

**Μοριακή απεικόνιση  
Απεικόνιση της γονιδιακής μεταφοράς  
με ραδιοϊσοτοπικές τεχνικές**

Στην παρούσα ανασκόπηση επιχειρείται μια σκιαγράφηση ενός από τους πλέον υποσχόμενους τομείς, όπου η Πυρηνική Ιατρική θα παίξει σημαντικό ρόλο, αν και αυτό τοποθετείται μετά το 2015. Η υψηλή ευαισθησία των ραδιοϊσοτοπικών μεθόδων, με επικεφαλής την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET), έχει ήδη καθιερωθεί σε μεγάλο αριθμό προκλινικών μελετών και αναμένεται εύκολα να εφαρμοστεί και σε ασθενείς, όσον αφορά στον τομέα της αξιολόγησης των διαφόρων πρωτοκόλλων γονιδιακής θεραπείας. Στην ανασκόπηση αυτή αναπτύσσονται τα χρησιμοποιούμενα ραδιοφάρμακα, καθώς και οι εφαρμοζόμενες μεθοδολογίες (άμεση και έμμεση απεικόνιση) για την επιβεβαίωση της μεταφοράς και της έκφρασης διαφόρων θεραπευτικών γονιδίων, με ιδιαίτερη έμφαση στις παραλλαγές της έμμεσης απεικόνισης. Από αυτές, πλέον σημαντική είναι η δισιστρονική προσέγγιση, καθώς και ο σχεδιασμός και η χρήση τεχνητών υποδοχέων. Στα πλαίσια αυτών των μεθόδων αναπτύσσεται η έννοια του γονιδίου-δείκτης (reporter ή marker gene) και γίνεται αναφορά στα πλέον γνωστά από αυτά τα γονίδια, όπως το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης του ερπητοϊού 1 (HSV1-TK) και το γονίδιο του μετασυναπτικού υποδοχέα 2 της ντοπαμίνης (D<sub>2</sub>R). Τέλος, αναπτύσσονται οι αρχές σχεδιασμού τεχνητών υποδοχέων και συζητούνται τα προτερήματά τους.

**1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Με τον όρο μοριακή απεικόνιση αναφερόμαστε στην ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση βιολογικών διαδικασιών ή οδών σε κυτταρικό ή υποκυτταρικό επίπεδο. Σε αντιδιαστολή με την κλασική απεικόνιση, με τη μοριακή απεικόνιση δίνεται η δυνατότητα να ανιχνευτούν σε πολύ πρώιμο στάδιο οι βλάβες, οι οποίες τελικά θα οδηγήσουν στην εκδήλωση κάποιου νοσήματος. Η Πυρηνική Ιατρική, με την εξαιρετική ευαισθησία των μεθόδων της, αποτελεί μια πρώτης τάξης μεθοδολογία για την απεικόνιση της κυτταρικής βιοχημείας *in vivo*. Μέχρι σήμερα, η διάγνωση των νοσημάτων στηρίζεται στη διαπίστωση διαταραχών στην ανατομία ή και τη φυσιολογία, οι οποίες όμως αποτελούν όψιμες εκδηλώσεις των πραγματικών διαταραχών σε μοριακό επίπεδο, οι οποίες είναι στην πραγματικότητα οι υπεύθυνες για το μακροσκοπικά παρατηρούμενο νόσημα. Εκτιμάται, λοιπόν, ότι η πρωιμότερη διαπίστωση των διαταραχών αυτών με τις μεθόδους της μοριακής απεικόνισης θα δώσει τη δυνατότητα πιο έγκαιρης και πιο αποτελεσματικής θεραπευτικής παρέ-

μβασης και θα επιτρέψει την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής παρέμβασής μας. Αν και ορισμένες μοριακές απεικονιστικές μέθοδοι έχουν ήδη ζωή δύο δεκαετιών (π.χ. απεικόνιση με επισημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα), τελευταία παρατηρείται μια όλο και περισσότερο επιταχυνόμενη μεταφορά και άλλων τεχνικών από το πειραματικό στάδιο στο στάδιο των κλινικών εφαρμογών.<sup>1,2</sup>

Οι τεχνικές της μοριακής απεικόνισης χρησιμοποιούν διάφορα επισημασμένα μόρια (probes, ανιχνευτές), τα οποία είτε εκπέμπουν τα ίδια ένα σήμα (π.χ. ακτινοβολία γ), είτε τροποποιούν ένα εκπεμπόμενο σήμα. Στις τεχνικές αυτές εντάσσονται, μεταξύ άλλων, ο μαγνητικός πυρηνικός συντονισμός (MRI), η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) και η υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονικής εκπομπής (SPECT), καθεμιά από τις οποίες χαρακτηρίζεται από τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της.

Οι ραδιοϊσοτοπικές τεχνικές (SPECT/planar, PET) υπερτερούν σε ευαισθησία, αν και υπολείπονται σε διακρι-

**A. Ζάγκλης**

Τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής, ΠΑΘΝΑ  
«Ο Άγιος Σάββας», Αθήνα

Molecular imaging – Imaging  
transgene expression with  
radioisotopic techniques

*Abstract at the end of the article*

**Λέξεις ευρετηρίου**

Άμεση απεικόνιση  
Γονιδιακή μεταφορά  
Δισιστρονική προσέγγιση  
Έμμεση απεικόνιση  
Μοριακή απεικόνιση  
Τεχνητοί υποδοχείς

*Υποβλήθηκε 10.11.2004  
Εγκρίθηκε 8.2.2005*

τική ικανότητα σε σχέση με τον MRI, και δίνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης πολύ μικρών συγκεντρώσεων επισημασμένων ενώσεων ( $10^{-10}$ – $10^{-12}$  M). Συγκριτικά αναφέρεται ότι οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις παραμαγνητικών σκιαγραφικών υλικών είναι της τάξης των 10–100  $\mu\text{mol/kg}$  στον MRI, ενώ για τα ιωδιωμένα σκιαγραφικά στην αξονική τομογραφία (CT) είναι της τάξης των 100–1000  $\mu\text{mol/kg}$ , προκειμένου να εξαχθούν διαγνωστικά συμπεράσματα. Είναι λοιπόν προφανές ότι για την ανίχνευση υποδοχέων, οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλές σταθερές συνδέσεις με τους αντίστοιχους επισημασμένους συνδέτες, αλλά είναι και χαμηλής χωρητικότητας συστήματα, οι ραδιοϊσοτοπικές τεχνικές αποτελούν τις μεθόδους εκλογής για την απεικόνιση των εν λόγω μοριακών στόχων.<sup>3</sup>

Σημειώνεται ότι οι συγκεντρώσεις των υποδοχέων *in vivo* είναι της τάξης των  $10^{-6}$ – $10^{-10}$  M ή  $10^{-9}$ – $10^{-13}$  mol/g ιστού, ενώ έχει υπολογιστεί ότι η ελάχιστη συγκέντρωση του παραμαγνητικού σκιαγραφικού, η οποία απαιτείται για να διαφοροποιηθεί κατά 50% το  $T_1$  σήμα (με μια κλασική ακολουθία διέγερσης –spin-echo pulse sequence– και σε μαγνητικό πεδίο έντασης 2 Tesla), είναι της τάξης των  $10^{-4}$  M ή  $10^{-7}$  mol/g ιστού. Είναι λοιπόν αυτονόητο ότι με αυτές τις συγκεντρώσεις σκιαγραφικού οι υποδοχείς είναι ήδη κεκορεσμένοι και γι' αυτό δεν είναι εφικτή η απεικόνιση υποδοχέων με MRI, χρησιμοποιώντας παράγωγα του *μονομερούς* [Gd (DTPA)]<sup>2-</sup> ως σκιαγραφικού. Πάντως, πρόσφατα έγινε εφικτό να απεικονιστούν υποδοχείς με MRI, χρησιμοποιώντας σιδηρομαγνητικά νανο-σωματίδια προσκολλημένα σε κατάλληλους φορείς (π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα), και αυτό γιατί κάθε νανο-σωματίδιο αποτελείται από εκατομμύρια παραμαγνητικά άτομα, με αποτέλεσμα την υψηλή τους συγκέντρωση στην εν λόγω περιοχή και την επακολουθούσα δραστική τροποποίηση των χρόνων επαναφοράς ( $T_1$ ,  $T_2$ ).<sup>4,5</sup>

Αν και ήδη έχει επιτευχθεί η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, οπότε είναι πλέον εφικτό να διαπιστωθεί κατά πόσο το υπό διερεύνηση άτομο έχει προδιάθεση να εμφανίσει κάποιο συγκεκριμένο νόσημα, πάντα θα υπάρχει η ανάγκη της χρησιμοποίησης επισημασμένων ανιχνευτών και μοριακών απεικονιστικών τεχνικών για την περαιτέρω αξιολόγηση των επιπτώσεων αυτών των γονιδιακών διαταραχών. Αυτό θα συμβαίνει για δύο λόγους: (α) εξαιτίας του φαινομένου του πλειοτροπισμού, τον οποίο μπορεί να εμφανίζει μια γενετική ανωμαλία, και (β) λόγω της γενετικής ετερογένειας που μπορεί να παρουσιάζει αυτή, δηλαδή λόγω του γεγονότος ότι μια νόσος μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλαπλών γενετικών ανωμαλιών διάφορης έκφρα-

σης. Ακόμα λοιπόν και αν η γενετική διαταραχή που οδηγεί στην εμφάνιση ενός νοσήματος είναι γνωστή, πάντα θα απαιτείται να αξιολογείται απεικονιστικά ο βιοχημικός φαινότυπος, είτε για τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων, είτε για την αξιολόγησή τους.

