



ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΩΓΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Ι. Κοτσιανίδης, Ε. Μπούχλιου, Π. Μιλτιάδη
Αιματολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή ΔΠΘ, Αλεξανδρούπολη

Εισαγωγή: Κυτταρική σηματοδότηση και καρκίνος

Η κυτταρική σηματοδότηση (cell signalling) αποτελεί βασικό μέρος του πολύπλοκου συστήματος επικοινωνίας, το οποίο ορίζει και συντονίζει βασικές κυτταρικές λειτουργίες και δραστηριότητες. Βάσει της σηματοδότησης τα κύτταρα αντιδρούν κατάλληλα στα ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος με αποτέλεσμα τη φυσιολογική ιστική ομοιοστάση, διαφοροποίηση, ιστική αναγέννηση και, τέλος, ανοσία¹. Διαταραχές στη μεταγωγή και επεξεργασία των εξωκυττάρων σημάτων είναι υπεύθυνες για πλειάδα νοσημάτων, μεταβολικών, αυτοάνοσων και τέλος κακοήθων. Η πλήρης κατανόηση των σηματοδοτικών οδών είναι λοιπόν καθοριστικής σημασίας για την αντιμετώπιση των παραπάνω νόσων. Ωστόσο, η διαδικασία μεταγωγής μοριακών εντολών είναι δαιδαλώδης με αποτέλεσμα να έχει γίνει πλέον αντιληπτό πως η επιμέρους μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών δεν επαρκεί, αλλά απαιτείται ολιστική θεώρηση των πολύπλοκων αυτών δικτύων πληροφοριών μέσω συνδυασμού πειραματικών και θεωρητικών προσεγγίσεων¹.

Ειδικότερα όσον αφορά τα λευχαιμικά στελεχιαία κύτταρα (leukemia stem cells, ΛΣΚ), η γνώση των σηματοδοτικών οδών είναι καιρία, καθώς στα ΛΣΚ θεωρείται πως αφενός μεν «γεννιέται» και αφετέρου δε «συντηρείται» η νεοπλασία. Προς πείσμα των δεδομένων που διαρκώς πληθαίνουν και καταδεικνύουν την ετερογένεια των λευχαιμικών υποπληθυσμών, οι σύγχρονες θεραπείες στρέφονται αδιάκριτα κατά όλων των κακοήθων κυττάρων, αποτυγχάνοντας συνήθως να εξολοθρεύσουν τα ΛΣΚ². Επιπλέον, η εξέλιξη των λευχαιμικών κλώνων κατά τη διάρκεια της νόσου μέσω συσσώρευσης νέων γενετικών βλαβών διευρύνει κι άλλο την ετερογένεια του νεοπλασματικού πληθυσμού. Ωστόσο, οι έως σήμερα τεχνικές ανίχνευσης και ταυτοποίησης των γενεσιουργών αιτιών και των καρκινικών κυττάρων είναι καθαρά περιγραφικές, περιλαμβάνοντας σειρά γενετικών ή πρωτεϊνικών δεικτών μέσω των οποίων είτε χαρακτηρίζεται η βλάβη, είτε απλά διακρίνεται η απόκλιση από το φυσιολογικό μοτίβο, όπως χαρακτηριστικά ισχύει για τον ανοσοφαινότυπο στις αιματολογικές κακοήθειες. Οι «βιοδείκτες» αυτοί όμως δεν είναι, κατά κανόνα, ικανοί να διακρίνουν τα πραγματικά ΛΣΚ, ούτε να προβλέψουν την απάντηση της κακοήθειας στη χημειοθεραπεία, καθώς ο τεράστιος αριθμός των κυτταρικών πρωτεϊνών και των τροποποιήσεών τους καθιστά εξαιρετικά δύσκολη, αν όχι απίθανη, την ανεύρεση αντιγόνων αποκλειστικά εντοπισμένων στα ΛΣΚ. Επιπρόσθετα, μελετώντας μόνο τον λευχαιμικό πληθυσμό ουσιαστικά αγνοούνται οι εξωγενείς παράγοντες, που όχι μόνο διαμορφώνουν το χαρακτήρα της νεοπλασίας, αλλά πιθανώς και συμβάλλουν στην αρχική διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής.

