

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PXR ΣΤΟΝ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Σαράντης Παναγιώτης¹, Καραμούζης Μιχάλης¹, Κούστας Ευάγγελος¹, Δίκογλου-Τζανετάτου Ελευθερία¹, Ιωακειμίδου Ευαγγελία¹, Τσουρουφλής Γεράσιμος², Θεοχάρης Σταμάτιος³

1 Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Τμήμα Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 11527 Αθήνα, Ελλάδα 2 Β' Χειρουργική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 11527 Αθήνα, Ελλάδα 3 Παθολογο-ανατομικό Εργαστήριο, Ιατρική Σχολή, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, 11527 Αθήνα, Ελλάδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο ορθοκολικός καρκίνος (CRC) είναι μια από τις πιο συχνά διαγνωσμένες κακοήθειες παγκοσμίως. Αν και η χημειοθεραπεία αντιπροσωπεύει μια αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση, η αποτελεσματικότητα της θεραπείας είναι συχνά περιορισμένη λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων. Αρκετές μελέτες συσχετίζουν τον υποδοχέα πρεγνάνης Χ (PXR) με αντοχή στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα ρυθμίζοντας το μεταβολισμό και τη μεταφορά. Η αυτοφαγία αντιπροσωπεύει έναν άλλο γνωστό μηχανισμό αντοχής κατά της χημειοθεραπείας. Μέθοδοι: Οι κυτταρικές σειρές mtKRAS CRC, DLD-1, HCT116 και SW480 επώαστηκαν σε 10 μΜ ιρινοτεκάνη και 20 nM siRNA-PXR για 48 ώρες. Επιπλέον, οι ίδιες κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν σε 5 mM 3-MA (3-Μεθυλαδενίνη), 10 μΜ HCQ (Υδροξυχλωροκίνη) και 1 