



ΜΕΤΑCOLON PROJECT: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΑΓΩΓΕΩΝ Ή ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ PKM2 ΚΑΙ NRF2

Μανωλάκου Σ.^{1,2}, Κωνσταντουλάκη Α.¹, Βογιαντζόγλου Κ.¹, Μεσσαριτάκης Ι.¹, Χονδροζουμάκη Μ.³, Τρυπάκη Μ.¹, Σουγκλάκος Ι.^{1,2}

¹Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, ²Παθολογική Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, ³Εταιρεία Μελέτης Καρκίνου Πεπτικού Συστήματος, ΕΜ-ΚΑΠΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μεταβολικός φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων είναι διακριτός και διάφορος από αυτόν στα φυσιολογικά κύτταρα. Μεταβολικές οδοί που τροποποιούνται είναι η γλυκολυτική οδός που στα καρκινικά κύτταρα τείνει να οδηγεί σε αναβολικές διαδικασίες (αερόβιος γλυκόλυση ή φαινόμενο Warburg) αλλά και ο οξειδωτικός μεταβολισμός που σε πολλές περιπτώσεις είναι ενεργοποιημένος προς την πλευρά των αντιοξειδωτικών/προστατευτικών μηχανισμών.

Το MetaColon Project μελετά τις παραπάνω μεταβολικές οδούς και στόχος είναι αφ' ενός η εύρεση νέων αλληλεπιδράσεων που ενδεχομένως να οδηγούν στη χημειοανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων και αφ' ετέρου η εφαρμογή αυτής της γνώσης στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου (εύρεση νέων βιοδεικτών ή στόχων)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μεταβολικές αλλαγές που επισυμβαίνουν στα καρκινικά κύτταρα, με στόχο την επιβίωση, την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό τους, διαμορφώνουν το μεταβολικό τους φαινότυπο και οδηγούν σε αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και επαγωγή αναβολικών διεργασιών μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αερόβιος γλυκόλυση ή επίδραση Warburg με κεντρικό ρυθμιστή το ένζυμο, PKM2. Εκτός όμως από τις παραπάνω μεταβολές τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να επιβιώσουν μεταβάλλουν και τον οξειδωτικό μεταβολισμό τους ενεργοποιώντας το μονοπάτι Nrf2 το οποίο επάγει την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων. Βιβλιογραφικά δεδομένα αναδεικνύουν την πιθανή συσχέτιση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 με τα μεταβολικά μονοπάτια που εξαρτώνται από την PKM2 αλλά σαφής μηχανισμός αλληλεπίδρασης σε μεταγραφικό ή/και μεταμεταφραστικό επίπεδο δεν έχει ακόμη περιγραφεί. Επιπλέον η σχέση των δύο παραπάνω μεταβολικών μονοπατιών με την χημειοανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

(α) Κυτταροκαλλιέργεια 4 κυτταρικών σειρών (ΚΣ) - διαφορετικού μοριακού προφίλ - αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου (LoVo, HT29, Colo205, SW480) και 3 ΚΣ ελέγχου (Skov3, A549, CCD112-Con),
(β) Δοκιμασία επιβίωσης κυττάρων (IC₅₀) με oxaliplatin, oxa και 5-fluouracil, 5FU,
(γ) Τεχνικές ανοσοφθορισμού (IHF), με/χωρίς φάρμακο, και με/χωρίς χημικούς αναστολείς (inh) της PKM2: shikonin & insulin, αλλά και του Nrf2: brusatol, ή με/χωρίς επαγωγείς (ind) της PKM2: TEPP4 και του Nrf2: sulforaphane

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη της επίδρασης του αντιοξειδωτικού σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf2 στις μεταβολικές οδούς που εξαρτώνται από το ένζυμο PKM2 στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και της συσχέτισης των μονοπατιών αυτών με την εκδήλωση ανθεκτικότητας στην ενδεχόμενη χημειοθεραπεία (5-fluouracil/oxaliplatin σχήματα)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

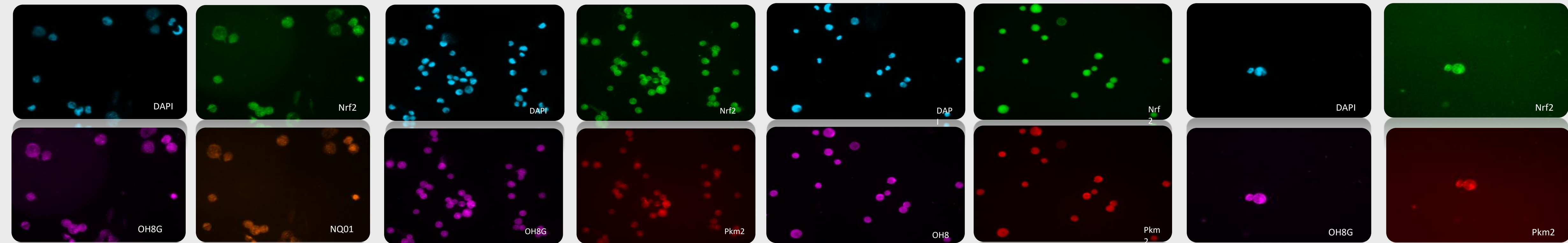
Η **LoVo** αποδεικνύεται ως η πιο χημειοευαίσθητη κυτταρική σειρά ενώ η SW480 ως η πιο χημειοανθεκτική κυτταρική σειρά παχέος εντέρου. Η πλατινοευαίσθησία της LoVo δεν επηρεάζεται από την προσθήκη χημικών επαγωγέων/αναστολέων. Αντίθετα, η 5FU δεν αυξάνει το οξειδωτικό στρες, με την Nrf2 πυρηνική έκφραση να παραμένει χαμηλή (Εικ.1).

