνων κατά τη διάρκεια του τελευταίου αιώνα, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που επάγουν την εξέλιξη του όγκου δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως. Η συμβολή των miRNAs καθώς και των εξωσωμάτων στην απόκτηση κακοήθους μορφολογίας και φαινοτύπου, συνιστά μια πιθανή λογική εξήγηση των μηχανισμών που διέπουν την μέσω Src ογκογένεση, ενώ μπορεί εν δυνάμει να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα στρατηγική διπλής στόχευσης, αν και απαιτούνται περαιτέρω κλινικές μελέτες προκειμένου να εξασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια των συγκεκριμένων αναστολέων στον άνθρωπο. Μάλιστα τόσο τα εξωσώματα όσο και τα miRNAs έχουν ήδη μελετηθεί και προταθεί ως πιθανοί διαγνωστικοί, προγνωστικοί, και προβλεπτικοί βιοδείκτες στην Src επαγόμενη ογκογένεση, συμβάλλοντας κατά αυτόν το τρόπο σε μια ορθολογικότερη και συνάμα πιο αποτελεσματική ταξινόμηση και θεραπεία των ασθενών αυτών. Επιπροσθέτως, λαμβάνοντας υπόψιν τη διαπιστωμένη συμμετοχή του Src σηματοδοτικού μονοπατιού στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, σχεδιάστηκαν πολλά μικρά μόρια που αναστέλλουν ειδικά το συγκεκριμένο μονοπάτι. Ωστόσο ενώ αποδείχτηκε ότι συνιστά μια πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική στρατηγική, υπάρχουν ακόμα πολλά στοιχεία της ογκοβιολογίας του Src που αγνοούμε. Έτσι μειωμένη Src δραστηριότητα, ως απότοκος αρνητικής ρύθμισης από άλλα ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγεί στην de novo ανάπτυξη αντίστασης σε Src αναστολείς, καθιστώντας τα μικρά αυτά μόρια αδρανή και αναποτελεσματικά. Συνεχώς ανακαλύπτονται και άλλοι γενετικοί πολυμορφισμοί που φαίνεται να σχετίζονται με την απάντηση των καρκινικών κυττάρων στους Src αναστολείς και προτείνονται εκ νέου στρατηγικές διπλής στόχευσης προκειμένου να ανασταλούν οι παρακαμπτήριες οδοί της Src ογκογένεσης και να αναχαιτιστεί η κακοήθης εξαλλαγή του κυττάρου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Έναν αιώνα σχεδόν μετά την αρχική ανακάλυψη του ογκογόνου ιού RSV από τον Peyton Rous , το πρώτο-ογκογονίδιο c-SRC, , έχει αναδειχθεί ως ένας κύριος ρυθμιστής της καρκινογένεσης στον άνθρωπο, καθώς ενέχεται στη ανάπτυξη ,διαφοροποίηση και απόκτηση μεταστατικού δυναμικού, συνιστώντας έναν πιθανό στόχο μοριακής στόχευσης έναντι του καρκίνου. Πάρα το γεγονός ότι το εν λόγω ογκογονίδιο έχει μελετηθεί αναλυτικά, οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί που μεσολαβούν δεν έχουν ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Σκοπός της εν λόγω διπλωματικής εργασίας είναι να αναδείξει μέσω μιας σύντομης ιστορικής ανάδρομης το πως η ερευνά στο ρετροϊό RSV και το ογκογονίδιο Src σηματοδότησε την κατανόηση της γενετικής βάσης του καρκίνου, και έθεσε τη βάση για την ανάπτυξη στοχευμένων αντικαρκινικών φαρμάκων που αναστέλλουν τη δραστικότητα τυροσινικής κινάσης. Επιπλέον εστίασαμε στην συμβολή των miRNAs και των εξωσωμάτων στην απόκτηση κακοήθους φαινοτύπου, και σε μια πιθανή ανάγκη διπλής στόχευσης καθοδόν προς το βέλτιστο θεραπευτικό ογκολογικό αποτέλεσμα. Τέλος, τα εν λόγω μόρια προτείνονται ως πιθανοί βιοδείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης καθώς και πρόβλεψης ανταπόκρισης στη θεραπεία, με στόχο τη διάκριση των ασθενών που πρόκειται να ωφεληθούν περισσότερο από τη στοχευμένη αυτή αγωγή βάσει της γονιδιακής τους υπογραφής.

Summary

Nearly a century after the first discovery of the RSV oncogenic virus by Peyton Rous the proto-oncogene c-Src has emerged as a major regulator of human carcinogenesis, as it is involved in the development, differentiation and acquisition of metastatic phenotype, constituting a potential target for molecular approach against cancer. Despite the fact that

the Src gene, is now well studied, molecular pathways through which carcinogenesis is induced have not yet been clarified. The purpose of this dissertation is to highlight through a brief historical background how research on RSV retrovirus and Src proto-oncogene set the fundamentals to understand the genetic basis of cancer and laid the groundwork for the development of targeted anticancer molecules that inhibit tyrosine kinase activity. Furthermore miRNAs and exosomes may contribute an emerging therapeutic strategy of combinational therapies with double pathway inhibition, although further studies are needed. Finally, we suggest that both exosomes and miRNAs could be useful diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in Src induced carcinogenesis, thus helping in the more rational and effective classification and treatment of these patients, based on their genetic signature.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Hanahan, D., & Weinberg, R. A :The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1) :57–70 ,2000
- 2) Yilmaz, M., Christofori, G., & Lehenbre, F: Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends in Molecular Medicine* 13(12): 535–541,2007
- 3) Guo, W., & Giancotti, F. G: Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(10): 816–826,2004
- 4) Yousefi, M., Bahrami, T., Salmaninejad, A., Nosrati, R., Ghaffari, P., & Ghaffari, S. H :Lung cancer-associated brain metastasis. Molecular mechanisms and therapeutic options. *Cellular Oncology*, 40(5): 419–441,2017
- 5) Kumar, C. C :Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 17(11): 1365–1373,1998
- 6) Mitra, S. K., & Schlaepfer, D. D: Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Current Opinion in Cell Biology* 18(5): 516–523,2006
- 7) Frame MC: Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602: 114-130, 2002.
- 8) Ishizawa R and Parsons SJ: c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 6: 209-214, 2004.
- 9) Summy JM and Gallick GE: Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 22: 337-358, 2003.