Η μελέτη της μοριακής σηματοδότησης στις κακοήθειες παρέχει τη μοναδική δυνατότητα της ταυτόχρονης μελέτης των εξωγενών παραγόντων (π.χ. μικροπεριβάλλον) με αυτά καθαυτά καρκινικά κύτταρα, αλλά και, το σημαντικότερο, τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση³. Η κύρια διαφορά των ΛΣΚ από τα υπόλοιπα λευχαιμικά κύτταρα είναι ο τρόπος επεξεργασίας των εξωκυττάρων σημάτων και η λήψη της τελικής απόφασης, με ίσως το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την απάντηση στη χημειοθεραπεία: ο σηματοδοτικός αλγόριθμος των ΛΣΚ δεν θα επιτρέψει την απόπτωση, σε αντίθεση με τον υπόλοιπο λευχαιμικό πληθυσμό. Έτσι, λοιπόν, υποβάλλοντας τα κακοήθη κύτταρα σε μία σειρά ερεθισμάτων και μετρώντας τη μεταβολή διαφόρων μεταγωγικών μορίων με κυτταρομετρία ροής, μπορεί κανείς να καταστρώσει ένα «χάρτη σηματοδότησης» διακρίνοντας ξεχωριστούς λευχαιμικούς υποπληθυσμούς βάσει του μεταγωγικού προφίλ τους. Ασφαλώς, η επιλογή τόσο των διεγερτών, όσο και των σηματοδοτικών μορίων θα πρέπει να βασίζεται στη βαθειά γνώση των διαδικασιών της λευχαιμογένεσης, ενώ η επεξεργασία του όγκου των δεδομένων απαιτεί τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής⁴.

Μελέτη της κυτταρικής σηματοδότησης με κυτταρομετρία ροής

Θεωρητική βάση

Η φωσφορυλίωση κυτταρικών στοιχείων, όπως π.χ. πρωτεϊνών και λιπιδίων, αντικατοπτρίζει σε ικανοποιητικό βαθμό την άμεση κατάσταση και δυναμική επεξεργασίας των μεταδιδόμενων σημάτων και μπορεί να αποτελέσει ένα μοναδικό σε χρησιμότητα δείκτη. Η φωσφορυλίωση συντελείται ταχέως, ελέγχει και ρυθμίζει σχεδόν όλες τις κυτταρικές λειτουργίες και είναι επαρκώς σταθερή και ξεχωριστή ως χημική οντότητα, έτσι ώστε να μπορούν να κατασκευασθούν αντισώματα που να αναγνωρίζουν φωσφορυλιωμένους επίτοπους σε πρωτεΐνες και λιπίδια⁵. Η βιβλιογραφία βρίθει μελετών χαρτογράφησης σηματοδοτικών δικτύων σε σειρά καρκίνων, μέσω της χρήσης αντισωμάτων έναντι φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών. Ωστόσο, η μελέτη της φωσφορυλίωσης και συνεπώς της σηματοδότησης στο μονήρες κυτταρικό επίπεδο, έγινε δυνατή μόνο με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, καθώς η ευρέως χρησιμοποιούμενη ανοσοαποτύπωση (Western blot) ουσιαστικά μετράει το μέσο όρο φωσφορυλίωσης σε ένα νεοπλασματικό πληθυσμό, αδυνατώντας να διακρίνει κυτταρικές υποομάδες

με διαφορές στη σηματοδότηση. Ακόμη, η ανοσοαποτύπωση είναι εργώδης μέθοδος, απαιτεί χρόνο και μεγάλο αριθμό κυττάρων, υποχρεώνοντας έτσι τον ερευνητή να μελετά λιγοστά μεταγωγικά μονοπάτια, ιδίως στα πρωτογενή δείγματα.

Μεθοδολογία

Η τεχνική της μέτρησης της φωσφορυλίωσης με κυτταρομετρία είναι απλή. Προηγείται διέγερση με τα επιλεγμένα ερεθίσματα, για ποικίλο χρονικό διάστημα (τυπικά 15' για κυτταροκινικά ερεθίσματα) και ακολουθεί «πάγωμα» των σηματοδοτικών διεργασιών με μονιμοποίηση με παραφορμαλδεϋδη ή παρόμοιες ουσίες χημικής διασύνδεσης (crosslinking). Όπως και στην ενδοκυττάρια χρώση, ακολουθεί η αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης με αλκοόλη ή απορρυπαντικά για να επιτευχθεί πρόσβαση των αντισωμάτων στους φωσφο-επιτόπους. Η όλη διαδικασία διαρκεί λιγότερο από 2 ώρες, σε ηχηρή αντίθεση με την χρονοβόρα ανοσοαποτύπωση.