Στην **HT29** η insulin (PKM2inh) σχετίζεται με υψηλή Nrf2 πυρηνική έκφραση, σε αντίθεση με την TEPP46 (PKM2ind) στην οποία παρατηρείται Nrf2 χαμηλή πυρηνική έκφραση και σε κάποια κυτταρα απουσία αυτής (Εικ.2). Αυτό συμφωνεί και με τα πειράματα κυτταρικής επιβίωσης, όπου στην πρώτη περίπτωση το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων παραμένει σταθερό, ενώ στην δεύτερη ενδεχομένως λόγω μειωμένης αντιοξειδωσης, μειώνεται σημαντικά (Πιν.2).

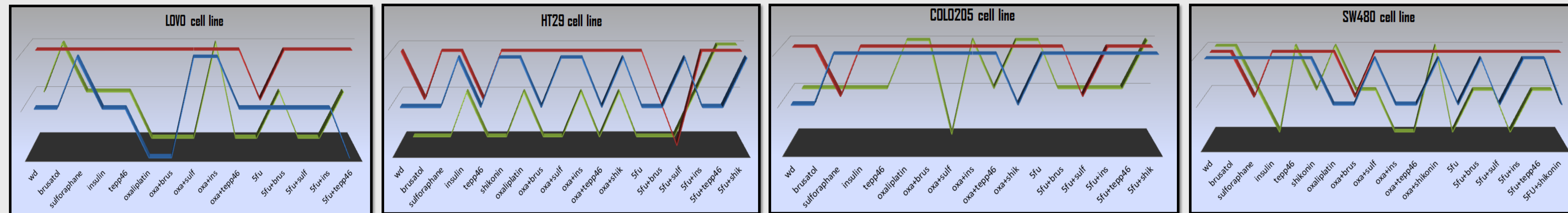
Στην **Colo205** αν και παρατηρήθηκε η αναμενόμενη Nrf2 πυρηνική έκφραση με brusatol (Nrf2inh) και sulforaphane (Nrf2ind), η ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής μεταβολικής οδού δε φαίνεται να επάγει την κυτταρική επιβίωση. Αντιθέτως η μειωμένη PKM2 πυρηνική έκφραση συμφωνεί με την χημειοανθεκτικότητα της Colo205 (Εικ. 3, Πιν. 3).

Η πλέον χημειοανθεκτική κυτταρική σειρά **SW480** εμφανίζει σταθερά χαμηλή PKM2 πυρηνική χρώση, όμως εντύπωση παρουσιάζει ότι η επώαση με insulin ή 5FU+insulin συνδυάζεται με αυξημένο ποσοστό επιβίωσης σε σχέση με το control σε αντίθεση με την επώαση με oxaliplatin+insulin όπου το πλεονέκτημα χάνεται.

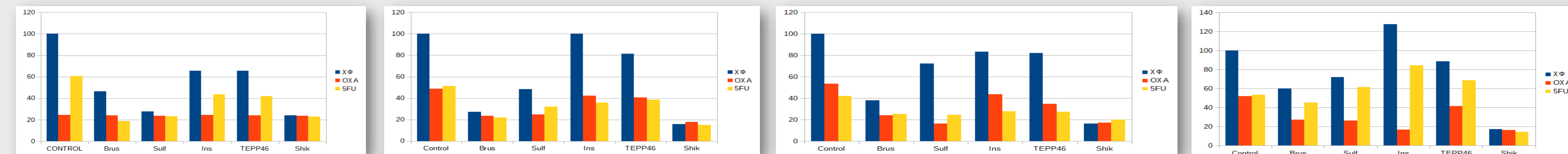
Τέλος, η *shikonin* (PKM2inh) προκαλεί εντυπωσιακή θανάτωση σε όλες τις ΚΣ, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με φάρμακο.



Εικόνα 1. Ανοσοφθορισμός της LoVo κυτταρικής σειράς μετά από την προσθήκη 5FU. Εικόνα 2. Ανοσοφθορισμός της HT29 κυτταρικής σειράς μετά από την προσθήκη insulin. Εικόνα 3. Ανοσοφθορισμός της Colo205 κυτταρικής σειράς μετά από την προσθήκη sulforaphane. Εικόνα 4. Ανοσοφθορισμός της SW480 κυτταρικής σειράς μετά από την προσθήκη oxaliplatin/insulin.