- 10) Irby RB and Yeatman TJ: Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19: 5636-5642, 2000.
- 11) Yeatman TJ: A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4: 470-480, 2004.
- 12) Kim LC, Song L and Haura EB: Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 6: 587-595, 2009.
- 13) Krishnan H, Miller WT and Goldberg GS: SRC points the way to biomarkers and chemotherapeutic targets. *Genes Cancer* 3: 426-435, 2012.
- 14) Thomas, S. M., & Brugge, J. S :CELLULAR FUNCTIONS REGULATED BY SRC FAMILY KINASES. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13(1): 513–609,1997
- 15) Fan, S., Meng, Q., Laterra, J. J., & Rosen, E. M: Role of Src Signal Transduction Pathways in Scatter Factor-mediated Cellular Protection. *Journal of Biological Chemistry* 284(12): 7561–7577,2008
- 16) Brown MT and Cooper JA: Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287: 121-149, 1996.
- 17) Playford MP and Schaller MD: The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23: 7928-7946, 2004.
- 18) Hakak Y and Martin GS: Ubiquitin-dependent degradation of active Src. *Curr Biol* 9: 1039-1042, 1999.
- 19) Laszlo GS and Cooper JA: Restriction of Src activity by Cullin-5. *Curr Biol* 19: 157-162, 2009.
- 20) Okada M, Nada S, Yamanashi Y, Yamamoto T and Nakagawa H: CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J Biol Chem* 266: 24249-24252, 1991.
- 21) Ingley E: Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* 1784: 56-65, 2008.
- 22) Rous P: Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *J Amer Med Assoc* 56: 198-198, 1911.
- 23) Rous P: A sarcoma of the fowl transmissible by an agent from the tumor cells. *J Exp Med* 13: 397-411, 1911.

- 24) El-Araby, A. M., Fouad, A. A., Hanbal, A. M., Abdelwahab, S. M., Qassem, O. M., & El-Araby, M. E. : Epigenetic Pathways of Oncogenic Viruses: Therapeutic Promises. *Archiv Der Pharmazie* 349(2): 73–90, 2016
- 25) Lippi, D., Gotuzzo, E., & Caini, S. (n.d.): Cholera..*Paleomicrobiology of Humans* : 173–180, 2015
- 26) Burrough, E. R: Swine Dysentery. *Veterinary Pathology* 54(1): 22–31,2016
- 27) Ito, N., Moseley, G. W., & Sugiyama, M: The importance of immune evasion in the pathogenesis of rabies virus. *Journal of Veterinary Medical Science*,78(7): 1089–1098,2016
- 28) Bittner JJ: The Milk-Influence of Breast Tumors in Mice. *Science* 95: 462-463, 1942.
- 29) Gross L: "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med* 76: 27-32, 1951.
- 30) Shope RE and Hurst EW: Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med* 58: 607-624, 1933.
- 31) Sweet BH and Hilleman MR: The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med* 105: 420-427, 1960.
- 32) Epstein MA, Achong BG and Barr YM: Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1: 702-703, 1964.
- 33) Epstein MA, Achong BG, Barr YM : Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1 :702 – 703,1964
- 34) Young LS, Yap LF, Murray PG: Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nat. Rev. Cancer* 16 :789 – 802,2016
- 35) Jha HC, Pei Y, Robertson ES : Epstein-Barr virus: diseases linked to infection and transformation. *Front. Microbiol.* 7: 1602,2016
- 36) Kenney, S. C. (n.d.) : Reactivation and lytic replication of EBV. *Human Herpesviruses*. Cambridge University Press :403–433,2007
- 37) McKenzie J, El-Guindy A :Epstein-Barr virus lytic cycle reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 391: 237 – 261,2015
- 38) Lo KW, To KF, Huang DP: Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell* 5: 423 – 428, 2004

- 39) Tsao SW, Yip YL, Tsang CM, Pang PS, Lau VM, Zhang G, Lo KW : Etiological factors of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 50: 330 – 338,2014
- 40) Gunven P, Klein G, Henle G, Henle W, Clifford P: Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. Antibodies to EBV associated membrane and viral capsid antigens in Burkitt lymphoma patients. *Nature* 228 :1053 – 1056,1970
- 41) Wolf H, Zur Hausen H, Klein G, Becker V, Henle G, Henle W: Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. III. Epstein-Barr viral DNA in non-lymphoid nasopharyngeal carcinoma cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 161: 15 – 21,1975
- 42) Kurth R and Bannert N: Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *Int J Cancer* 126: 306-314, 2010.
- 43) Stolt, C.-M., Klein, G., & Jansson, A. T. R: An Analysis of a Wrong Nobel Prize—Johannes Fibiger, 1926: A Study in the Nobel Archives. *Advances in Cancer Research* 1–12, 2004
- 44) Boveri T: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer, Jena, 1914.
- 45) Conney AH, Miller EC and Miller JA: The Metabolism of Methylated Aminoazo Dyes .5. Evidence for Induction of Enzyme Synthesis in the Rat by 3-Methylcholanthrene. *Cancer Res* 16: 450-459, 1956.
- 46) Cook JW, Hewett CL and Hieger I: 106. The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, and III. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 395-405, 1933.
- 47) Miller EC and Miller JA: The Presence and Significance of Bound Aminoazo Dyes in the Livers of Rats Fed Para-Dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 7: 468-480, 1947.
- 48) Pott P: Chirurgische observations : relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the mortification of the toes and feet. 1775.
- 49) Yamagiwa K and Ichikawa K: Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *CA Cancer J Clin* 27: 174-181, 1977.
- 50) Temin HM and Rubin H: Characteristics of an Assay for Rous Sarcoma Virus and Rous Sarcoma Cells in Tissue Culture. *Virology* 6: 669-688, 1958.
- 51) Rous, P :The Challenge to Man of the Neoplastic Cell. *Science* 157(3784) :24–28, 1967
- 52) Duesberg PH and Vogt PK: Differences between Ribonucleic Acids of Transforming and Nontransforming Avian Tumor Viruses. *P Natl Acad Sci USA* 67: 1673-&, 1970.

- 53) Martin GS: Rous Sarcoma Virus - a Function Required for Maintenance of Transformed State. *Nature* 227: 1021-&, 1970.
- 54) Toyoshima K and Vogt PK: Temperature Sensitive Mutants of an Avian Sarcoma Virus. *Virology* 39: 930+, 1969.
- 55) Erikson, R. L: Molecular events in cells transformed by Rous Sarcoma virus. *The Journal of Cell Biology* 87(2): 319–325, 1980
- 56) Purchio, A. F., Erikson, E., Brugge, J. S., & Erikson, R. L: Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus src gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(3): 1567–1571,1978
- 57) Scherer, W. F :STUDIES ON THE PROPAGATION IN VITRO OF POLIOMYELITIS VIRUSES: IV. VIRAL MULTIPLICATION IN A STABLE STRAIN OF HUMAN MALIGNANT EPITHELIAL CELLS (STRAIN HELA) DERIVED FROM AN EPIDERMOID CARCINOMA OF THE CERVIX. *Journal of Experimental Medicine* 97(5) : 695–710, 1953
- 58) Melnick, J. L :Papova Virus Group. *Science* 135(3509) :1128–1130, 1962
- 59) Lynch, J., Fishbein, M., & Echavarria, M: Adenovirus. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 32(04): 494–511,2011
- 60) Boyne, J. R., & Whitehouse, A : γ -2 herpes virus post-transcriptional gene regulation. *Clinical Microbiology and Infection* 12(2) : 110–117, 2006
- 61) Rodríguez-Gallego, C., Corell, A., Pacheco, A., Timón, M., Regueiro, J., Allende, L. M., ... Arnaiz-Villena, A: Herpes virus saimiri transformation of T cells in CD3 γ immunodeficiency: phenotypic and functional characterization. *Journal of Immunological Methods* 198(2): 177–186, 1996
- 62) Kelly, G. L. & Rickinson, A. B : Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2007**: 277–284, 2007
- 63) Bunge, M. *Causality: The Place of the Causal Principle in Modern Science*. Meridian Books Cleveland and New York, 1959
- 64) Zhao, T., Chen, W., Zhang, X., Yi, H., & Zhao, F: HIV-induced cancer—all paths leading to rome. *Microbial Pathogenesis* 103804,2019