Διερεύνηση του μεταγωγικού προφίλ σε αιματολογικές κακοήθειες

Έχει υποστηριχθεί πως τα ΛΣΚ παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις στη μεταγωγή σήματος συγκριτικά με τα φυσιολογικά στελεχιαία κύτταρα. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης τόσο σε ηρεμία, όσο και μετά από κυτταροκινική διέγερση παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ)⁶. Με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής μπορούν να ταυτοποιηθούν διάφορα μεταγωγικά προφίλ στο επίπεδο του μονήρους κυττάρου, τα οποία δύνανται να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί δείκτες ανθεκτικότητας της νόσου στη συμβατική χημειοθεραπεία⁶⁻⁸. Ειδικότερα, η μεταγωγή σήματος μέσω των μεταγραφικών παραγόντων STAT-3 και STAT-5 βρίσκεται σε συνεχή ενεργότητα^{9,10} και, επιπλέον, ο STAT-5 φαίνεται πως είναι απαραίτητος για την επιβίωση και έκπτυξη των ΛΣΚ^{11,12}. Ωστόσο, το βασικό επίπεδο φωσφορυλίωσης δε μπορεί να προβλέψει την απάντηση στη θεραπεία και την έκβαση της νόσου. Αντίθετα, η πλήρης χαρτογράφηση, με κυτταρομετρία, των μεταβολών διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, εμπλεκόμενων στη λευχαιμιόγνεση, πριν και μετά από κυτταροκινική διέγερση δίνει πληθώρα προγνωστικών, και όχι μόνο, πληροφοριών. Έτσι, το μεταγωγικό προφίλ των χημειοανθεκτικών, πτωχής πρόγνωσης ΟΜΛ χαρακτηρίζεται από υπεραντιδραστικότητα στην κυτταροκινική διέγερση με χαμηλό βασικό επίπεδο φωσφορυλίωσης και πτωχή απάντηση του STAT1 στην ιντερφερόνη-γ⁶. Εξίσου ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως η δυναμική αυτή χαρτογράφηση της σηματοδότησης μπόρεσε να διακρίνει υποπληθυσμούς λευχαιμικών βλαστών με διαφορετικά μεταγωγικά προφίλ, ακόμα και στον ίδιο ασθενή. Το εύρημα αυτό προσθέτει νέα δεδομένα στην παθοφυσιολογία των οξείων λευχαιμιών: φαίνεται πως πιθανές συνεχιζόμενες γενετικές ή/και επιγενετικές μεταβολές επιλέγουν υποκλώνους λευχαιμικών κυττάρων οι οποίοι τροποποιώντας τα σηματοδοτικά δίκτυα των ανευρίσκουν νέες οδούς διαφυγής από την ανοσιακή απάντηση ή/και την χημειοθεραπεία. Με άλλα λόγια η επιλεκτική πίεση που ασκείται από πληθώρα παραγόντων προς τα λευχαιμικά κύτταρα οδηγεί, ακολουθώντας τους απανταχού παρόντες νόμους της εξέλιξης, σε διαρκή μεταβολή του κλωνότυπου τους, η οποία δύνανται να ανιχνευθεί με τον κυτταρομετρικό προσδιορισμό του μεταγωγικού τους προφίλ. Οι προαναφερθείσες μελέτες περιορίστηκαν στη μελέτη δειγμάτων ασθενών πριν την έναρξη θεραπείας, χωρίς να επανεξετάσουν την επίδραση της θεραπείας στα σηματοδοτικά δίκτυα των λευχαιμικών κυττάρων. Είναι, λοιπόν, άκρως δελεαστικό να μελετήσει κανείς τις κλωνοτυπικές μεταβολές των ΛΣΚ μετά από θεραπευτικές παρεμβάσεις, προκειμένου να εντοπισθεί ένας ή περισσότεροι υποπληθυσμοί που θα παρουσιάζουν σταθερή αντοχή στη θεραπεία και θα επανεμφανίζονται μόνιμα μετά το πέρας κάθε κύκλου.