## 2. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Μια από τις περιοχές, για τις οποίες η μοριακή απεικόνιση είναι πολύτιμη, είναι και η δυνατότητα απεικόνισης της έκφρασης μεταφερθέντων γονιδίων σε πειράματα γονιδιακής μεταφοράς, όπου η εφαρμογή αυτή αποτελεί και το αντικείμενο της παρούσας ανασκόπησης. Η *in vivo* απεικόνιση της γονιδιακής έκφρασης απαντάται στη βιβλιογραφία με τον όρο *imagine* (*imaging genes*).<sup>6-9</sup>

Η συσσωρευμένη γνώση στους τομείς της γενετικής και της μοριακής βιολογίας στη μελέτη των διαφόρων νοσημάτων και ιδιαίτερα των νεοπλασιών, έδωσε ώθηση στην αναζήτηση και την εφαρμογή καινοφανών θεραπευτικών προσελάσεων. Ένας σημαντικός όμως περιοριστικός παράγοντας αυτών των θεραπευτικών μεθόδων είναι η μέχρι τώρα αδυναμία να επιτευχθεί ελεγχόμενη και αποτελεσματική εναπόθεση διαφόρων βιολογικά ενεργών μορίων, τόσο εντός των νεοπλασματικών κυττάρων, όσο και στην περιβάλλουσα μήτρα. Η γονιδιακή θεραπεία, όμως, δίνει τη δυνατότητα να ελεγχθούν τα επίπεδα, το χρονικό σημείο έναρξης και η διάρκεια της δράσης των βιοδραστικών μορίων, με τη χρήση ειδικών ενεργοποιητών και τροποποιητών της έκφρασης (*promoters*, *enhancers*, *activators*) του μεταφερόμενου γενετικού υλικού, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα για αποτελεσματικότερη και περισσότερο ελεγχόμενη θεραπευτική παρέμβαση. Τη στιγμή αυτή βρίσκονται σε εξέλιξη >300 πρωτόκολλα γονιδιακής θεραπείας σε όλο τον κόσμο (πίν. 1). Ένας σημαντικός αριθμός από αυτά ασχολείται με τη διαπίστωση της αποτελεσματικότητας και την ασφάλεια της μεταφοράς των διαφόρων γονιδίων, ενώ ένα άλλο τμήμα προσπαθεί να απαντήσει διάφορα ερωτήματα σχετικά με την κατανομή και τη διάρκεια της έκφρασης των γονιδίων των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων στον οργανισμό. Για μια περιεκτική ανασκόπηση των μεθόδων, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά γονιδιακού υλικού σε κύτταρα, ο αναγνώστης μπορεί να ανατρέξει στη βιβλιογραφία ή σε εξειδικευμένα βιβλία.<sup>10-12</sup>

Ένα μεγάλο τμήμα των πρωτοκόλλων αυτών χρησιμοποιεί ρετροϊούς, ως όχημα (*vehicle*) για τη μεταφορά του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης (TK) του ιού

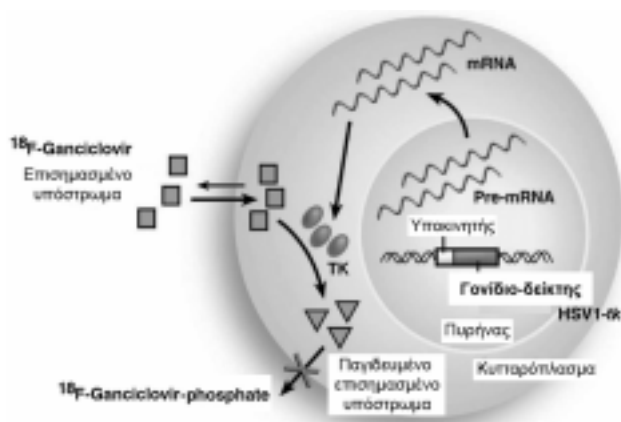
**Πίνακας 1.** Οι διάφορες κλινικές μελέτες γονδιακής θεραπείας και τα αντίστοιχα χρησιμοποιούμενα συστήματα μεταφοράς του θεραπευτικού γονιδίου. Παρατηρείται ότι τα συστήματα μεταφοράς γονδιακού υλικού διά των ιών αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία, αν και τα μη ιικά συστήματα κερδίζουν διαρκώς έδαφος.

Μεταφορέας (vector)	Ανοικτές κλινικές δοκιμές	Παραδείγματα νοσημάτων	
Ιός	Ρετροϊός (retrovirus)	157	Πολλά νεοπλάσματα, AIDS, ρευματοειδής αρθρίτιδα, σκλήρυνση κατά πλάκας, οστεοδυσπλασία, αιμορροφιλία
	Αδενοϊός (adenovirus)	132	Πολλά νεοπλάσματα, περιφερική αγγειοπάθεια, κυστική ίνωση, νόσος Canavan
	Ιός ευλογιάς (pox virus)	35	Πολλά νεοπλάσματα
	Αδενο-σχετιζόμενος ιός (adeno-associated virus)	7	Καρκίνος προστάτη, κυστική ίνωση, αιμορροφιλία B
Μη ιός	Χρήση λιποσωμάτων* (lipofection)	57	Πολλά νεοπλάσματα, κυστική ίνωση, στεφανιαία νόσος
	«Γυμνό» DNA (naked DNA)	47	Πολλά νεοπλάσματα, στεφανιαία νόσος, περιφερική αγγειοπάθεια, περιφερική νευροπάθεια
	Μεταφορά RNA (RNA transfer)	5	Πολλά νεοπλάσματα
	Γονδιακό όπλο (gene gun)	4	Μελάνωμα, σάρκωμα

\* Περιλαμβάνει λιποσώματα και διάφορα συσσωματώματα λιπιδίων, πολυμερών και άλλων μορίων  
 \*\* Μικρά σωματίδια χρυσού καλύπτονται με DNA και εξακοντίζονται με ειδική διάταξη εντός των κυττάρων

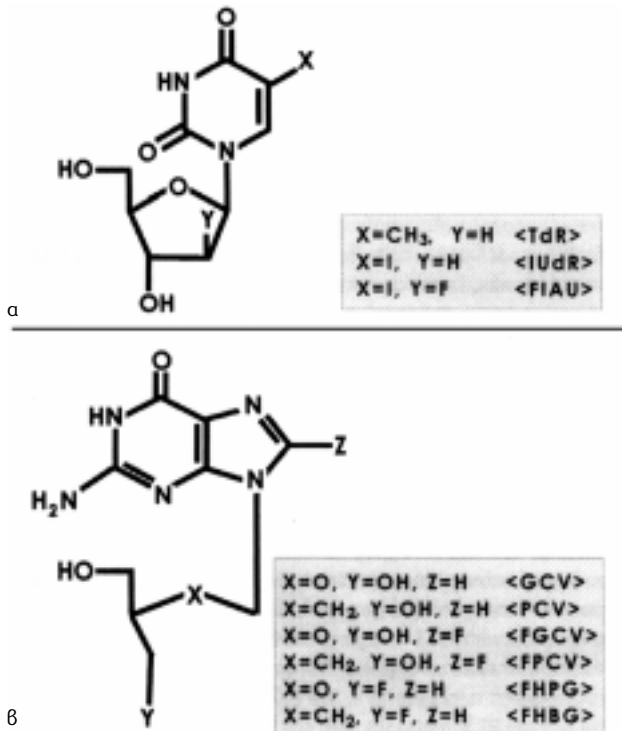
του έρπητα-1 (HSV1-*tk*) σε νεοπλασματικά κύτταρα, όπως φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 1. Σημειώνεται ότι με μικρά πλάγια γράμματα συμβολίζονται τα γονίδια και με κεφαλαία το προϊόν (πρωτεΐνη), το οποίο παράγουν. Η κινάση της θυμιδίνης του ερπητοϊού (TK), σε αντιδιαστολή με την κινάση της θυμιδίνης των θηλαστικών, δεν παρουσιάζει τόσο μεγάλη ειδικότητα υποστρώμα-

τος, με αποτέλεσμα να φωσφορυλιώνει σε ικανοποιητικό βαθμό και διάφορα παράγωγα της ακυκλογουανουσίνης (π.χ. acyclovir, ganciclovir κ.λπ.) ή ανάλογα της θυμιδίνης (π.χ. FAIU: 2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl-uracil). Τα παραπάνω υποστρώματα μπορούν να επισμανθούν με διάφορα ραδιοουκλίδια, όπως με F-18 ή I-124 για την απεικόνιση με PET και με I-123 ή I-131 για την απεικόνιση με SPECT (εικ. 2). Το παραγόμενο προϊόν παγιδεύεται μέσα στα κύτταρα μετά από τη φωσφορυλίωσή του, κατ' ανάλογο τρόπο, με τον οποίο παγιδεύεται και η φωσφορυλιωμένη <sup>18</sup>F-φθοριοδεσοξυγλυκόζη και έτσι είναι εφικτή η απεικόνιση της έκφρασης του HSV1-*tk* (δηλαδή του προϊόντος του, της πρωτεΐνης TK) στο συγκεκριμένο ιστό. Το γονίδιο HSV1-*tk* χρησιμεύει επιπλέον και ως γονίδιο αυτοκτονίας (suicide gene). Είναι, δηλαδή, ταυτόχρονα και θεραπευτικό γονίδιο, επειδή, αν χορηγηθούν στον ασθενή υψηλές δόσεις ψυχρού υποστρώματος (π.χ. acyclovir, ganciclovir κ.λπ.), αυτό φωσφορυλιώνεται *μόνο* στα κύτταρα τα οποία εκφράζουν το γονίδιο HSV1-*tk* και έτσι προκαλεί το θάνατό τους, παρεμποδίζοντας την παραγωγή DNA του κυττάρου (τόσο με αναστολή της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA, όσο και με αναστολή της DNA-πολυμεράσης).<sup>9,13-15</sup>



**Εικόνα 1.** Σχηματική παράσταση της απεικόνισης (άμεση μέθοδος) της μεταφοράς ενός γονιδίου σε ένα κύτταρο με την απεικονιστική μεθοδολογία PET (positron emission tomography). Το γονίδιο HSV1-*tk* μεταφέρεται (μαζί με τον υποκινητή του) με τη βοήθεια ενός οχήματος-φορέα (π.χ. αδενοϊού) και το προϊόν έκφρασής του (κινάση της θυμιδίνης, TK) φωσφορυλιώνει το χορηγούμενο επισημασμένο υπόστρωμα (<sup>18</sup>F-Ganciclovir), το οποίο στη συνέχεια παγιδεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου υπό τη μορφή <sup>18</sup>F-Ganciclovir-phosphate (ανιόν).

Πολύ σημαντικό ρόλο παίζει ο υποκινητής (promoter), ο οποίος συµμεταφέρεται και ελέγχει την έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος. Χρησιμοποιούνται ως υποκινητές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες από διάφορους ιούς,



**Εικόνα 2.** Οι δύο κατηγορίες επισημασμένων υποστρώματων, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη ραδιοϊσοτοπική απεικόνιση της μεταφοράς και της έκφρασης του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης (TK) του ερπητοϊού HSV. (α) Παράγωγα της θυμιδίνης (TdR), περιέχοντα σάκχαρο (δεσοξυριβόζη ή αραβινόζη). Οι αριθμοί με τόνο (π.χ. 2') χρησιμεύουν για την αρίθμηση των θέσεων υποκατάστασης του σακχάρου, ενώ οι αριθμοί χωρίς τόνο για την αρίθμηση των θέσεων υποκατάστασης της βάσης (π.χ. 5). Με X=I και Y=F λαμβάνεται η 2'-fluoro-2'-deoxy-1β-D-arabinofuranosyl-uracil (FIAU), η οποία μπορεί να επισημανθεί είτε με I (I-123, I-131 ή I-124) είτε με F (F-18). (β) Διάφορα ακυκλικά υποστρώματα της κινάσης της θυμιδίνης, περιέχοντα γουανίνη στη θέση της βάσης (η αρίθμηση γίνεται με αριθμούς χωρίς τόνους) και μια ακυκλική πλευρική αλυσίδα στη θέση του σακχάρου, περισσότερο (X=O) ή λιγότερο (X=CH<sub>2</sub>) υδρόφιλα. Η επισήμανση γίνεται είτε στη θέση 8 της βάσης με F-18 (<sup>18</sup>F<sub>2</sub>) είτε στην πλευρική αλυσίδα (<sup>18</sup>F<sup>-</sup>). GCV: Ganciclovir, PCV: Penciclovir, FGCV: Fluoro-ganciclovir, FPCV: Fluoro-penciclovir, FHBG: 9-[(3-[<sup>18</sup>F]fluoro-1-hydroxy-3-hydroxymethyl)butyl] guanine και FHFG: 9-[(4-[<sup>18</sup>F]fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl] guanine.