- 65) Epstein, M. A., Henle, G., Achong, B. G. & Barr, Y. M: Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J. Exp. Med* **121**: 761–770 ,1965
- 66) Poiesz, B. J. et al : Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **77**: 7415–7419, 1980
- 67) Miyoshi, I. et al: Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* **294**: 770–771, 1981
- 68) Yoshida, M : Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis. *Oncogene* **24**: 5931–5937, 2005
- 69) Gallo, R. C: History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene* **24**: 5926–5930, 2005
- 70) Vahne, A: A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology* **6** : 40 ,2009
- 71) Hodak, E., & Amitay-Laish: Mycosis Fungoides: A great imitator. *Clinics in Dermatology*,2019
- 72) Blumberg, B. S., Alter, H. J. & Visnich, S : A “new” antigen in leukemia sera. *JAMA* **191**: 541–546, 1965
- 73) Prince, A. M., Fuji, H. & Gershon, R. K : Immunohistochemical studies on the etiology of anicteric hepatitis in Korea. *Am. J. Hyg* **79** : 365–381, 1964
- 74) . Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C. & Chien, C. S: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* **2**: 1129–1133 ,1981
- 75) zur Hausen, H: Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* **36**: 794,1976
- 76) Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. & zur Hausen,H.:A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **80**: 3812–3815, 1983
- 77) Boshart, M. et al :A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* **3** : 1151–1157, 1984

- 78) Choo, Q. L. et al: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244** :359–362 ,1989
- 79) Wakita, T. et al :Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Med* **11**: 791–796,2005
- 80) Chang, Y. et al: Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865–1869 ,1994
- 81) Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S : Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**: 1096–1100, 2008
- 82) Perz, J. F., Armstrong, G. L., Farrington, L. A., Hutin, Y. J. & Bell, B. P : The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatol* **45**: 529–538 ,2006
- 83) Purtilo, D. T., Cassel, C. K., Yang, J. P. & Harper, R : X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* **1**: 935–940 ,1975
- 84) Singavi, A. K., Harrington, A. M., & Fenske, T. S : Post-transplant Lymphoproliferative Disorders. *Cancer Treatment and Research*: 305–327,2015
- 85) Kaposi, M : Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin. *CA Cancer J. Clin* :1982; **32** : 340–347 ,1872
- 86) McGeoch, D. J., Gatherer, D. & Dolan, A: On phylogenetic relationships among major lineages of the Gammaherpesvirinae. *J. Gen. Virol* **86**: 307–316,2005
- 87) Miller, G. et al: Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med* **334**: 1292–1297,1996
- 88) Gao, S. J. et al: Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *N. Engl. J. Med* **335**: 233–241, 1996
- 89) Simpson, G. R. et al: Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **348**: 1133–1138, 1996
- 90) Gao, S. J. et al: KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nature Med.* **2**: 925–928, 1996

- 91) Kedes, D. H. et al: The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med* **2**: 918–924 ,1996
- 92) Pellett, P. E. et al: Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors. *Transfusion* **43**: 1260–1268 ,2003
- 93) Engels, E. A. et al: Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980–2002. *AIDS* **20**: 1645–1654, 2006
- 94) Crawford LV and Crawford EM: Properties of Rous Sarcoma Virus Purified by Density Gradient Centrifugation. *Virology* **13**: 227-&, 1961.
- 95) Baltimore D: Viral Rna-Dependent DNA Polymerase - Rna-Dependent DNA Polymerase in Virions of Rna Tumour Viruses. *Nature* **226**: 1209-+, 1970.
- 96) Temin HM and Mizutani S: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**: 1211-1213, 1970.
- 97) Ali M and Baluda MA: Synthesis of avian oncornavirus DNA in infected chicken cells. *J Virol* **13**: 1005-1013, 1974.
- 98) Baluda MA: Widespread presence, in chickens, of DNA complementary to the RNA genome of avian leukosis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 576-580, 1972.
- 99) Hayward WS and Hanafusa H: Detection of avian tumor virus RNA in uninfected chicken embryo cells. *J Virol* **11**: 157-167, 1973.
- 100) Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM and Vogt PK: DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**: 170-173, 1976.
- 101) Baluda MA and Drohan WN: Distribution of deoxyribonucleic acid complementary to the ribonucleic acid of avian myeloblastosis virus in tissues of normal and tumor-bearing chickens. *J Virol* **10**: 1002-1009, 1972.
- 102) Hanafusa T, Hanafusa H and Miyamoto T: Recovery of a new virus from apparently normal chick cells by infection with avian tumor viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**: 1797-1803, 1970.
- 103) Perucho M, Goldfarb M, Shimizu K, Lama C, Fogh J and Wigler M: Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* **27**: 467-476, 1981.

- 104) Shih C, Padhy LC, Murray M and Weinberg RA: Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290: 261-264, 1981.
- 105) Shih C, Shilo BZ, Goldfarb MP, Dannenberg A and Weinberg RA: Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5714-5718, 1979.
- 106) Pott, P: The Chirurgical Works. In *Chirurgical Observations Relative to the Cataract, The Polypus of the Nose, The Cancer of the Scrotum, The Different Kinds of Ruptures, and The Mortification of the Toes and Feet* (Hawes, W. Clarke and R. Collins, Eds.) Vol. III: 60–68. Printed by T.J. Carnegy for L. Hawes, W. Clarke and R. Collin, London., 1775
- 107) Yamagiwa, K., and Ichikawa, K : Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *J. Cancer Res* 3: 1–29, 1918
- 108) Cook, J. W., Hewett, C. L., and Hieger, I: The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, and III. *J. Chem. Soc (Resumed)* 24: 395–405, 1933
- 109) Shih, C., Shilo, B. Z., Goldfarb, M. P., Dannenberg, A., & Weinberg, R. A : Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(11): 5714–5718, 1979
- 110) Bridges, B. A: Short term screening tests for carcinogens. *Nature* 261(5557): 195–200, 1976
- 111) Perucho, M., Goldfarb, M., Shimizu, K., Lama, C., Fogh, J., & Wigler, M : Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* 27(3): 467–476, 1981
- 112) Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C., & Weinberg, R. A : Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297(5866): 474–478, 1982
- 113) Pulciani, S., Santos, E., Lauver, A. V., Long, L. K., Robbins, K. C., & Barbacid, M. : Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79(9): 2845–2849, 1982
- 114) Santos, E., Tronick, S. R., Aaronson, S. A., Pulciani, S., & Barbacid, M: T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298(5872): 343–347, 1982