Προοπτικές

Η εισαγωγή εκατοντάδων «στοχευμένων» θεραπειών για τις νεοπλασίες, βασισμένων στη γνώση της παθοβιολογίας των τελευταίων, αποτελεί την τρέχουσα επανάσταση στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Επιγενετικοί παράγοντες, βιολογικοί τροποποιητές, μονοκλωνικά αντισώματα και αναστολείς βιολογικών λειτουργιών δίνουν νέες προοπτικές, όχι μόνο στο θεραπευτικό επίπεδο, αλλά και στην κατανόηση των πολύπλοκων μηχανισμών της καρκινογένεσης. Ειδικά όσον αφορά τις αιματολογικές κακοήθειες, η αναστολή ή τροποποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών συνέβαλε αποφασιστικά στη θεραπεία νοσημάτων ανιάτων με τη συμβατική χημειοθεραπεία, με πλέον χαρακτηριστική περίπτωση τη δραστηριότητα των αναστολέων τυροσινικών κινάσων στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Η μελέτη των μεταβολών του μεταγωγικού προφίλ των ΛΣΚ κατά τη διάρκεια χορήγησης των νέων θεραπευτικών παραγόντων θα συνεισφέρει σημαντικά τόσο στο ερευνητικό όσο και στο θεραπευτικό επίπεδο. Η έως τώρα κατανόηση της διαδικασίας της κακοήθους αιμοποίησης είναι ατελής. Η χαρτογράφηση και ομαδοποίηση των ξεχωριστών σηματοδοτικών προφίλ των λευχαιμικών κυττάρων, θα βοηθήσουν στη βιολογική ταξινόμηση των λευχαιμιών, μίας ιδιαίτερα ετερογενούς ομάδας νοσημάτων, και θα δώσει σημαντικές πληροφορίες στη διαδικασία της λευχαιμικής εξέλιξης και του μηχανισμού διαφυγής του κακοήθους κλώνου. Επιπλέον, θα διευκολυνθεί η διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης των νέων παραγόντων, καθώς για τους περισσότερους από αυτούς παραμένει ελάχιστα κατανοητός, παρά την αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητά τους. Τέλος, η κλινική μετάφραση του συσχετισμού των ξεχωριστών μεταγωγικών προφίλ με την πορεία της νόσου και την απάντηση στη χημειοθεραπεία θα συμβάλλει στην επαρκέστερη πρόγνωση των αιματολογικών κακοηθειών.



Βιβλιογραφία

1. Kiel C, Yus E, Serrano L. Engineering signal transduction pathways. *Cell*;140:33-47.
2. Misaghian N, Ligresti G, Steelman LS, et al. Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia*. 2009;23:25-42.
3. Wang E, Lenferink A, O'Connor-McCourt M. Cancer systems biology: exploring cancer-associated genes on cellular networks. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:1752-1762.
4. Nolan GP. Deeper insights into hematological oncology disorders via single-cell phospho-signaling analysis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:123-127, 509.
5. Hunter T, Eckhart W. The discovery of tyrosine phosphorylation: it's all in the buffer! *Cell*. 2004;116:535-39, 31 p following 548.
6. Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell*. 2004;118:217-228.
7. Kotecha N, Flores NJ, Irish JM, et al. Single-cell profiling identifies aberrant STAT5 activation in myeloid malignancies with specific clinical and biologic correlates. *Cancer Cell*. 2008;14:335-343.
8. Benekli M, Xia Z, Donohue KA, et al. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood*. 2002;99:252-257.
9. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*. 2003;101:2940-2954.
10. Birkenkamp KU, Geugien M, Lemmink HH, Kruijer W, Vellenga E. Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia*. 2001;15:1923-1931.
11. Kato Y, Iwama A, Tadokoro Y, et al. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J Exp Med*. 2005;202:169-179.
12. Schepers H, van Gosliga D, Wierenga AT, Eggen BJ, Schuringa JJ, Vellenga E. STAT5 is required for long-term maintenance of normal and leukemic human stem/progenitor cells. *Blood*. 2007;110:2880-2888.