όπως από τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV) ή τον ιό SV-40 (simian virus 40). Οι υποκινητές συνήθως εκφράζουν τα γονίδια, τα οποία ελέγχουν ώστε να εκφράζονται συνεχώς (constitutive promoters), αλλά μπορεί να φέρουν και άλλες ρυθμιστικές περιοχές, προκειμένου να ρυθμίζεται εξωγενώς ο ρυθμός μεταγραφής του μηνύματος του γονιδίου που ελέγχουν (inducible promoters, επαγώγιμοι υποκινητές). Μια συγκεκριμένη κατηγορία ρυθμιστικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του ρυθμού της έκφρασης ενός γονιδίου (με αυξητική δράση) είναι οι

ενισχυτές (enhancers), οι οποίοι πάντως απαιτούν οπωσδήποτε την ύπαρξη υποκινητή για να δράσουν, χωρίς να μπορούν από μόνοι τους να προκαλέσουν την έκφραση ενός γονιδίου. Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα για την έκφραση των μεταφερόμενων γονιδίων είναι και ο χρόνος για τον οποίο διαρκεί αυτή η έκφραση, γεγονός πολύ σημαντικό για θεραπευτικές εφαρμογές. Αυτό έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται τόσο από την ανοσολογική κατάσταση του οργανισμού, όσο και από το είδος του μεταφορέα (vehicle).<sup>6,8,11,15-22</sup>

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι μια κλινικά εφαρμόσιμη και ελάχιστα παρεμβατική μέθοδος παρακολούθησης της επιτυχούς ή όχι μεταφοράς και έκφρασης ενός γονιδίου σε δεδομένο ιστό ή όργανο είναι επιβεβλημένη και αρκετά επιθυμητή, γιατί αλλιώς θα απαιτείτο η συνεχής λήψη βιοψιών, γεγονός από ενοχλητικό έως επικίνδυνο. Μια ελάχιστη επεμβατική μέθοδος, όπως είναι οι απεικονιστικές, θα διευκολύνει σημαντικά την παρακολούθηση και την αξιολόγηση των γονιδιακών θεραπειών σε ανθρώπους. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας θα αναπτυχθούν οι δύο στρατηγικές (άμεση και έμμεση απεικόνιση), για τις οποίες γίνεται μνεία σε παρακάτω κεφάλαια αυτής της ανασκόπησης και οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της γονιδιακής μεταφοράς.<sup>9,11,16</sup>

Όταν το προϊόν του γονιδίου είναι ένζυμο (άμεση ή έμμεση μέθοδος), υπάρχει το θεωρητικό πλεονέκτημα της ενίσχυσης του σήματος και συνεπώς μεγαλύτερη ευαισθησία, επειδή ένα μόριο ενζύμου δρα σε πολλά μόρια επισημασμένου υποστρώματος (probe), το οποίο και παγιδεύεται στο κύτταρο, με αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση του λόγου στόχου/υποστρώματος (target/background) και της ευαισθησίας της μεθόδου. Να σημειωθεί ότι σε αυτή την κατηγορία πάντα θα απαιτείται η ενδοκυτταρική μεταφορά του επισημασμένου υποστρώματος. Συνεπώς, ο βαθμός καθήλωσης του επισημασμένου υποστρώματος στο κύτταρο μπορεί να μεταβάλλεται ανεξάρτητα από το βαθμό έκφρασης του μεταφερθέντος γονιδίου, μια και μπορεί να υφίσταται ανταγωνισμό από άλλες ενώσεις ευρισκόμενες στον ορό και οι οποίες μπορούν να ανταγωνίζονται το επισημασμένο υπόστρωμα στη δίοδο του διά της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτός ο ανταγωνισμός απαιτεί και περαιτέρω παράταση του χρόνου μεταξύ χορήγησης του επισημασμένου υποστρώματος και απεικόνισης, προκειμένου να μειωθεί το υψηλό υπόστρωμα (background). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα όμως των ενζύμων ενδοκυτταρικής εντόπισης είναι η αδυναμία προσβολής τους από το ανοσοποιητικό σύστημα, εφόσον βέβαια παράγονται στο κύτταρο σε σχετικά μικρά ποσά.

Σε αντιδιαστολή, μια μέθοδος η οποία στηρίζεται στην έκφραση ενός υποδοχέα-δείκτη (πάντα έμμεση μέθοδος) βασίζεται στη στοιχειομετρική αλληλεπίδραση υποδοχέα-επισημασμένου συνδέτη, άρα έχει και μικρότερη ευαισθησία, αφού η ένταση του λαμβανόμενου σήματος εξαρτάται από τον αριθμό και την πυκνότητα των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας. Βέβαια, για τα συμπλέγματα υποδοχέων-συνδετών, τα οποία ενδοκυτταρώνονται και στη συνέχεια ακολουθούνται από ανακύκλωση του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη, αυτή η σχέση 1:1 δεν ισχύει, ενώ ισχύει για τα συμπλέγματα υποδοχέων-συνδετών, τα οποία, μετά από την ενδοκυττάρωσή τους, είτε καταλήγουν να αποικοδομηθούν στα λυσοσώματα, είτε οδεύουν σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα. Οι υποδοχείς υπερτερούν των ενζύμων, ως προϊόντα των γονιδίων-δεικτών (marker genes), επειδή, αφού δεν απαιτείται η ενδοκυτταρική μεταφορά του επισημασμένου συνδέτη, είναι δυνατόν να εξαχθούν ποσοτικά συμπεράσματα για το βαθμό της έκφρασης του μεταφερθέντος γονιδίου. Επιπρόσθετα, ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της χορήγησης του επισημασμένου συνδέτη και της απεικόνισης είναι κατά πολύ συντομότερος, απ' ό,τι αν απαιτείτο η ενδοκυτταρική μεταφορά του επισημασμένου συνδέτη. Ένα όμως σημαντικό μειονέκτημα των υποδοχέων ως δεικτών μεταφοράς γονιδίων είναι το γεγονός ότι η σύνδεση του επισημασμένου συνδέτη με τον εκφραζόμενο υποδοχέα ενεργοποιεί το σύστημα των δευτερογενών μεταβιαστών (π.χ. c-AMP, Ca<sup>2+</sup> κ.λπ.), με αποτέλεσμα τη διατάραξη της κυτταρικής δραστηριότητας, κάτι το οποίο δεν αποφεύγεται εντελώς και με τα ένζυμα ως δείκτες μεταφοράς γονιδίων. Στα πλαίσια της προσπάθειας αποφυγής αυτής της ενεργοποίησης του συστήματος των δευτερογενών μεταβιαστών χρησιμοποιούνται τροποποιημένα γονίδια, όπου λείπει το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα (truncated receptor), το οποίο είναι και υπεύθυνο για την ενεργοποίηση των δευτερογενών μεταβιαστών ή τη σύνθεση τεχνητών υποδοχέων που επίσης δεν ενεργοποιούν το σύστημα των δευτερογενών μεταβιαστών (βλ. κεφάλαιο 5).<sup>23</sup>

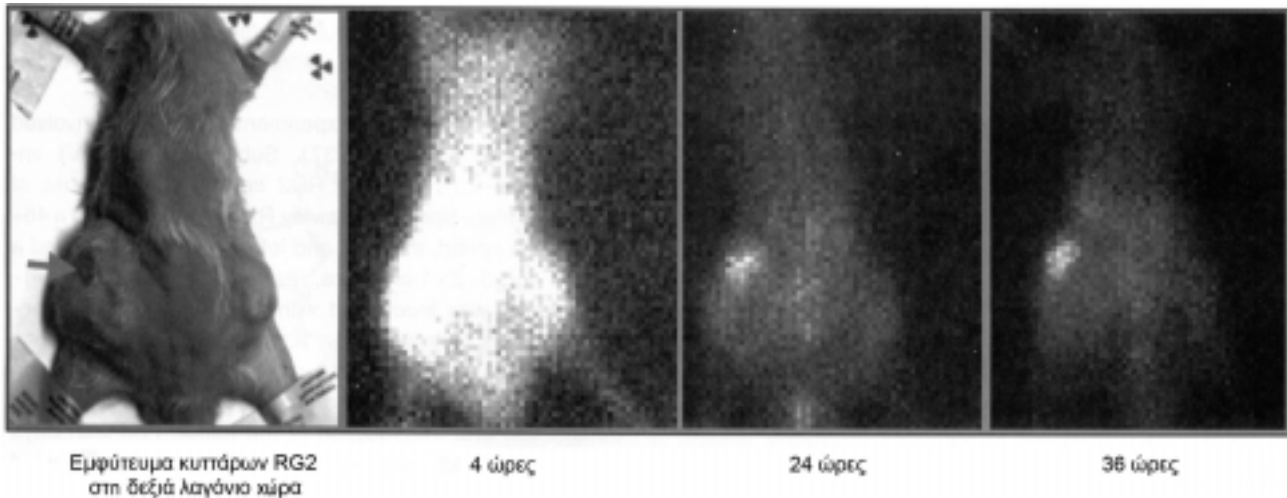
Όσον αφορά στη σύνθεση των ραδιοεπισημασμένων υποστρώματων (εικ. 2), σημειώνεται ότι προτιμάται η επισήμανση με F-18 της πλευρικής αλύσου (στη θέση 2'- του σακχάρου ή στην 3- ή 4- του ακυκλικού αναλόγου) των νουκλεοσιδίων, αντί της θέσης 8 των βάσεων τους, προκειμένου για παράγωγα της γουανίνης. Αυτό γίνεται, επειδή η σύνθεση των F-18-παραγώγων των νουκλεοσιδίων, με υποκατάσταση στο σακχαρικό ή ακυκλικό τμήμα τους, γίνεται με χρήση ανιόντος <sup>18</sup>F<sup>-</sup> (αντίδραση η οποία πραγματοποιείται με μηχανισμό πυρηνό-

φιλης υποκατάστασης), γεγονός το οποίο δίνει προϊόντα με υψηλή ειδική ραδιενέργεια (250–3000 Ci/mmol) και με υψηλή απόδοση, αντί του στοιχειακού <sup>18</sup>F<sub>2</sub>, το οποίο απαιτείται για να γίνει η υποκατάσταση στη θέση 8 της γουανίνης (αυτή πραγματοποιείται με μηχανισμό ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης). Τα παραγόμενα με χρήση ανιόντος <sup>18</sup>F<sup>-</sup> επισημασμένα υποστρώματα παράγονται σε ρακεμικά μίγματα (ίσα ποσά R και S στεροϊσομερούς) και δεν εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα, χωρίς επίσης η υποκατάσταση να επηρεάζει σημαντικά την ταχύτητα φωσφορυλίωσής τους από την TK. Αντίθετα, η 8-υποκατάσταση στο παράγωγο FPCV με <sup>18</sup>F<sub>2</sub> μειώνει περίπου κατά μία τάξη μεγέθους τη συγγένεια του ενζύμου TK προς αυτό, σε σχέση με το PCV.