- 115) Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnick, E. M., ... Chang, E. H: Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300(5888): 143–149, 1982
- 116) Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E., & Barbacid, M : A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300(5888): 149–152, 1982
- 117) Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H., & Goeddel, D. V : Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 302(5903): 33–37, 1983
- 118) Balmain, A., & Pragnell, I. B :Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature* 303(5912): 72–74, 1983
- 119) Balmain, A., Ramsden, M., Bowden, G. T., & Smith, J : Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 307(5952): 658–660, 1984
- 120) Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M., & Balmain, A: Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322(6074): 78–80, 1986
- 121) Brown, K., Quintanilla, M., Ramsden, M., Kerr, I. B., Young, S., & Balmain, A. : v-ras genes from harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell* 46(3) : 447–456, 1986
- 122) Bremner, R., & Balmain, A: Genetic changes in skin tumor progression: Correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell* 61(3): 407–417, 1990
- 123) Zoumpourlis, V., Solakidi, S., Papatoma, A., & Papaevangelidou, D : Alterations in signal transduction pathways implicated in tumour progression during multistage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 24(7): 1159–1165, 2003
- 124) Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., ... Gorgoulis, V. G: Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444(7119): 633–637, 2006
- 125) Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G., & Bartek, J: An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* 319(5868): 1352–1355, 2008

- 126) Reddy EP, Reynolds RK, Santos E and Barbacid M: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300: 149-152, 1982.
- 127) Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg, RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR and Chang EH: Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300: 143-149, 1982.
- 128) Raju TN: The Nobel Chronicles. 1989: John Michael Bishop (b 1936) and Harold Eliot Varmus (b 1939). *Lancet* 355: 1106, 2000.
- 129) Temin HM: Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. *Cell* 21: 599-600, 1980.
- 130) Bishop, J. M: Retroviruses and oncogenes II. *Bioscience Reports* 10(6): 473–491, 1990
- 131) Perbal, B: Avian myeloblastosis virus (AMV): only one side of the coin. *Retrovirology* 5(1) : 49, 2008
- 132) Justice, J. F., Morgan, R. W., & Beemon, K. L : Common Viral Integration Sites Identified in Avian Leukosis Virus-Induced B-Cell Lymphomas. *mBio* 6(6), 2015
- 133) Zavala, G., Cheng, S., & Jackwood, M. W: Molecular Epidemiology of Avian Leukosis Virus Subgroup J and Evolutionary History of Its 3' Untranslated Region. *Avian Diseases* 51(4) : 942–953, 2007
- 134) Swanstrom, R., Graham, W. D., & Zhou, S: Sequencing the Biology of Entry: The Retroviral env Gene. *Viruses, Genes, and Cancer* :65–82, 2017
- 135) Tsuruyama, T., Hiratsuka, T., & Yamada, N: Hotspots of MLV integration in the hematopoietic tumor genome. *Oncogene* 36(9): 1169–1175, 2016
- 136) Suzuki, T., Shen, H., Akagi, K., Morse, H. C., Malley, J. D., Naiman, D. Q., ... Copeland, N. G : New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nature Genetics* 32(1): 166–174, 2002
- 137) Nakamura, T., Largaespada, D. A., Shaughnessy, J. D., Jenkins, N. A., & Copeland, N. G : Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nature Genetics* 12(2): 149–153, 1996
- 138) Goldgur, Y., Craigie, R., Cohen, G. H., Fujiwara, T., Yoshinaga, T., Fujishita, T., ... Davies, D. R: Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A

platform for antiviral drug design. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(23): 13040–13043, 1999

139) Tsuruyama, T., Nakamura, T., Jin, G., Ozeki, M., Yamada, Y., & Hiai, H : Constitutive activation of Stat5a by retrovirus integration in early pre-B lymphomas of SL/Kh strain mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(12): 8253–8258, 2002

140) Tsuruyama, T., Imai, Y., Takeuchi, H., Hiratsuka, T., Maruyama, Y., Kanaya, K., ... Hiai, H: Dual retrovirus integration tagging: identification of new signaling molecules Fiz1 and Hipk2 that are involved in the IL-7 signaling pathway in B lymphoblastic lymphomas. *Journal of Leukocyte Biology* 88(1): 107–116, 2010

141) Hiratsuka, T., Takei, Y., Ohmori, R., Imai, Y., Ozeki, M., Tamaki, K., ... Tsuruyama, T : ZFP521 contributes to pre-B-cell lymphomagenesis through modulation of the pre-B-cell receptor signaling pathway. *Oncogene* 35(25) : 3227–3238, 2015

142) Tsuruyama, T., Liu, W., & Yoshikawa, K :In Vitro Murine Leukemia Retroviral Integration and Structure Fluctuation of Target DNA. *PLoS ONE* 7(2): e31533, 2012

143) Katz RA, Gravuer K, Skalka AM : A preferred target DNA structure for retroviral integrase in vitro. *J Biol Chem* 273: 24190–24195, 1998

144) Narezkina, A., Taganov, K. D., Litwin, S., Stoyanova, R., Hayashi, J., Seeger, C., ... Katz, R. A: Genome-Wide Analyses of Avian Sarcoma Virus Integration Sites. *Journal of Virology* 78(21): 11656–11663, 2004

145) Cardiff, R. D., & Kenney, N : Mouse Mammary Tumor Biology: A Short History. *Advances in Cancer Research*: 53–116, 2007

146) Perzova, R., Abbott, L., Benz, P., Landas, S., Khan, S., Glaser, J., ... Poesz, B: Is MMTV associated with human breast cancer? Maybe, but probably not. *Virology Journal* 14(1), 2017

147) Callahan, R., & Smith, G. H : Common Integration Sites for MMTV in Viral Induced Mouse Mammary Tumors. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 13(3): 309–321, 2008

148) Niehrs, C: The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(12): 767–779, 2012

149) Cook, L., Melamed, A., Yaguchi, H., & Bangham, C. R : The impact of HTLV-1 on the cellular genome. *Current Opinion in Virology* 26: 125–131, 2017

- 150) Rizkallah, G., Mahieux, R., & Dutartre, H :Transmission intercellulaire de HTLV-1. *Médecine/sciences* 31(6-7): 629–637, 2015
- 151) Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., ... Golub, T. R. : MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(7043): 834–838, 2005
- 152) Bartel, D. P: MicroRNAs. *Cell* 116(2): 281–297, 2004
- 153) Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5): 843–854, 1993
- 154) Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G : Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin4* mediates temporal pattern formation in *C.elegans*. *Cell* 75 : 855-862 , 1993
- 155) Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al : The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403 :901–906 , 2000
- 156) Slack FJ, Basson M, Liu ZC, et al: The *lin-41* RBCC gene acts in the *C-elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor. *Mol Cell* 5:659–669, 2000
- 157) Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al : Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86–89, 2000
- 158) Griffiths-Jones S: The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32:D109–D111, 2004
- 159) Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, et al: miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36:D154–D158, 2008
- 160) Ha, M., & Kim, V. N : Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(8): 509–524, 2014
- 161) Vishnoi, A., & Rani, S: MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *MicroRNA Profiling*: 1–10, 2016
- 162) Jove R and Hanafusa H: Cell transformation by the viral *src* oncogene. *Annu Rev Cell Biol* 3: 31-56, 1987.
- 163) Frame MC: Newest findings on the oldest oncogene; how activated *src* does it. *J Cell Sci* 117: 989-998, 2004