μΜ PI-103 για 24 ώρες. Τα επίπεδα των p62, LC3, PARP και PXR ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός του PXR ανιχνεύθηκε με συνεστική μικροσκοπία. Τα επίπεδα έκφρασης διαφορετικών γονιδίων ελέγχθηκαν με RT-PCR. Σκοπός: Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να διερευνηθεί τον ρόλο της εξαρτώμενης από mtKRAS αυτοφαγίας συναρτήσει του PXR μετά από θεραπεία με ιρινοτεκάνη στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αποτελέσματα: Η ιρινοτεκάνη ενεργοποιεί την αυτοφαγία σε όλες τις κυτταρικές σειρές CRC που χρησιμοποιήθηκαν. Μετά την αποσιώπηση του PXR με siRNA, η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας δεν επηρεάζεται και ενεργοποιείται ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος. Η αναστολή (HCQ) ή η επαγωγή (PI-103) της αυτοφαγίας φάνηκε να μειώνει και να αυξάνει τα επίπεδα πρωτεΐνης PXR, αντίστοιχα. Επιπλέον, η πυρηνική κατανομή PXR αυξήθηκε μετά την αυτοφαγική επαγωγή, η οποία φαίνεται από τη συνεστική μικροσκοπία. Συμπεράσματα: Συλλογικά, αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η αυτοφαγία δρα ως κυτταροπροστατευτικός μηχανισμός κατά της ιρινοτεκάνης, πιθανώς μέσω της επαγωγής και της υποκυτταρικής μεταφοράς του PXR σε μοντέλα mtKRAS CRC.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

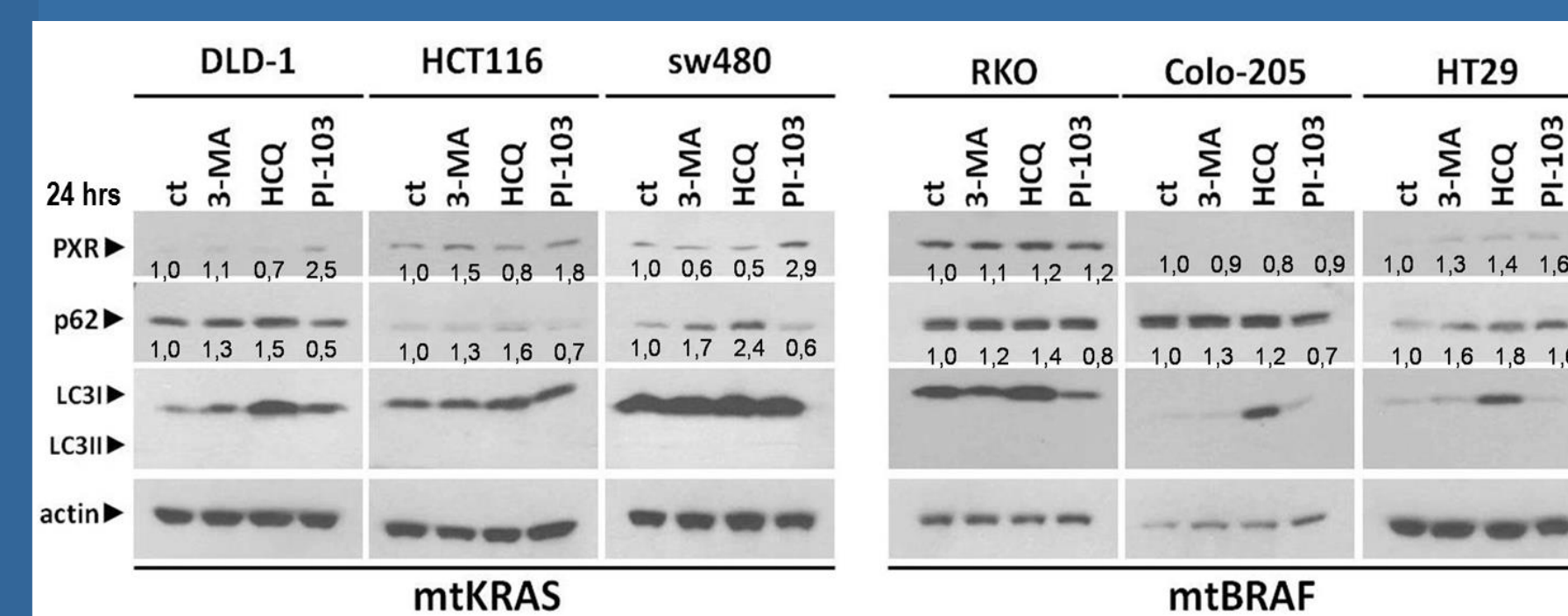