Τα 2'-F-παραγωγα της θυμιδίνης (το σάκχαρο είναι είτε ριβόζη ή το 2' επιμερές της, δηλαδή η αραβινόζη) έχουν το σημαντικό πλεονέκτημα να σταθεροποιούνται, όσον αφορά στην υδρόλυση του N-γλυκοσιδικού δεσμού (συνδέει το σάκχαρο με την αντίστοιχη βάση) από τις φωσφορυλάσες των νουκλεοσιδίων, γεγονός που τους επιτρέπει να παραμένουν στην κυκλοφορία σε υψηλά επίπεδα αναλλοίωτα –χωρίς δηλαδή να υδρολύονται– ώστε να μεγιστοποιείται η καθήλωσή τους στο κύτταρο-στόχο και να αυξάνει η ευαισθησία της μεθόδου. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, όταν χρησιμοποιούνται τα επισημασμένα με I-131 παράγωγα της ουρακίλης (π.χ. FIAU), τα οποία μπορούν να απεικονιστούν και μετά από μερικά 24ωρα, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.<sup>9,13</sup>

### 3. ΑΜΕΣΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ

Η πρώτη μέθοδος είναι η άμεση απεικόνιση του μεταφερθέντος θεραπευτικού γονιδίου,<sup>8,9,11</sup> με τη χρησιμοποίηση ενός κατάλληλα επισημασμένου μορίου-ανιχνευτή (probe ή molecular probe), το οποίο καθιλώνεται με ειδικότητα και σε ποσοστό ανάλογο με το βαθμό έκφρασης του μεταφερθέντος γονιδίου στον ιστό ενδιαφέροντος. Για παράδειγμα, στην παρακολούθηση της μεταφοράς και έκφρασης του γονιδίου HSV1-*tk* χρησιμοποιούνται διάφορα επισημασμένα υποστρώματα (π.χ. με F-18 ή I-131) της TK, όπως αυτά που φαίνονται στην εικόνα 2. Επειδή όμως για τα περισσότερα θεραπευτικά γονίδια δεν μπορούν να συντεθούν κατάλληλα επισημασμένα probes, η άμεση απεικόνιση δεν είναι μια γενικεύσιμη μεθοδολογία και τείνει να εγκαταλειφθεί. Μια σχηματική παράσταση αυτής της μεθοδολογίας φαίνεται στην εικόνα 1. Ας σημειωθεί ότι το γονίδιο HSV1-*tk* μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως γονίδιο-δείκτης, με τη μέθοδο της έμμεσης απεικόνισης, η οποία



**Εικόνα 3.** Απεικόνιση με γ-κάμερα εμφυτεύματος νεοπλασματικών κυττάρων στη λαγόνιο χώρα ποντικού (σειρά κυττάρων RG2), στα οποία έχει μεταφερθεί το γονίδιο HSV1-*tk* με τη βοήθεια ρετροϊού (μόνο στα κύτταρα της δεξιάς πλευράς). Η αριστερή πλευρά φέρει εμφυτευμένα κύτταρα χωρίς το αντίστοιχο γονίδιο (control site). Το ραδιοφάρμακο που χορηγήθηκε είναι η 2'-fluoro-2'-deoxy-1β-D-arabinofuranosyl-uracil (FIAU), εισημασμένη στη θέση 5 της βάσης με I-131. Μετά από 24 και 36 ώρες καθίσταται σαφής η εκλεκτική καθήλωση του ραδιοφαρμάκου στην περιοχή του εμφυτεύματος, το οποίο περιέχει τα κύτταρα που εκφράζουν την κίνηση της θυμιδίνης του ερπητοϊού 1.

αναπτύσσεται παρακάτω. Για την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, δηλαδή τη μεγιστοποίηση της καθήλωσης του probe για δεδομένη ΤΚ στο κύτταρο, η έρευνα οδήγησε στην ανακάλυψη μεταλλαγμένων ερπητοϊών-1, των οποίων η ΤΚ παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα στη φωσφορυλίωση των εισημασμένων υποστρωμάτων  $^{18}\text{F}$ -ganciclovir και  $^{18}\text{F}$ -penciclovir (όχι όμως και των αναλόγων της θυμιδίνης). Το μεταλλαγμένο αυτό γονίδιο της ΤΚ απαντάται στη βιβλιογραφία με το συμβολισμό HSV1-*sr-39-tk*.

Ένα μειονέκτημα του συγκεκριμένου γονιδίου –είτε με τη μέθοδο της άμεσης είτε με τη μέθοδο της έμμεσης απεικόνισης– έγκειται στο γεγονός ότι σε όλα τα κύτταρα υπάρχει μεταφορέας νουκλεοσιδίων, με αποτέλεσμα να απαιτείται αρκετός χρόνος αναμονής για την ελάττωση της ακτινοβολίας του υποστρώματος (background), πριν διενεργηθεί η απεικόνιση.

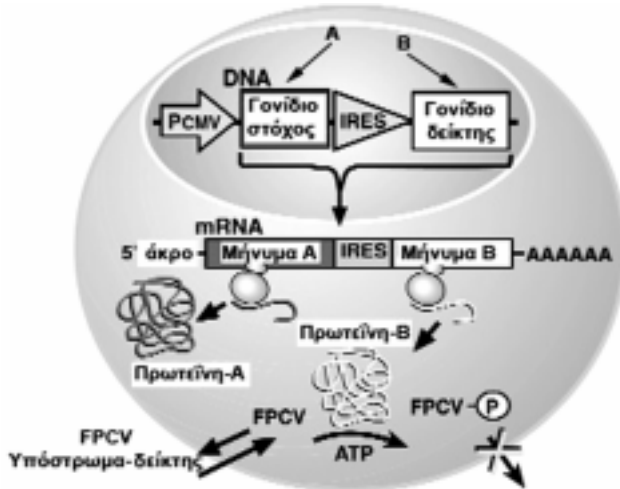
#### 4. ΕΜΜΕΣΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ

Η δεύτερη μέθοδος είναι η *έμμεση*,<sup>11</sup> κατά την οποία απεικονίζεται η παρουσία ενός συνοδευτικού (με το θεραπευτικό) γονιδίου, του ονομαζόμενου και reporter ή marker gene (γονίδιο-δείκτης) και το οποίο συνεκφράζεται με το θεραπευτικό γονίδιο στον ιστό ή τον κυτταρικό πληθυσμό ενδιαφέροντος. Ανιχνεύοντας την παρουσία και την έκφραση του γονιδίου-δείκτη, τεκμαίρεται έμμεσα η παρουσία και η έκφραση του θεραπευτικού

γονιδίου. Μια σχηματική παράσταση αυτής της μεθοδολογίας φαίνεται στην εικόνα 4. Για να εκφραστούν ταυτόχρονα και τα δύο γονίδια (θεραπευτικό και γονίδιο-δείκτης), έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές τεχνικές, στις κυριότερες από τις οποίες θα γίνει παρακάτω περιληπτική αναφορά.

Η έμμεση μεθοδολογία προϋποθέτει σταθερή και αναλογική συνέκφραση και των δύο γονιδίων και υπερτερεί της πρώτης μεθόδου, επειδή ένα και μόνο marker gene μπορεί να συνεκφραστεί με πληθώρα θεραπευτικών γονιδίων, χωρίς να απαιτείται η σύνθεση αντίστοιχου αριθμού probes (όταν αυτό είναι εφικτό), με ό,τι αυτό συνεπάγεται για το ραδιοχημικό τμήμα του εργαστηρίου Πυρηνικής Ιατρικής του μέλλοντος. Το ενδιαφέρον έχει στραφεί λοιπόν σε συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία χρησιμεύουν ως marker genes και μελετώνται ενδελεχώς.

Ένα τέτοιο γονίδιο-δείκτης είναι το γονίδιο του μετασυναπτικού υποδοχέα-2 της ντοπαμίνης ( $\text{D}_2\text{R}$ ), το οποίο εκφράζεται ως μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη (υποδοχέας), που απεικονίζεται με τη χορήγηση εισημασμένου με F-18 συνδέτη ( $\text{F-18-fluoroethylspiperone}$ ,  $^{18}\text{F-FESP}$ ), η δομή του οποίου φαίνεται στην εικόνα 5. Το συγκεκριμένο marker gene μελετάται από την ομάδα του UCLA (University of California at Los Angeles) και υπάρχει ήδη αρκετή εμπειρία για την απεικόνισή του (για τη νόσο Parkinson). Η χρησιμοποίηση του συγκεκριμένου marker gene δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν

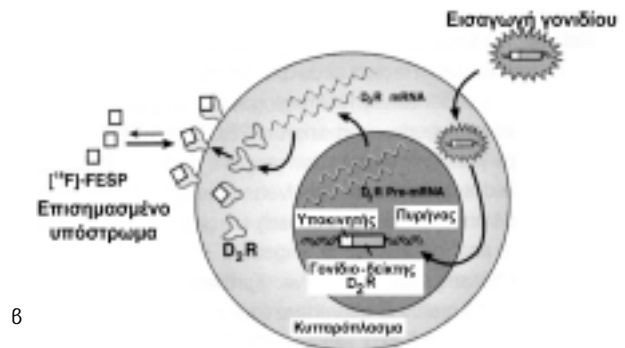
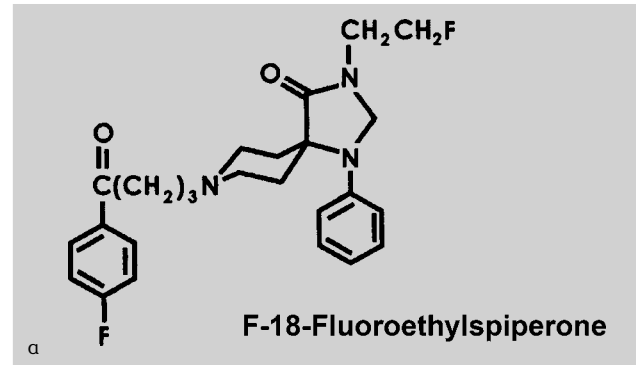


**Εικόνα 4.** Σχηματική παράσταση της αρχής της έμμεσης απεικόνισης. Τα δύο γονίδια (θεραπευτικό και γονίδιο-δείκτης) βρίσκονται υπό την καθοδήγηση κοινού υποκινητή (promoter), προερχόμενου από τον κυτταρομεγαλοϊό (pCMV). Τα δύο γονίδια χωρίζονται από την ακολουθία IRES και, συνεπώς, το παραγόμενο ενιαίο mRNA είναι διστρωτικό (βλ. κεφάλαιο 4.2). Το αποτέλεσμα είναι η ανεξάρτητη έκφραση των δύο γονιδίων και η παραγωγή κατά τη μετάφραση δύο ξεχωριστών πρωτεϊνών (θεραπευτική είναι η πρωτεΐνη Α). Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, ως γονίδιο-δείκτης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο (HSV1-*tk*) της κινάσης της θυμιδίνης (πρωτεΐνη Β) του ερπητοϊού 1 και ως επισημασμένο υπόστρωμα το  $^{18}\text{F}$ -Penciclovir, το οποίο, μετά από τη φωσφορυλίωσή του από την κινάση θυμιδίνης (TK), παγιδεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου.