- 164) Oneyama C and Okada M: MicroRNAs as the fine-tuners of Src oncogenic signalling. *J Biochem* 157: 431-438, 2015.
- 165) Ha M and Kim VN: Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 509-524, 2014.
- 166) Zhang B, Pan X, Cobb GP and Anderson TA: microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302: 1-12, 2007.
- 167) Calin GA and Croce CM: MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6: 857-866, 2006.
- 168) Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O and Sonenberg N: mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25: 6416-6422, 2006.
- 169) Wullschlegel S, Loewith R and Hall MN: TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484, 2006.
- 170) Engelman JA: Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9: 550-562, 2009.
- 171) Oneyama C, Ikeda J, Okuzaki D, Suzuki K, Kanou T, Shintani Y, Morii E, Okumura M, Aozasa K and Okada M: MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene* 30: 3489-3501, 2011.
- 172) Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, Peralta-Del Valle MH, Figueiredo BC, Zambetti GP and Lalli E: Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res* 70: 4666-4675, 2010.
- 173) Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Calin GA, Grazi GL, Pollutri D, Croce CM, Bolondi L and Gramantieri L: MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* 70: 5184-5193, 2010.
- 174) Hannigan G, Troussard AA and Dedhar S: Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* 5: 51-63, 2005.
- 175) Hannigan GE, Leung-Hageteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC and Dedhar S: Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379: 91-96, 1996.
- 176) McDonald PC, Fielding AB and Dedhar S: Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology. *J Cell Sci* 121: 3121-3132, 2008.

- 177) Oneyama C, Morii E, Okuzaki D, Takahashi Y, Ikeda J, Wakabayashi N, Akamatsu H, Tsujimoto M, Nishida T, Aozasa K, et al: MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase promotes Src-induced tumor progression. *Oncogene* 31: 1623-1635, 2012.
- 178) Donadelli M, Dando I, Fiorini C and Palmieri M: Regulation of miR-23b expression and its dual role on ROS production and tumour development. *Cancer Lett* 349: 107-113, 2014.
- 179) Navon R, Wang H, Steinfeld I, Tsalenko A, Ben-Dor A and Yakhini Z: Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types. *PLoS One* 4: e8003, 2009.
- 180) Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E and Reva B, et al: Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18: 11-22, 2010.
- 181) Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y and Sakai R: Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* 24: 4754-4764, 2005.
- 182) Shi J, Wang S, Zhao E, Shi L, Xu X and Fang M: Paxillin expression levels are correlated with clinical stage and metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med* 39: 548-551, 2010.
- 183) Burridge, K., Turner, C.E., and Romer, L.H: Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell. Biol* 119, 1992
- 184) Schaller, M.D : Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20, 2001
- 185) Majid S, Dar AA, Saini S, Arora S, Shahryari V, Zaman MS, Chang I, Yamamura S, Tanaka Y, Deng G, et al: miR-23b represses proto-oncogene Src kinase and functions as methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer. *Cancer Res* 72: 6435-6446, 2012.
- 186) Kokuda R, Watanabe R, Okuzaki D, Akamatsu H and Oneyama C: MicroRNA-137-mediated Src oncogenic signaling promotes cancer progression. *Genes Cells* 2018.
- 187) Okuzaki D, Yamauchi T, Mitani F, Miyata M, Ninomiya Y, Watanabe R, Akamatsu H and Oneyama C: c-Src promotes tumor progression through downregulation of microRNA-129-1-3p. *Cancer Sci* 111: 418-428, 2020.

- 188) Kennedy S, Clynes M, Doolan P, Mehta JP, Rani S, Crown J and O'Driscoll L: SNIP/p140Cap mRNA expression is an unfavourable prognostic factor in breast cancer and is not expressed in normal breast tissue. *Br J Cancer* 98: 1641-1645, 2008.
- 189) Yu Z, Ye S, Hu G, Lv M, Tu Z, Zhou K and Li Q: The RAF-MEK-ERK pathway: targeting ERK to overcome obstacles to effective cancer therapy. *Future Med Chem* 7: 269-289, 2015.
- 190) Zhou P, Xiong T, Yao L and Yuan J: MicroRNA-665 promotes the proliferation of ovarian cancer cells by targeting SRCIN1. *Exp Ther Med* 19: 1112-1120, 2020.
- 191) Cao M, Hou D, Liang H, et al: miR-150 promotes the proliferation and migration of lung cancer cells by targeting SRC kinase signalling inhibitor 1. *Eur J Cancer* 50: 1013-1024, 2014.
- 192) Zhao X, Xu Y, Sun X, Ma Y, Zhang Y, Wang Y, Guan H, Jia Z, Li Y and Wang Y: miR-17-5p promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in human osteosarcoma cells by targeting SRC kinase signaling inhibitor 1. *J Cell Biochem* 120: 5495-5504, 2019.
- 193) Yang F, Luo LJ, Zhang L, Wang DD, Yang SJ, Ding L, Li J, Chen D, Ma R, Wu JZ, et al: MiR-346 promotes the biological function of breast cancer cells by targeting SRCIN1 and reduces chemosensitivity to docetaxel. *Gene* 600: 21-28, 2017.
- 194) Xu X, Wang W, Su N, Zhu X, Yao J, Gao W, Hu Z and Sun Y: miR-374a promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting SRCIN1 in gastric cancer. *FEBS Lett* 589: 407-413, 2015.
- 195) Ma L, Shao Z and Zhao Y: MicroRNA-374a promotes pancreatic cancer cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition by targeting SRCIN1. *Pathol Res Pract* 215: 152382, 2019.
- 196) Yuan XL, Wen FQ, Chen XW, Jiang XP and Liu SX: miR-373 promotes neuroblastoma cell proliferation, migration, and invasion by targeting SRCIN1. *Onco Targets Ther* 12: 4927-4936, 2019.
- 197) Esquela-Kerscher A and Slack FJ: Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259-269, 2006.
- 198) Lin PY, Yu SL and Yang PC: MicroRNA in lung cancer. *Br J Cancer* 103: 1144-1148, 2010.
- 199) Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P : Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466(7308): 835–840, 2010