Διάγραμμα 1: Αναπαράσταση της πυρηνικής έκφρασης του Nrf2, της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής έκφρασης της PKM2 στην κυτταρική σειρά LoVo (Μπλε: Nrf2 πυρηνική χρώση, Κόκκινο: PKM2 κυτταροπλασματική χρώση, Πράσινο: PKM2 πυρηνική χρώση). Διάγραμμα 2: Αναπαράσταση της πυρηνικής έκφρασης του Nrf2, της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής έκφρασης της PKM2 στην κυτταρική σειρά HT29 (Μπλε: Nrf2 πυρηνική χρώση, Κόκκινο: PKM2 κυτταροπλασματική χρώση, Πράσινο: PKM2 πυρηνική χρώση). Διάγραμμα 3: Αναπαράσταση της πυρηνικής έκφρασης του Nrf2, της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής έκφρασης της PKM2 στην κυτταρική σειρά Colo205 (Μπλε: Nrf2 πυρηνική χρώση, Κόκκινο: PKM2 κυτταροπλασματική χρώση, Πράσινο: PKM2 πυρηνική χρώση). Διάγραμμα 4: Αναπαράσταση της πυρηνικής έκφρασης του Nrf2, της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής έκφρασης της PKM2 στην κυτταρική σειρά SW480 (Μπλε: Nrf2 πυρηνική χρώση, Κόκκινο: PKM2 κυτταροπλασματική χρώση, Πράσινο: PKM2 πυρηνική χρώση).



Πίνακας 1. Δοκιμασία κυτταρικής επιβίωσης στην κυτταρική σειρά LoVo. Πίνακας 2. Δοκιμασία κυτταρικής επιβίωσης στην κυτταρική σειρά HT29. Πίνακας 3. Δοκιμασία κυτταρικής επιβίωσης στην κυτταρική σειρά Colo205. Πίνακας 4. Δοκιμασία κυτταρικής επιβίωσης στην κυτταρική σειρά SW480.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

-Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών επιβίωσης χωρίς την επίδραση χημικών αναστολέων/επαγωγέων είναι ανάλογα της βιβλιογραφίας
-Από τα αποτελέσματα των ανοσοφθορισμών και συγκριτικά με τις δοκιμασίες επιβίωσης παρατηρούνται τα κάτωθι:
α. Η έκφραση της PKM2 είναι υψηλή σε όλα τα αποπτωτικά κύτταρα των κυτταρικών σειρών
β. Η πρωτεΐνη Nrf2 εκφράζεται σε όλες τις κυτταρικές σειρές.
γ. Οι Colo205, A549 και SW480 εμφανίζουν έντονη πυρηνική χρώση, στοιχείο που αναδεικνύει την ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μονοπατιού αλλά και ενδεχομένως να συνδέεται με τη χημειοανθεκτικότητα των σειρών αυτών
δ. Αν και η sulforaphane δεν επάγει τον Nrf2 και την πυρηνική του έκφραση στην HT29, ο συνδυασμός oxaliplatin/sulforaphane ενεργοποιεί τον οξειδωτικό μεταβολισμό στην ίδια σειρά (συνέργεια?)
ε. Αντίθετα, ενώ η ινσουλίνη συμβάλλει στην επιβίωση των κυττάρων και στη χημειοανθεκτικότητά τους, στην SW480 η προσθήκη oxaliplatin/insulin προσφέρει πλεονέκτημα επιβίωσης στα κύτταρα
στ. Κάθε κυτταρική σειρά εμφανίζει διαφορετικό μοτίβο έκφρασης των Nrf2/PKM2 γεγονός που ενδεχομένως να συσχετίζεται με το διαφορετικό μοριακό φαινότυπο της

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

A. Πειράματα ποσοτικοποίησης έκφρασης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος αλλά και της αλλοστερικότητας της PKM2, σε κάθε συνθήκη είναι απαραίτητα για τη περαιτέρω εξερεύνηση της υπόθεσης.

B. Η παρούσα μελέτη είναι συνεχιζόμενη και η μελέτη των μονοπατιών αυτών
A) σε παραφαινοποιημένους ιστούς ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου ή
B) σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, ενδέχεται να αναδείξει νέες μοριακές μεταβολικές αλληλεπιδράσεις που επισυμβαίνουν ενδοκυτταρίως στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Manolakou SD, et al., J Stem Cell Res Dev 2020, 6: 040
- Zhu J, Bi Z, Yang T, et al.. PLoS One. 2014;9(12):e113733.
- Fu, J., Xiong, Z. et al. J. Biol. Chem. 2019, 294, 327–340
- Wiegering A. et al. Neoplasia, 2017, 19(4): 301–309

ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ

Σταυρούλα Μανωλάκου
Πανεπιστήμιο Κρήτης
Email: manolakoustavroula@gmail.com