σχετικά υδρόφιλα ραδιοφάρμακα (συνεπώς, να υπάρχει και γρήγορη μείωση του υποστρώματος), μια και αυτά δεν απαιτείται να διέλθουν από την κυτταρική μεμβράνη, σε αντιδιαστολή με τα επισημασμένα υποστρώματα της κινάσης της θυμιδίνης (βλ. παραπάνω), τα οποία πρέπει να διέλθουν από την κυτταρική μεμβράνη για να παγιδευτούν στο εσωτερικό του κυττάρου, γεγονός που καθιστά περισσότερο περίπλοκη και την κινητική μελέτη του συστήματος και επισφαλής την εξαγωγή ποσοτικών συμπερασμάτων. Να σημειωθεί ότι και το γονίδιο HSV1-*tk* μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως γονίδιο-δείκτης, με όλα τα μειονεκτήματα που έχει και τα οποία αναφέρθηκαν σε άλλο κεφάλαιο.<sup>23-25</sup>

Ένας άλλος υποδοχέας με αρκετή εμπειρία για την απεικόνισή του είναι και ο υποδοχέας-2 της σωματοστατίνης (SSTR<sub>2</sub>), ο οποίος απεικονίζεται με τη χρησιμοποίηση του In-111-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-Octreotide. Εισάγεται λοιπόν ως marker gene το γονίδιο του συγκεκριμένου υποδοχέα, οπότε είναι εφικτή η απεικόνισή του με κάμερα SPECT.

Στην εικόνα 6 φαίνεται ένα τέτοιο παράδειγμα απεικόνισης της έκφρασης του SSTR<sub>2</sub> σε πειραματόζωο (ποντικό). Το γονίδιο *sstr<sub>2</sub>* έχει μεταφερθεί με αδενοϊό (Ad-

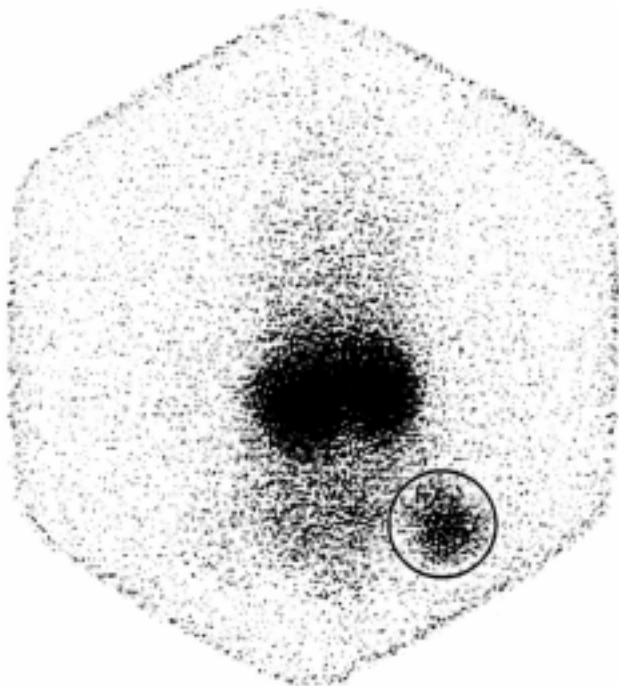


**Εικόνα 5.** (α) Η δομή της F-18-fluoroethylspiperone ή  $^{18}\text{F}$ -FESP (χημική ονομασία: 3-(2'-[ $^{18}\text{F}$ ]-Fluoroethyl)-8-[4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro-[4,5]decan-4-one), η οποία χρησιμοποιείται για την απεικόνιση των D<sub>2</sub> μετασυναπτικών ντοπαμινικών υποδοχέων. (β) Σχηματική παράσταση της απεικόνισης των D<sub>2</sub> μετασυναπτικών ντοπαμινικών υποδοχέων, οι οποίοι έχουν εκφραστεί από το αντίστοιχο γονίδιο που μεταφέρθηκε και εκφράστηκε στο συγκεκριμένο κύτταρο. Η δέσμευση της  $^{18}\text{F}$ -FESP γίνεται κυρίως από τους υποδοχείς που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη. Δεν σκιαγραφείται για λόγους απλούστευσης το θεραπευτικό γονίδιο, το οποίο συνεκφράζεται.

pCMV-*sstr<sub>2</sub>*) και ελέγχεται από τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV).<sup>24</sup>

Τέλος, εξαιρετικό ενδιαφέρον υπάρχει για τη χρήση του γονιδίου του συμμεταφορέα του ιωδίου (Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter ή rNIS<sup>3</sup>), το οποίο εκφράζεται φυσιολογικά στα θυλακιοκύτταρα του θυρεοειδούς, ως marker gene, μια και μπορεί αφενός να απεικονιστεί με χρήση  $^{131}\text{I}^-$  ή  $^{123}\text{I}^-$  και αφετέρου να χρησιμοποιηθεί και για θεραπεία, με χορήγηση μεγάλων δόσεων  $^{131}\text{I}^-$ . Η απεικόνιση γίνεται με την κλασική γ-κάμερα.<sup>26</sup>

Επομένως, για τη γονιδιακή απεικόνιση (είτε άμεση είτε έμμεση), τα παραγόμενα προϊόντα από τα μεταφερόμενα γονίδια εμπίπτουν σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες: Είτε είναι πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν ενδοκυτταρική εντόπιση και ενζυμική δραστηριότητα (π.χ. TK), είτε είναι πρωτεΐνες-υποδοχείς (π.χ. D<sub>2</sub>R, SSTR<sub>2</sub>) και εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια.



**Εικόνα 6.** Απεικόνιση με γ-κάμερα εμφυτεύματος σε ποντικό νεοπλασματικών κυττάρων (σειρά A-427), στα οποία έχει μεταφερθεί το γονίδιο *sstr<sub>2</sub>* με τη βοήθεια αδενοϊού (μόνο στα κύτταρα της αριστερής πλευράς, κύκλος). Η δεξιά πλευρά φέρει εμφυτευμένα κύτταρα χωρίς το αντίστοιχο γονίδιο (control site). Το ραδιοφάρμακο που χορηγήθηκε είναι το <sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-Octreotide. 4,5 ώρες μετά από τη χορήγηση του ραδιοφαρμάκου καθίσταται σαφής η εκλεκτική καθήλωσή του στην περιοχή του εμφυτεύματος, το οποίο περιέχει τα κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα SSTR<sub>2</sub>.

#### 4.1. Μέθοδος δημιουργίας ενιαίου γονιδίου (fusion gene approach)

Με αυτή τη μέθοδο,<sup>27</sup> συντίθεται ένα ενιαίο γονίδιο αποτελούμενο από τα γονίδια του θεραπευτικού και του γονιδίου-δείκτη τοποθετημένα σε σειρά, κάτω από τον έλεγχο κοινού υποκινητή (promoter). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται κατά τη μεταγραφή η σύνθεση ενός mRNA και συνεπώς και η παραγωγή κατά τη μετάφραση μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης, η οποία συνίσταται τόσο από τη θεραπευτική περιοχή όσο και από την περιοχή με τη δυνατότητα επίδρασης στο επισημασμένο υπόστρωμα (probe). Μια τέτοια μέθοδος, αν και η έκφραση των γονιδίων είναι απόλυτα συνεζευγμένη, δεν είναι γενική, αφού η παραγόμενη χιμαιρική πρωτεΐνη μπορεί να έχει απρόβλεπτη εντόπιση στο κύτταρο (κυτταρόπλασμα ή μεμβράνη), είτε να έχει σημαντικά τροποποιημένη δραστηριότητα (λόγω της διαμόρφωσης της χιμαιρικής πρωτεΐνης στο χώρο), η οποία ενδεχομένως να παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με τα αντίστοιχα υποστρώματα και φυσικά τη λειτουργία της, είτε ως θε-

ραпевτικής πρωτεΐνης ή και ως πρωτεΐνης η οποία δεσμεύει το επισημασμένο υπόστρωμα. Στο πάνω μέρος της εικόνας 7 φαίνεται η σύνθεση της χιμαιρικής πρωτεΐνης από το αντίστοιχο ενιαίο μόριο mRNA.

#### 4.2. Μέθοδος δημιουργίας δισιστρονικού mRNA (bicistronic approach)

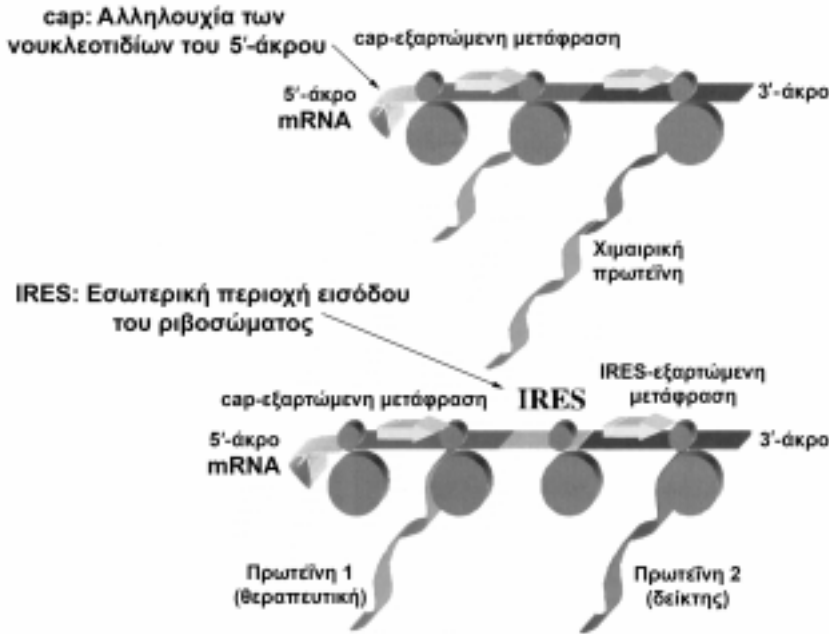
Σε αυτή τη μέθοδο,<sup>27</sup> η οποία και μελετάται συστηματικά σε διάφορα εργαστήρια, το μεταφερόμενο γονιδιακό υλικό στο κύτταρο-στόχο αποτελείται από δύο γονίδια, υπό κοινό υποκινητή (promoter), προερχόμενο από κάποιον ιό (CMV), μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται μια ακολουθία νουκλεοτιδίων αντιστοιχούσα σε μια εξειδικευμένη περιοχή στο mRNA που προκύπτει και η οποία είναι γνωστή ως IRES (internal ribosomal entry site, εσωτερική ριβοσωμική περιοχή εισόδου). Έτσι, μολονότι παράγεται ένα ενιαίο μόριο mRNA κατά τη μεταγραφή, εντούτοις η μετάφραση των δύο πρωτεϊνών γίνεται ανεξάρτητα αλλήλων: η πρώτη είναι cap-dependent (cap, κάλυμμα ή ειδική ακολουθία νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο του mRNA), ενώ η δεύτερη είναι IRES-dependent (δηλαδή cap-independent).