- 200) Pal MK, Jaiswar SP, Dwivedi VN, Tripathi AK, Dwivedi A and Sankhwar P: MicroRNA: a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Biol Med* 12: 328-341, 2015.
- 201) Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA and Nakagawa H: Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 351: 69-72, 1991.
- 202) Nada S, Yagi T, Takeda H, Tokunaga T, Nakagawa H, Ikawa Y, Okada M and Aizawa S: Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell* 73: 1125-1135, 1993.
- 203) Mitra SK and Schlaepfer DD: Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 18: 516-523, 2006.
- 204) Fincham VJ, Unlu M, Brunton VG, Pitts JD, Wyke JA and Frame MC: Translocation of Src kinase to the cell periphery is mediated by the actin cytoskeleton under the control of the Rho family of small G proteins. *J Cell Biol* 135: 1551-1564, 1996.
- 205) Harris KF, Shoji I, Cooper EM, Kumar S, Oda H and Howley PM: Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13738-13743, 1999.
- 206) Reinecke J and Caplan S: Endocytosis and the Src family of non-receptor tyrosine kinases. *Biomol Concepts* 5: 143-155, 2014.
- 207) Tu C, Ortega-Cava CF, Winograd P, Stanton MJ, Reddi AL, Dodge I, Arya R, Dimri M, Clubb RJ, Naramura M, et al: Endosomal-sorting complexes required for transport (ESCRT) pathway-dependent endosomal traffic regulates the localization of active Src at focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16107-16112, 2010.
- 208) Tanaka K, Ito Y, Kajiwara K, Nada S and Okada M: Ubiquitination of Src promotes its secretion via small extracellular vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 2020.
- 209) Ji H, Greening DW, Barnes TW, Lim JW, Tauro BJ, Rai A, Xu R, Adda C, Mathivanan S, Zhao W, et al: Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics* 13: 1672-1686, 2013.
- 210) DeRita RM, Zerlanko B, Singh A, Lu H, Iozzo RV, Benovic JL and Languino LR: c-Src, Insulin-Like Growth Factor I Receptor, G-Protein-Coupled Receptor Kinases and Focal Adhesion Kinase are Enriched Into Prostate Cancer Cell Exosomes. *J Cell Biochem* 118: 66-73, 2017.

211) Imjeti NS, Menck K, Egea-Jimenez AL, Lecointre C, Lembo F, Bouguenina H, Badache A, Ghossoub R, David G, Roche S, et al: Syntenin mediates SRC function in exosomal cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 12495-12500, 2017.

212) Hikita T, Kuwahara A, Watanabe R, Miyata M and Oneyama C: Src in endosomal membranes promotes exosome secretion and tumor progression. *Sci Rep* 9: 3265, 2019.

213) Roskoski R, Jr.: Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 94: 9-25, 2015.

214) Daud AI, Krishnamurthi SS, Saleh MN, Gitlitz BJ, Borad MJ, Gold PJ, Chiorean EG, Springett GM, Abbas R, Agarwal S, et al: Phase I study of bosutinib, a src/abl tyrosine kinase inhibitor, administered to patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 18: 1092-1100, 2012.

215) Moy B, Neven P, Lebrun F, Bellet M, Xu B, Sarosiek T, Chow L, Goss P, Zacharchuk C, Leip E, et al: Bosutinib in combination with the aromatase inhibitor letrozole: a phase II trial in postmenopausal women evaluating first-line endocrine therapy in locally advanced or metastatic hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer. *Oncologist* 19: 348-349, 2014.

216) Taylor JW, Dietrich J, Gerstner ER, Norden AD, Rinne ML, Cahill DP, Stemmer-Rachamimov A, Wen PY, Betensky RA, Giorgio DH, et al: Phase 2 study of bosutinib, a Src inhibitor, in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 121: 557-563, 2015.

217) Araujo J and Logothetis C: Dasatinib: a potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Rev* 36: 492-500, 2010.

218) Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, Nicolini FE, Apperley JF, Khoury HJ, Talpaz M, et al: A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 369: 1783-1796, 2013.

219) Ahn JS, Lee KH, Sun JM, Park K, Kang ES, Cho EK, Lee DH, Kim SW, Lee GW, Kang JH, et al: A randomized, phase II study of vandetanib maintenance for advanced or metastatic non-small-cell lung cancer following first-line platinum-doublet chemotherapy. *Lung Cancer* 82: 455-460, 2013.

220) Gridelli C, Novello S, Zilembo N, Luciani A, Favaretto AG, De Marinis F, Genestreti G, Crino L, Grossi F, Caffo O, et al: Phase II randomized study of vandetanib plus gemcitabine or gemcitabine plus placebo as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer in elderly patients. *J Thorac Oncol* 9: 733-737, 2014.

221) Sim MW and Cohen MS: The discovery and development of vandetanib for the treatment of thyroid cancer. *Expert Opin Drug Discov* 9: 105-114, 2014.

222) Gucaip A, Sparano JA, Caravelli J, Santamauro J, Patil S, Abbruzzi A, Pellegrino C, Bromberg J, Dang C, Theodoulou M, et al: Phase II trial of saracatinib (AZD0530), an oral SRC-inhibitor for the treatment of patients with hormone receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 11: 306-311, 2011.

223) Laurie SA, Goss GD, Shepherd FA, Reaume MN, Nicholas G, Philip L, Wang L, Schwock J, Hirsh V, Oza A, et al: A phase II trial of saracatinib, an inhibitor of src kinases, in previously-treated advanced non-small-cell lung cancer: the princess margaret hospital phase II consortium. *Clin Lung Cancer* 15: 52-57, 2014.

224) Molina JR, Foster NR, Reungwetwattana T, Nelson GD, Grainger AV, Steen PD, Stella PJ, Marks R, Wright J and Adjei AA: A phase II trial of the Src-kinase inhibitor saracatinib after four cycles of chemotherapy for patients with extensive stage small cell lung cancer: NCCTG trial N-0621. *Lung Cancer* 85: 245-250, 2014.

225) ClinicalTrials.gov [Available from: clinicaltrials.gov].

226) Phase I Trial of Afatinib (BIBW 2992) and Dasatinib in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01999985>].

227) Dasatinib In Combination With Trastuzumab And Paclitaxel In First Line Treatment Of Her2-Positive MBC Patients [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01306942>].

228) Trial of Dasatinib Plus Ixabepilone in 2nd or 3rd Line Metastatic Breast Cancer [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00924352>].

229) Study of Dasatinib and Docetaxel in Metastatic Hormone Refractory Prostate Cancer [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00439270>].

230) Dasatinib and Erlotinib in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00826449>].

231) Study Evaluating Bosutinib-Exemestane Combination Vs Exemestane Alone in Post Menopausal Women With Breast Cancer [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00793546>].

232) Study Evaluating Bosutinib-Letrozole Combination Versus Letrozole Alone In Post Menopausal Women With Breast Cancer [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00880009>].

- 233) Study Of Bosutinib With Capecitabine In Solid Tumors And Locally Advanced Or Metastatic Breast Cancer [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00959946>].
- 234) A Multicenter Phase 3, Open-Label Study of Bosutinib Versus Imatinib in Adult Patients With Newly Diagnosed Chronic Phase Chronic Myelogenous Leukemia [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02130557>].
- 235) AZD0530 Phase II Study in Patients With Advanced Ovarian Cancer [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00610714>].
- 236) Saracatinib and Paclitaxel in Platinum-resistant Ovarian Cancer [Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01196741>].
- 237) Arcaroli, J.J. et al: Gene array and fluorescence in situ hybridization biomarkers of activity of saracatinib (AZD0530), a Src inhibitor, in a preclinical model of colorectal cancer. Clin. Cancer Res 16 : 4165–4177, 2010
- 238) Suwaki, N., Vanhecke, E., Atkins, K. M., Graf, M., Swabey, K., Huang, P., ... Thomas, G. V : A HIF-Regulated VHL-PTP1B-Src Signaling Axis Identifies a Therapeutic Target in Renal Cell Carcinoma. Science Translational Medicine 3(85) : 85ra47–85ra47, 2011
- 239) Okamoto, W. et al: Identification of c-Src as a potential therapeutic target for gastric cancer and of MET activation as a cause of resistance to c-Src inhibition. Mol. Cancer Ther 9: 1188–1197 , 2010
- 240) Ahn, J.H. and Lee, M: Suppression of autophagy sensitizes multidrug resistant cells towards Src tyrosine kinase specific inhibitor PP2. Cancer Lett 310 : 188–197, 2011
- 241) Chen, Y. et al : Combined Src and ER blockade impairs human breast cancer proliferation in vitro and in vivo. Breast Cancer Res. Treat 128: 69–78, 2011
- 242) Chen, Y. et al : Combined Src and aromatase inhibition impairs human breast cancer growth in vivo and bypass pathways are activated in AZD0530-resistant tumors. Clin. Cancer Res 15: 3396–3405, 2009
- 243) Hudis CA: Trastuzumab mechanism of action and use in clinical practice. N Engl J Med 357:39-51, 2007
- 244) Schneeweiss A, Chia S, Hegg R, Tausch C, Deb R, Ratnayake J, et al: Evaluating the predictive value of biomarkers for efficacy outcomes in response to pertuzumab- and

trastuzumab-based therapy : an exploratory analysis of the TRYPHAENA study. *Breast Cancer Res*16: R73, 2014

245) Zhang S, Yu D :Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci* 33: 122-8, 2012

246) Peiró G, Ortiz-Martínez F, Gallardo A, Pérez-Balaguer A, Sánchez-Payá J, Ponce JJ, et al : Src, a potential target for overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast carcinoma. *Br J Cancer* 111: 689-95 , 2014

247) Muthuswamy SK: Trastuzumab resistance: all roads lead to SRC. *Nat Med* 17 :416-8, 2011

248) Han S, Meng Y, Tong Q, Li G, Zhang X, Chen Y, et al: The ErbB2-targeting antibody trastuzumab and the small-molecule SRC inhibitor saracatinib synergistically inhibit ErbB2-overexpressing gastric cancer. *Mabs* 6: 403-8, 2014

249) Alajati A, Guccini I, Pinton S, Garcia- Escudero R, Bernasocchi T, Sarti M, et al :Interaction of CDCP1 with HER2 enhances HER2-driven tumorigenesis and promotes trastuzumab resistance in breast cancer. *Cell Rep* 11: 564-76, 2015

250) Wang SE, Xiang B, Zent R, Quaranta V, Pozzi A, Arteaga CL : Transforming growth factor beta induces clustering of HER2 and integrins by activating Src-focal adhesion kinase and receptor association to cytoskeleton. *Cancer Res* 69: 475-82, 2009

251) De Luca A, D'Alessio A, Gallo M, Maiello MR, Bode AM, Normanno N: Src and CXCR4 are involved in the invasiveness of breast cancer cells with acquired resistance to lapatinib. *Cell Cycle* 13:148-56, 2014

252) Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al: Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440:692–696, 2006

253) Ibrahim T, Sacanna E, Gaudio M, et al : Role of RANK, RANKL, OPG, and CXCR4 tissue markers in predicting bone metastases in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 11:369–375, 2011

254) Cross SS, Harrison RF, Balasubramanian SP, et al : Expression of receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand (RANKL) and tumour necrosis factor related, apoptosis inducing ligand (TRAIL) in breast cancer, and their relations with osteoprotegerin, oestrogen receptor, and clinicopathological variables. *J Clin Pathol* 59: 716–720, 2006

- 255) Van Poznak C, Cross SS, Saggese M, et al: Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human breast tumours. *J Clin Pathol* 59:56–63, 2006
- 256) Mayer EL, Krop IE : Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. *Clin Cancer Res* 16:3526–3532, 2010
- 257) Wei S, Siegal GP: Mechanisms modulating inflammatory osteolysis: a review with insights into therapeutic targets. *Pathol Res Pract* 204:695–706, 2008
- 258) Santini D, Schiavon G, Vincenzi B, et al: Receptor activator of NF- kB (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One* 6:e19234, 2011
- 259) Scaltriti M, Baselga J : The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12:5268–5272, 2006
- 260) Tan M, Li P, Sun M, et al : Upregulation and activation of PKC alpha by ErbB2 through Src promotes breast cancer cell invasion that can be blocked by combined treatment with PKC alpha and Src inhibitors. *Oncogene* 25:3286–3295, 2006
- 261) Diaz N, Minton S, Cox C, et al: Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* 12:20–28, 2006
- 262) Finn RS, Dering J, Ginther C, et al: Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/“triple-negative” breast cancer cell lines growing in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 105:319–326, 2007
- 263) Li, R., Zhang, K., Penedo, T. L., Kragel, C. P., Grizzle, W. E., Hameed, O., ... Wei, S :The RANK Pathway in Advanced Breast Cancer. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 24(1): 42–50, 2016
- 264) Overgaard M, Jensen MB, Overgaard J, Hansen PS, Rose C, Andersson M, et al : Postoperative radiotherapy in high- risk postmenopausal breast-cancer patients given adjuvant tamoxifen: Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82c randomised trial. *Lancet* 353(9165):1641- 8, 1999
- 265) Miller ED, Fisher JL, Haglund KE, Grecula JC, Xu-Welliver M, Bertino EM, et al: The addition of chemotherapy to radiation therapy improves survival in elderly patients with stage III non–small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 13(3):426-35, 2018