Σε αυτό το σημείο είναι επιβεβλημένη μια γρήγορη αναδρομή στο μηχανισμό της μεταγραφής και της μετάφρασης των γονιδίων, ώστε να γίνει κατανοητή η παραπάνω μέθοδος.<sup>28,29</sup> Όλα τα ευκαρυωτικά mRNA, όσο και τα mRNA αρκετών ιών, υφίστανται στο 5' άκρο τους, μετά από τη μεταγραφή και πριν διέλθουν διά της πυρηνικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα, μια χαρακτηριστική τροποποίηση και αποκτούν το λεγόμενο κάλυμμα (cap), η δομή του οποίου φαίνεται στην εικόνα 8.

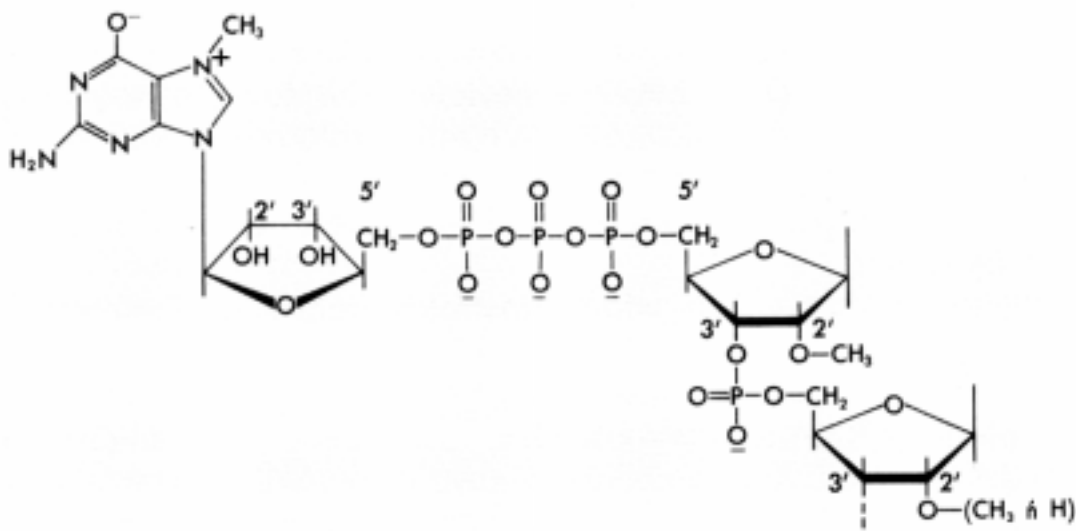
Το κάλυμμα χρησιμεύει για την αρχική πρόσδεση της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (ακολουθούμενη και από άλλους παράγοντες) και ως σημείο αναφοράς για την αναζήτηση του κωδονίου έναρξης της μετάφρασης (AUG). Η σύνθεση (μετάφραση) της πρωτεΐνης τελειώνει, όταν το ριβοσωμικό σύμπλεγμα «διαβάσει» μία από τις ακολουθίες περάτωσης (UAA, UGA, UAA). Όταν όμως, μετά από τη σύνθεση της πρώτης πρωτεΐνης, το ριβοσωμικό σύμπλεγμα διαπιστώσει την παρουσία μιας ειδικής αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (το αποκαλούμενο IRES), αμέσως μετά από την ακολουθία περάτωσης συνεχίζει με την ανεξάρτητη μετάφραση και της δεύτερης πρωτεΐνης και στη συνέχεια διασπάται.

Το IRES είναι μια ακολουθία 450–800 ζευγών βάσεων, με περίπλοκη δευτεροταγή δομή του αντίστοιχου τμήματος του RNA, η οποία χρησιμεύει σε συγκεκριμένους ιούς [(+)-stranded, όπως ο ιός της πολιομυελίτιδας





Εικόνα 7. Σχηματική παράσταση δύο διαφορετικών μεθόδων έμμεσης απεικόνισης. Πάνω: Μετάφραση μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης, η οποία περιέχει και τη θεραπευτική πρωτεΐνη και την πρωτεΐνη-δείκτη σε ένα ενιαίο μόριο (cap-dependent transcription), απότοκος της εν σειρά σύνδεσης των αντίστοιχων γονιδίων. Κάτω: Όταν τα δύο γονίδια συνδέονται με την παρεμβολή μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων, αντιστοιχώντας στο IRES διαφόρων (+)-stranded ιών (όπως π.χ. του ιού της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας), τότε αυτά μεταγράφονται σε κοινό μόριο mRNA, αλλά οι δύο πρωτεΐνες παράγονται ως ανεξάρτητα μόρια (bicistronic approach).



m<sup>7</sup>GpppNm(Nm)N AAAAAA...AAA<sub>OH</sub>

**Κάλυμμα-5' άκρο** **3' άκρο**

Εικόνα 8. Η δομή του mRNA πριν διέλθει στο κυτταρόπλασμα για την έναρξη της μετάφρασης. Έχει υποστεί δύο σημαντικές τροποποιήσεις, τόσο στο 3' (πολυαδενυλίωση), όσο και στο 5'-άκρο (δημιουργία του καλύμματος, cap). Η δομή του καλύμματος [m<sup>7</sup>GpppNm(Nm)N...] παρουσιάζει μερικές ενδιαφέρουσες ιδιαιτερότητες, όπως η μεθυλίωση στη θέση 7 της γουανίνης, η μεθυλίωση των 2'-υδροξυλίων της ριβόζης των δύο πρώτων νουκλεοτιδίων και η δημιουργία ενός τριφωσφορικού δεσμού 5'-5' μεταξύ της τροποποιημένης γουανίνης και του πρώτου νουκλεοτιδίου. Η δομή αυτή είναι απαραίτητη στα ευκαρυωτικά κύτταρα για την προσέλκυση της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος, πριν σχηματιστεί το απαραίτητο ριβοσωμακό σύμπλεγμα (με προσέλκυση και άλλων παραγόντων) για την έναρξη της μετάφρασης.

ή της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας (ECMV)], για τη μετάφραση του περιεχόμενου σε αυτούς μηνύματος, χωρίς να απαιτείται η παρουσία καλύμματος (cap).<sup>29</sup> Το IRES,

δηλαδή, είναι ένα εναλλακτικό σύστημα αναγνώρισης του mRNA από το ριβόσωμα για την έναρξη της μετάφρασης. Έτσι, ενώ είναι γνωστό ότι τα mRNA των ευκα-

ρυωτικών κυττάρων είναι μονοσιστρονικά (δηλαδή, από μια αλυσίδα mRNA παράγεται μια ενιαία πολυπεπτιδική αλυσίδα), με την εισαγωγή του IRES μεταξύ δύο γονιδίων, το παραγόμενο ενιαίο mRNA καθίσταται δισιστρονικό, οπότε εκφράζονται ανεξάρτητα αλληλών και το θεραπευτικό γονίδιο και το γονίδιο-δείκτης. Δηλαδή, το ένα γονίδιο μεταφράζεται με τη βοήθεια του καλύμματος (cap) και το άλλο με τη βοήθεια του IRES. Επισημαίνεται ότι η αντιστοιχία μεταξύ των λαμβανομένων πρωτεϊνών δεν είναι πάντα 1:1, αλλά συχνά το γονίδιο το οποίο τοποθετείται στην κασέτα του μεταφερόμενου γενετικού υλικού μετά από το IRES παρουσιάζει μειωμένο ρυθμό έκφρασης. Με τον όρο κασέτα (cassette) νοείται το σύνολο της γενετικής πληροφορίας (γονίδια και ρυθμιστικές περιοχές), το οποίο μεταφέρεται με κάποιο όχημα σε ένα κύτταρο. Μετά από το IRES συνήθως τοποθετείται το γονίδιο-δείκτης, έτσι ώστε το θεραπευτικό γονίδιο (τοποθετούμενο αμέσως μετά από τον υποκινητή) να εκφράζεται στο μέγιστο δυνατό βαθμό, προς επίτευξη του επιδιωκόμενου θεραπευτικού αποτελέσματος. Βέβαια, αυτό αυξάνει τις απαιτήσεις σε ευαισθησία της απεικονιστικής μεθόδου, επειδή μειωμένη έκφραση του γονιδίου-δείκτη συνεπάγεται μικρότερη καθήλωση του επισημασμένου υποστρώματος (probe) και αυτός ο τομέας βρίσκεται σε συνεχή μελέτη για τη βελτιστοποίησή του. Στο κάτω μέρος της εικόνας 7 φαίνεται σχηματικά η μετάφραση δύο ανεξάρτητων πρωτεϊνών, μιας cap-dependent και μιας IRES-dependent.

#### 4.3. Εισαγωγή διπλού υποκινητή (double promoter approach)

Τα δύο γονίδια (θεραπευτικό και γονίδιο-δείκτης) βρίσκονται υπό τον έλεγχο δύο διαφορετικών υποκινητών στην ίδια κασέτα, η οποία μεταφέρεται με το ίδιο vector (vector, το πλασμίδιο το οποίο χρησιμεύει για τη μεταφορά DNA από τον έναν οργανισμό στον άλλον) και παριστάνεται ως ακολούθως: pCMV-*d<sub>2</sub>r*-pCMV-*HSV1<sub>sr</sub>-39-tk*.<sup>27</sup> Με τη μεθοδολογία αυτή επιδιώκεται η αποφυγή των προβλημάτων της μεθόδου του δισιστρονικού mRNA, επειδή, όπως προαναφέρθηκε, η χρήση του IRES προκαλεί συχνά μειωμένη έκφραση του γονιδίου-δείκτη, το οποίο συνήθως ακολουθεί την αλληλουχία του IRES.

#### 4.4. Εισαγωγή μέσω διαφορετικών οχημάτων (covector administration approach)

Τα δύο γονίδια (θεραπευτικό και γονίδιο-δείκτης) μεταφέρονται με διαφορετικό όχημα (vehicle, π.χ. αδενοϊός) και προφανώς βρίσκονται σε διαφορετικούς

vectors, υπό ανεξαρτητως αλληλών δρώντες υποκινητές, οι οποίοι όμως μπορεί να προέρχονται από τον ίδιο ιό (π.χ. pCMV).<sup>27</sup> Η μέθοδος είναι επιρρεπής σε προβλήματα (trans-acting effects), πέραν του ότι δεν μπορεί κάποιος με βεβαιότητα να υποθέσει ότι, αφού διαπιστώθηκε η παρουσία και η έκφραση του γονιδίου-δείκτη, απαραίτητα θα πρέπει να έχει μεταφερθεί και να εκφράζεται και το θεραπευτικό γονίδιο.