- 266) Kang J, Ning MS, Feng H, Li H, Bahig H, Brooks ED, et al: Predicting 5-Year Progression and Survival Outcomes for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Stereotactic Ablative Radiotherapy: Development and Validation of Robust Prognostic Nomograms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2019.
- 267) Bhatia S, Sharma J, Bukkapatnam S, Oweida A, Lennon S, Phan A, et al: Inhibition of EphB4–Ephrin-B2 Signaling Enhances Response to Cetuximab–Radiation Therapy in Head and Neck Cancers. *Clin Cancer Res* 24(18):4539- 50, 2018
- 268) Oing C, Tennstedt P, Simon R, Volquardsen J, Borgmann K, Bokemeyer C, et al : BCL2-overexpressing prostate cancer cells rely on PARP1-dependent end-joining and are sensitive to combined PARP inhibitor and radiation therapy. *Cancer Lett* 423:60-70, 2018
- 269) Jamet E, Santoni V. Editorial for Special Issue: 2017 Plant Proteomics. *Proteomes* 6(3):E28, 2018
- 270) Yanovich G, Agmon H, Harel M, Sonnenblick A, Peretz T, Geiger T: Clinical proteomics of breast cancer reveals a novel layer of breast cancer classification. *Cancer Res* 78(20):6001-10, 2018
- 271) Shahrokh S, Mansouri V, Razzaghi M: Assessment of the SRC Inhibition Role in the Efficacy of Breast Cancer Radiotherapy. *J Lasers Med Sci*. 2019 Fall;10(Suppl 1):S18-S22, 2019
- 272) Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, Mezi S, Tomasello G, Ronzoni M, Zaniboni A, et al: FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: Updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol* 16: 1306-1315, 2015.
- 273) Maurel J and Postigo A: Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. From the preclinical setting to clinical practice. *Curr Cancer Drug Targets* 15: 703-715, 2015.
- 274) Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouché O, Mineur L, Barone C, et al: Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 381: 303-312, 2013.
- 275) Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schütz G, Thierauch KH and Zopf D: Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer* 129: 245-255, 2011.

- 276) Sartore-Bianchi A, Siena S, Tonini G, Bardelli A and Santini D: Overcoming dynamic molecular heterogeneity in metastatic colorectal cancer: Multikinase inhibition with regorafenib and the case of rechallenge with anti-EGFR. *Cancer Treat Rev* 51: 54-62, 2016.
- 277) . Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, Sartore-Bianchi A, Scala E, Cassingena A, Zecchin D, et al: Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov* 3: 658-673, 2013.
- 278) Mueller KL, Hunter LA, Ethier SP and Boemer JL: Met and c-Src cooperate to compensate for loss of epidermal growth factor receptor kinase activity in breast cancer cells. *Cancer Res* 68: 3314-3322, 2008.
- 279) Booth L, Roberts JL, Tavallai M, Webb T, Leon D, Chen J, McGuire WP, Poklepovic A and Dent P: The afatinib resistance of in vivo generated H1975 lung cancer cell clones is mediated by SRC/ERBB3/c-KIT/c-MET compensatory survival signaling. *Oncotarget* 7: 19620-19630, 2016.
- 280) Song N, Liu S, Zhang J, Liu J, Xu L, Liu Y and Qu X: Cetuximab-induced MET activation acts as a novel resistance mechanism in colon cancer cells. *Int J Mol Sci* 15: 5838-5851, 2014.
- 281) Song, N., Qu, X., Liu, S., Zhang, S., Liu, J., Qu, J., ... Che, X : Dual inhibition of MET and SRC kinase activity as a combined targeting strategy for colon cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine* 14(2): 1357–1366, 2017
- 282) Stabile LP, He G, Lui VW, Thomas S, Henry C, Gubish CT, Joyce S, Quesnelle KM, Siegfried JM and Grandis JR: c-Src activation mediates erlotinib resistance in head and neck cancer by stimulating c-Met. *Clin Cancer Res* 19: 380-392, 2013.
- 283) Zhang S, Huang WC, Li P, Guo H, Poh SB, Brady SW, Xiong Y, Tseng LM, Li SH, Ding Z, et al: Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* 17: 461-469, 2011.
- 284) Schneeweiss A, Chia S, Hegg R, Tausch C, Deb R, Ratnayake J, et al : Evaluating the predictive value of biomarkers for efficacy outcomes in response to pertuzumab- and trastuzumab-based therapy : an exploratory analysis of the TRYPHAENA study. *Breast Cancer Res* 16:R73, 2014
- 285) Gravalos C, Jimeno A: HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 19:1523-9, 2008
- 286) Merla A, Liu KG, Rajdev L: Targeted Therapy in Biliary Tract Cancers. *Curr Treat Options Oncol* 16:48, 2015

- 287) Jin, M. H., Nam, A.-R., Park, J. E., Bang, J.-H., Bang, Y.-J., & Oh, D.-Y : Resistance Mechanism against Trastuzumab in HER2-Positive Cancer Cells and Its Negation by Src Inhibition. *Molecular Cancer Therapeutics* 16(6): 1145–1154, 2017
- 288) Coleman RL, Monk BJ, Sood AK, Herzog TJ: Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 10(4):211-24, 2013
- 289) Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al: Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 365(26):2473-83, 2011
- 290) Cancer Genome Atlas Research Network : Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474(7353):609-15, 2011
- 291) Simpkins F, Hevia-Paez P, Sun J, Ullmer W, Gilbert CA, da Silva T, et al :Src Inhibition with Saracatinib Reverses Fulvestrant Resistance in ER-Positive Ovarian Cancer Models In Vitro and In Vivo. *Clin Cancer Res* 18(21):5911-23, 2012
- 292) Hew K, Miller PC, El-Ashry D., Sun J., Besser A., Ince T., et al : MAPK activation predicts poor outcome and the MEK inhibitor, selumetinib, reverses antiestrogen resistance in high grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 22(4):935-47, 2016
- 293) Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB: Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6):439-48, 2005
- 294) Simpkins, F., Jang, K., Yoon, H., Hew, K. E., Kim, M., Azzam, D. J., ... Slingerland, J. M :Dual Src and MEK Inhibition Decreases Ovarian Cancer Growth and Targets Tumor Initiating Stem-Like Cells. *Clinical Cancer Research*, 2018
- 295) Siegel RL, Miller KD, Jemal A : Cancer statistics, 2016. *Cancer J Clin* 66(1):7–30, 2016
- 296) Gao L, Zhao X, Lang L, Shay C, Yeudall WA, Teng Y: Autophagy blockade sensitizes human head and neck squamous cell carcinoma towards CYT997 through enhancing excessively high reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Mol Med* 96(9):929–38, 2018
- 297) Gao L, Lang L, Zhao X, Shay C, Shull AY, Teng Y : FGF19 amplification reveals an oncogenic dependency upon autocrine FGF19/FGFR4 signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 1:2394–404, 2019
- 298) Finn R: Targeting Src in breast cancer. *Ann Oncol* 19(8):1379–86, 2008
- 299) Irby RB, Yeatman TJ: Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19(49):5636–42, 2000

- 300) Egloff AM, Grandis JR: Targeting epidermal growth factor receptor and SRC pathways in head and neck cancer. In: *Seminars in oncology*: 2008: Elsevier : 286–97, 2008
- 301) Brooks HD, Glisson BS, Bekele BN, Ginsberg LE, El-Naggar A, Culotta KS, Takebe N, Wright J, Tran HT, Papadimitrakopoulou VA: Phase 2 study of dasatinib in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 117(10):2112–9, 2011
- 302) Puls LN, Eadens M, Messersmith W: Current status of SRC inhibitors in solid tumor malignancies. *Oncologist* 16(5):566–78, 2011
- 303) Lang, L., Shay, C., Zhao, X., Xiong, Y., Wang, X., & Teng, Y : Simultaneously inactivating Src and AKT by saracatinib/capivasertib co-delivery nanoparticles to improve the efficacy of anti-Src therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 2019