#### 4.5. Μεταγραφή δύο κατευθύνσεων (bidirectional transcriptional approach)

Σε πολλές εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας είναι απαραίτητο όχι μόνο να μεταφερθεί το θεραπευτικό γονίδιο στο όργανο-στόχο, αλλά και να είναι δυνατή και η ρύθμιση του επιπέδου έκφρασής του. Ένας τρόπος ελέγχου είναι μέσω μιας εξωγενώς χορηγούμενης ουσίας (π.χ. του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνης), η οποία επιδρά στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου και προκαλεί την έναρξη της μεταγραφής του. Στη συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται μια χιμαιρική πρωτεΐνη και ένας φορέας (vector) δύο κατευθύνσεων (bidirectional), υπό κοινό επαγωγίμο υποκινητή. Με αυτή τη μέθοδο<sup>27</sup> επιτυγχάνεται μεταγραφή δύο κατευθύνσεων, παράγονται 2 ανεξάρτητα mRNA και 2 ξεχωριστές πρωτεΐνες (θεραπευτική και πρωτεΐνη-δείκτης), με επιπρόσθετη δυνατότητα ρύθμισης της μεταγραφής, με τη βοήθεια της εξωγενώς χορηγούμενης δοξυκυκλίνης. Ακόμη, αποφεύγονται τα γνωστά προβλήματα μείωσης της έκφρασης του γονιδίου-δείκτη, τα οποία απαντώνται στη δισιστρονική μέθοδο (όταν αυτό ακολουθεί το IRES), και θεωρείται ως η μέθοδος του μέλλοντος.<sup>30</sup>

### 5. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Μια ειδική περίπτωση της έμμεσης μεθόδου για την *in vivo* απεικόνιση της μεταφοράς των γονιδίων στηρίζεται στη δυνατότητα σχηματισμού τεχνητών υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια.<sup>31</sup> Οι υποδοχείς αυτοί επιλέγονται από εκείνους που υπάρχουν στο ενδοκυττάριο τμήμα του κυττάρου (όπως π.χ. η μεταλλοθειονεΐνη), αλλά επειδή σχεδιάζονται να περιέχουν επιπρόσθετα μια αλληλουχία υδρόφοβων αμινοξέων, που λαμβάνεται από οποιοδήποτε μεμβρανικό υποδοχέα (π.χ. αυτόν της γλυκοφορίνης των ερυθροκυττάρων), μέσω της οποίας αυτός αγκιστρώνεται στην κυτταρική μεμβράνη, κατά την πρωτεϊνοσύνθεση οδεύουν προς αυτή και δεν εντοπίζονται πλέον στο κυτταρόπλασμα. Οι ενδοκυττάριοι υποδοχείς επιλέγονται με βάση το κριτήριο της δυνατότητας σχηματισμού σταθερών συμπλόκων με ραδιομέταλλα. Συνοπτικά, η αρχή της μεθόδου φαίνεται στην εικόνα 9.

Η μεθοδολογία αυτή έχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων, επειδή:

- Η παρουσία της χιμαιρικής πρωτεΐνης στην κυτταρική επιφάνεια δεν απαιτεί τη δίοδο του ιχνηθετημένου υποστρώματος στο εσωτερικό του κυττάρου
- Το εισαγόμενο γονίδιο είναι μικρού μεγέθους (2 kb) και συνεπώς μπορεί να μεταφερθεί εντός του κυττάρου με οποιοδήποτε από τα γνωστά συστήματα μεταφοράς (viral vectors)
- Η καθήλωση του ραδιομετάλλου είναι ευθέως ανάλογη του ποσού της εκφραζόμενης στην κυτταρική επιφάνεια χιμαιρικής πρωτεΐνης
- Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες μπορούν να σχεδιαστούν, έτσι ώστε να μην είναι τοξικές στο κύτταρο
- Ως ραδιομέταλλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κυρίως το Tc-99m, το οποίο είναι φθινό, διαθέσιμο καθημερινά στο τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής και δεν απαιτεί εξειδικευμένα απεικονιστικά συστήματα.

Η συμπλοκοποίηση του Tc-99m (μάλλον υπό μορφή οξοτεχνητικού πυρήνα [ $^{99m}\text{Tc}=\text{O}$ ] $^{3+}$ ) από την αντίστοιχη περιοχή της χιμαιρικής πρωτεΐνης-υποδοχέα γίνεται μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση ενός προσχηματισμένου κινητικά ασταθούς συμπλόκου του τεχνητίου, όπως είναι το σύμπλοκο με το γλυκοεπτονικό ( $^{99m}\text{Tc}$ -Glucoheptonate). Το ισότοπο, το οποίο δεν προσκολλάται στο κύτταρο-στόχο, απομακρύνεται από τα ούρα υπό μορφή  $^{99m}\text{Tc}$ -Glucoheptonate. Κατά την αντίδραση διαχηλίωσης (transchelation), ο οξοτεχνητικός πυρήνας ( $^{99m}\text{Tc}=\text{O}$ ] $^{3+}$ ) συμπλοκοποιείται από τις σουλφυδρυλικές ομάδες των πλευρικών ομάδων των κυστεϊνών της μεταλλοθειο-

νεΐνης, σχηματίζοντας ένα κατά πολύ σταθερότερο σύμπλοκο απ' ό,τι το αντίστοιχο με το γλυκοεπτονικό.

Για την κατανόηση της μεθόδου σχηματισμού τεχνητών υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη, απαιτείται να γίνει μια αναδρομή στον τρόπο με τον οποίο ο κυτταρικός μηχανισμός αποφασίζει σε ποιο κυτταρικό διαμέρισμα θα οδεύσει μια συντιθέμενη πρωτεΐνη. Για να εκφραστεί μια πρωτεΐνη στην κυτταρική μεμβράνη, έχουσα και μια εξωπλασματική περιοχή, απαιτείται η ύπαρξη μιας αλληλουχίας υδρόφοβων αμινοξέων, μέσω των οποίων αγκιστρώνεται στην κυτταρική μεμβράνη (transmembrane domain), καθώς και μιας άλλης αλληλουχίας αμινοξέων, μέσω της οποίας γίνεται η αναγνώριση από τον κυτταρικό μηχανισμό για το πού θα οδεύσει η πρωτεΐνη μετά από την έναρξη της σύνθεσής της (signal peptide). Στα κύτταρα των θηλαστικών, αμέσως μετά από την έναρξη της μετάφρασης της πρωτεΐνης από τα ριβοσώματα, η ύπαρξη του signal peptide γίνεται αντιληπτή από μια ειδική κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (signal recognition particle, SRP) και το όλο σύμπλεγμα κατευθύνεται προς το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (rough endoplasmic reticulum), όπου συμπληρώνεται η μετάφραση.<sup>28</sup>

Η μετάφραση συνεχίζεται πλέον στο συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα και αναδύεται αρχικά η διαμεμβρανική περιοχή, η οποία ενσωματώνεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και ακολουθεί τελικά η σύνθεση και της εξωπλασματικής περιοχής. Στο πέρας της μετάφρασης, η μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου συντίκεται με την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη και το

### Έκφραση του γονιδίου-φορέα

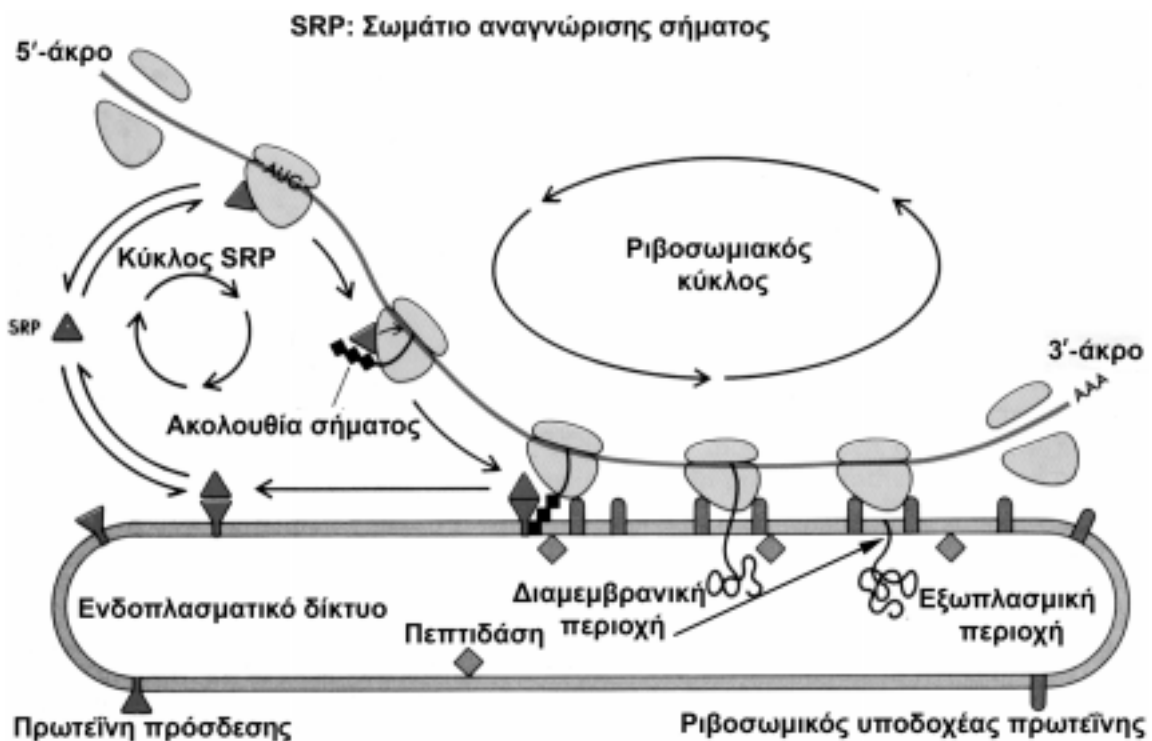


**Εικόνα 9.** Σχηματική παράσταση της έκφρασης στην κυτταρική επιφάνεια ενός τεχνητού υποδοχέα. Το γονίδιο, το οποίο φέρει την πληροφορία για τη σύνθεσή του, αποτελείται κατά ένα μέρος από το γονίδιο που κωδικοποιεί έναν ενδοκυττάριο υποδοχέα (όπως είναι η μεταλλοθειοεΐνη). Να σημειωθεί ότι η μεταλλοθειοεΐνη έχει τη δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκου με κάποιο ραδιομέταλλο (π.χ. Tc-99m). Ωστόσο, το άλλο τμήμα του γονιδίου κωδικοποιεί την υδρόφοβη αλληλουχία των αμινοξέων (μέσω των οποίων ο τεχνητός υποδοχέας συγκρατείται δίκην άγκυρας στη μεμβράνη) κάποιου μεμβρανοσυνδεδεμένου υποδοχέα. Προσοχή δίνεται στη σειρά (5'-3') με την οποία τα γονίδια είναι συνδεδεμένα, ώστε η παραγόμενη πρωτεΐνη να οδεύσει στο ενδοπλασματικό δίκτυο και να έχει τον κατάλληλο προσανατολισμό (βλ. κείμενο).

περιεχόμενό του εξωκυττάρωνεται, οπότε και το τμήμα της νεοσυντεθείσας πρωτεΐνης, το οποίο είχε προσανατολισμό μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καθίσταται πλέον εξωκυττάριο. Σχηματικά, τα παραπάνω περιγράφονται από την εικόνα 10. Είναι ακόμα γνωστό ότι κατά τη μετάφραση οι πρωτεΐνες συντίθενται αρχής γενομένης από το Ν-τελικό άκρο τους (αμινοτελικό) προς το C-τελικό άκρο τους (καρβοξυτελικό), γεγονός το οποίο σημαίνει ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την περιοχή με το signal peptide και τη διαμεμβρανική περιοχή, πρέπει να προηγείται του γονιδίου που κωδικοποιεί την εξωπλασματική περιοχή (μεταλλοθειονεΐνη) και η οποία θα συμπλοκοποιήσει το ραδιομέταλλο. Δηλαδή, στο 5' άκρο του γονιδίου, από το οποίο προκύπτει η χιμαιρική πρωτεΐνη, βρίσκεται η πληροφορία του signal peptide και της διαμεμβρανικής περιοχής και στη συνέχεια ακολουθεί η πληροφορία η οποία κωδικοποιεί τη δομή της μεταλλοθειονεΐνης. Επιπλέον, σημειώνεται ότι η περιοχή του signal peptide πρέπει να ακολουθείται *αμέσως* μετά από τη διαμεμβρανική περιοχή (πρωτεΐνες τύπου II), ώστε η ακολουθούσα εξωπλασματική περιοχή να έχει τον κατάλληλο προσανατολισμό (εξωκυττάριο).

### 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όσο συνεχίζει να εξελίσσεται με αλματώδη ρυθμό ο τομέας της γονιδιακής θεραπείας, τόσο αναμένεται να ακολουθήσει και η τεχνολογία της απεικόνισης της μεταφοράς και της έκφρασης των διαφόρων μεταφερόμενων γονιδίων. Οι ραδιοϊσοτοπικές απεικονιστικές τεχνικές, με την εξαιρετική τους ευαισθησία, αναμένεται να παίξουν σημαντικό ρόλο στην όλη αυτή προσπάθεια, ενώ και η διακριτική τους ικανότητα αναμένεται να βελτιωθεί σημαντικά στο μέλλον. Ένα άλλο σημαντικό προσόν των ραδιοϊσοτοπικών απεικονιστικών μεθόδων της γονιδιακής μεταφοράς είναι και η μεγάλη ταχύτητα με την οποία εργαστηριακές μελέτες μπορούν να κινηθούν προς το πεδίο των κλινικών εφαρμογών, μια και οι συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων ραδιοφαρμάκων είναι εξαιρετικά μικρές, κάτω από τα επίπεδα δυνατότητας άσκησης φαρμακοδυναμικής δράσης και φυσικά τοξικότητας. Από όλες τις μεθοδολογίες, οι οποίες δοκιμάζονται και αναπτύχθηκαν περιληπτικά σε αυτή την ανασκόπηση, οι έμμεσες μέθοδοι, με τη χρήση ενός γονιδίου-δείκτη (marker ή reporter gene), φαίνεται να έχουν τον πρώτο λόγο ως μέθοδοι διαπίστωσης της



**Εικόνα 10.** Σχηματική παράσταση του μηχανισμού της σύνθεσης των μεμβρανοσυνδεδεμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Με την έναρξη της μετάφρασης, η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη SRP αναγνωρίζει την αναδυόμενη ακολουθία (SRP: signal peptide sequence) και κατευθύνει το ριβόσωμα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου περατώνεται η μετάφραση. Στη συνέχεια, το κυστίδιο του ενδοπλασματικού δικτύου συντίθεται με την κυτταρική μεμβράνη και το περιεχόμενό του καθίσταται εξωκυττάριος χώρος.

παρουσίας και της έκφρασης ενός θεραπευτικού γονιδίου σε έναν οργανισμό. Πάντως, όλα αυτά δεν αναμένεται να εισαχθούν στην κλινική πράξη πριν από το 2015, σύμφωνα με τις εκτιμήσεις της RAND Corporation,<sup>32</sup> εκτός αν συμβούν επαναστατικές ανακαλύψεις στον τομέα της επιλεκτικής αποστολής γενετικού υλι-

κού σε συγκεκριμένο ιστό στον οργανισμό. Ωστόσο, εκτός από τη γονιδιακή θεραπεία, η αναπτυχθείσα απεικονιστική μεθοδολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες περιοχές ενδιαφέροντος των βιολογικών επιστημών, όπως είναι η Ογκολογία, η Φαρμακολογία, η Νευροβιολογία και η Βιολογία μεταμοσχεύσεων.

## ABSTRACT

### Molecular imaging – Imaging transgene expression with radioisotopic techniques

A. ZANGLIS

Department of Nuclear Medicine, “St. Savas” Oncology Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2006, 23(1):16–29

Molecular imaging techniques provide the opportunity of studying the cell biochemistry *in vivo*. Radioisotopic techniques (positron emission tomography, PET), due to their inherent high sensitivity, comprise the preferred approach, although magnetic resonance imaging-based methods (MRI) appear to be gaining momentum. Due to impressive advances in molecular biology and the feasibility of gene therapy, a non-invasive method of assessment has become imperative. Imaging of gene transfer and expression and the time frame of this expression are currently being studied by various groups, using mainly PET-based methods. This review provides an overview of the various methodologies in use (direct and indirect imaging methods) and the various radiopharmaceuticals employed. The concept of the reporter gene is discussed in the context of indirect imaging methods, the various modifications of which are briefly discussed, with emphasis on the bicistronic and the artificial receptor approaches. The most frequently used reporter genes, such as the thymidine kinase (TK) and the post-synaptic dopaminergic receptor 2 (D<sub>2</sub>R) genes are described. The principles of the artificial receptor approach are discussed.

**Key words:** Artificial receptors, Bicistronic approach, Direct imaging, Indirect imaging, Molecular imaging, Transgene expression

## Βιβλιογραφία

1. WAGNER HN. Molecular nuclear medicine: From genotype to phenotype via chemotype. *J Nucl Med* 1995, 36:2S–4S
2. WEISSELER R, MAHMOOD U. Molecular imaging. *Radiology* 2001, 219:316–333
3. NUNN AD, LINDER KE, TWEEDLE MF. Can receptors be imaged with MRI agents? *Q J Nucl Med* 1997, 41:55–62
4. WEISSELER R, MOORE A, MAHMOOD U, BHORADE R, BENVENISTE H, CHIOSSA EA ET AL. *In vivo* magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med* 2000, 6:351–354
5. LOUIE AY, HUBER MM, AHRENS ET, ROTHBACHER U, MOATS R, JACOBS RE ET AL. *In vivo* visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nature Biotechnol* 2000, 18:321–325
6. NICOL C, KIM EE. Molecular imaging and gene therapy. *J Nucl Med* 2001, 42:1368–1374
7. PHELPS ME. PET: The merging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med* 2000, 41:661–682
8. GAMBHIR SS, HERSCHMAN HR, CHERRY SR, BARRIO JR, SATYAMURTHY N, TOYOKUNI T ET AL. Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies. *Neoplasia* 2000, 2:118–138
9. GAMBHIR SS, BARRIO JR, HERSCHMAN HR, PHELPS ME. Assays for non-invasive imaging of reporter gene expression. *Nucl Med Biol* 1999, 26:481–490
10. BOERMAN OC, OYEN WJG, CORSTENS FHM. Progress in gene therapy: Seeing is believing. *J Nucl Med* 2001, 42:1235–1237
11. GAMBHIR SS, BARRIO JR, HERSCHMAN HR, PHELPS ME. Imaging gene expression: Principles and assays. *J Nucl Cardiol* 1999, 6:219–233
12. URBAIN JL. Oncogenes, cancer and imaging. *J Nucl Med* 1999, 40:498–504
13. TJUVAJEV JG, AVRIL N, OKU T, SASAJIMA T, MIYAGAWA T, JOSHI R ET AL. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography. *Cancer Res* 1998, 58:4333–4341
14. GAMBHIR SS, BARRIO JR, PHELPS ME, IYER M, NAMAVARI M, SATYAMURTHY N ET AL. Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:2333–2338

15. BERGER F, GAMBHIR SS. Recent advances in imaging endogenous or transferred gene expression utilizing radionuclide technologies in living subjects: Applications to breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001, 3:28–35
16. HABERKORN U, ALTMANN A, EISENHUT M. Functional genomics and proteomics—the role of nuclear medicine. *Eur J Nucl Med* 2002, 29:115–132
17. WERNER RG. Gene technology: Chances for diagnosis and therapy. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1994, 16:525–537
18. FRIEDMANN T. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci Am* 1997, 276:80–85
19. FELGNER PL. Non-viral strategies for gene therapy. *Sci Am* 1997, 276:86–90
20. BLAESE RM. Gene therapy for cancer. *Sci Am* 1997, 276:91–95
21. FERBER D. Gene therapy: Safer and virus-free? *Science* 2001, 294:1638–1642
22. KAY AM, GLORIOSO JC, NALDINI L. Viral vectors for gene therapy: The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001, 7:33–40
23. GAMBHIR SS, BAUER E, BLACK M, LIANG Q, KOKORIS MS, BARRIO J ET AL. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:2785–2790
24. ROGERS BE, ZINN KR, BUCHSBAUM DJ. Gene transfer strategies for improving radiolabeled peptide imaging and therapy. *Q J Nucl Med* 2000, 44:208–223
25. LIANG Q, SATYAMURTHY N, BARRIO JR, TOYOKUNI T, PHELPS MP, GAMBHIR SS ET AL. Non-invasive, quantitative imaging in living animals of a mutant dopamine D<sub>2</sub> receptor reporter gene in which ligand binding is uncoupled from signal transduction. *Gene Ther* 2001, 8:1490–1498
26. MANDELL RB, MANDELL LZ, LINK CJ. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene. *Cancer Res* 1999, 59:661–668
27. RAY P, BAUER E, IYER M, BARRIO JR, SATYAMURTHY N, PHELPS ME ET AL. Monitoring gene therapy with reporter gene imaging. *Semin Nucl Med* 2001, XXXI:312–320
28. LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL JE. *Molecular cell biology*. 4th ed. W.H. Freeman & Co, New York, 1999
29. SACHS AB, SARNOW P, HENTZE MW. Starting at the beginning, middle and end: Translation initiation in eukaryotes. *Cell* 1997, 89:831–838
30. SUN X, ANNALA AJ, YAGHOUBI SS, BARRIO JR, NGUYEN KN, TOYOKUNI T ET AL. Quantitative imaging of gene induction in living animals. *Gene Ther* 2001, 8:1572–1579
31. BOGDANOV AA, SIMONOVA M, WEISSELEDER R. Engineering membrane proteins for nuclear medicine: Applications for gene therapy and cell tracking. *Q J Nucl Med* 2000, 44:224–235
32. PHILIP SA, RICHARD S, SCHNEIDER J. The global technology revolution: Bio/Nano/materials trends and their synergies with information technology by 2015, MR-1307-NIC, 2001. <http://www.rand.org/publications/electronic/scitech.html>

*Corresponding author:*

A. Zanglis, Department of Nuclear Medicine, “St. Savas” Oncology Hospital, 171 Alexandras Ave., GR-115 22 Athens, Greece  
e-mail: azanglis@yahoo.gr

.....