Ο ορθοκολικός καρκίνος (CRC) είναι μια από τις πιο συχνά διαγνωσμένες κακοήθειες παγκοσμίως. Αν και η χημειοθεραπεία αντιπροσωπεύει μια αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση, η αποτελεσματικότητα της θεραπείας είναι συχνά περιορισμένη λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων. Αρκετές μελέτες συσχετίζουν τον υποδοχέα πρεγνάνης Χ (PXR) με αντοχή στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα ρυθμίζοντας το μεταβολισμό και τη μεταφορά. Η αυτοφαγία αντιπροσωπεύει έναν άλλο γνωστό μηχανισμό αντοχής κατά της χημειοθεραπείας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι κυτταρικές σειρές mtKRAS CRC, DLD-1, HCT116 και SW480 επώαστηκαν σε 10 μΜ ιρινοτεκάνη και 20 nM siRNA-PXR για 48 ώρες. Επιπλέον, οι ίδιες κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν σε 5 mM 3-MA (3-Μεθυλαδενίνη), 10 μΜ HCQ (Υδροξυχλωροκίνη) και 1 μΜ PI-103 για 24 ώρες. Τα επίπεδα των p62, LC3, PARP και PXR ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός του PXR ανιχνεύθηκε με συνεστική μικροσκοπία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

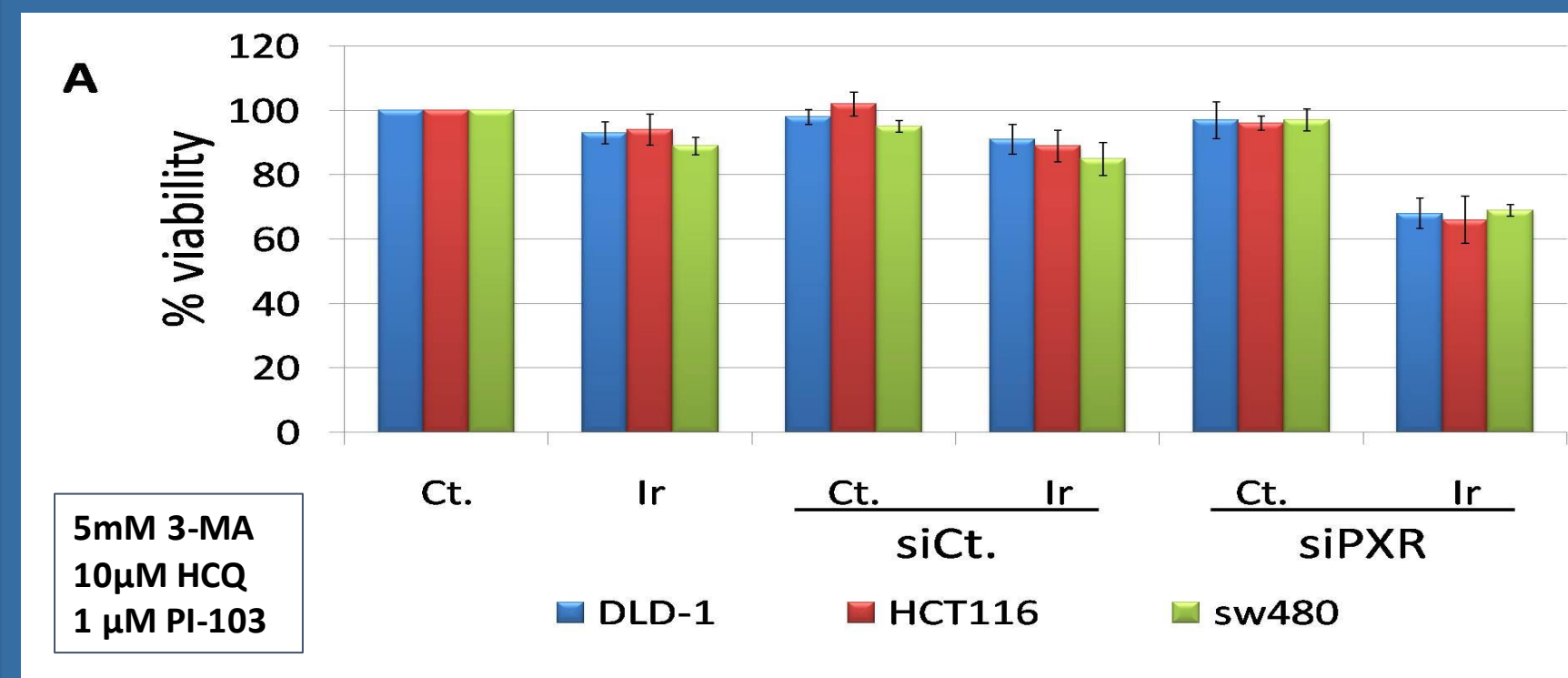
1. Η αυτοφαγία ρυθμίζει την έκφραση του PXR σε κυτταρικές σειρές mtKRAS CRC
Η αναστολή της αυτοφαγίας με υδροξυχλωροκίνη (HCQ) μείωσε τα επίπεδα πρωτεΐνης του PXR σε τρεις μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές KRAS (DLD-1, HCT116 και sw480). Επιπλέον, η επαγωγή αυτοφαγίας με PI-103 (διπλός αναστολέας του AKT και mTOR) αύξησε σημαντικά τα επίπεδα πρωτεΐνης του PXR. Η αναστολή της έναρξης της αυτοφαγίας με 3-μεθυλαδενίνη (3-MA), δεν άλλαξε τα επίπεδα του PXR στις ίδιες κυτταρικές σειρές.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

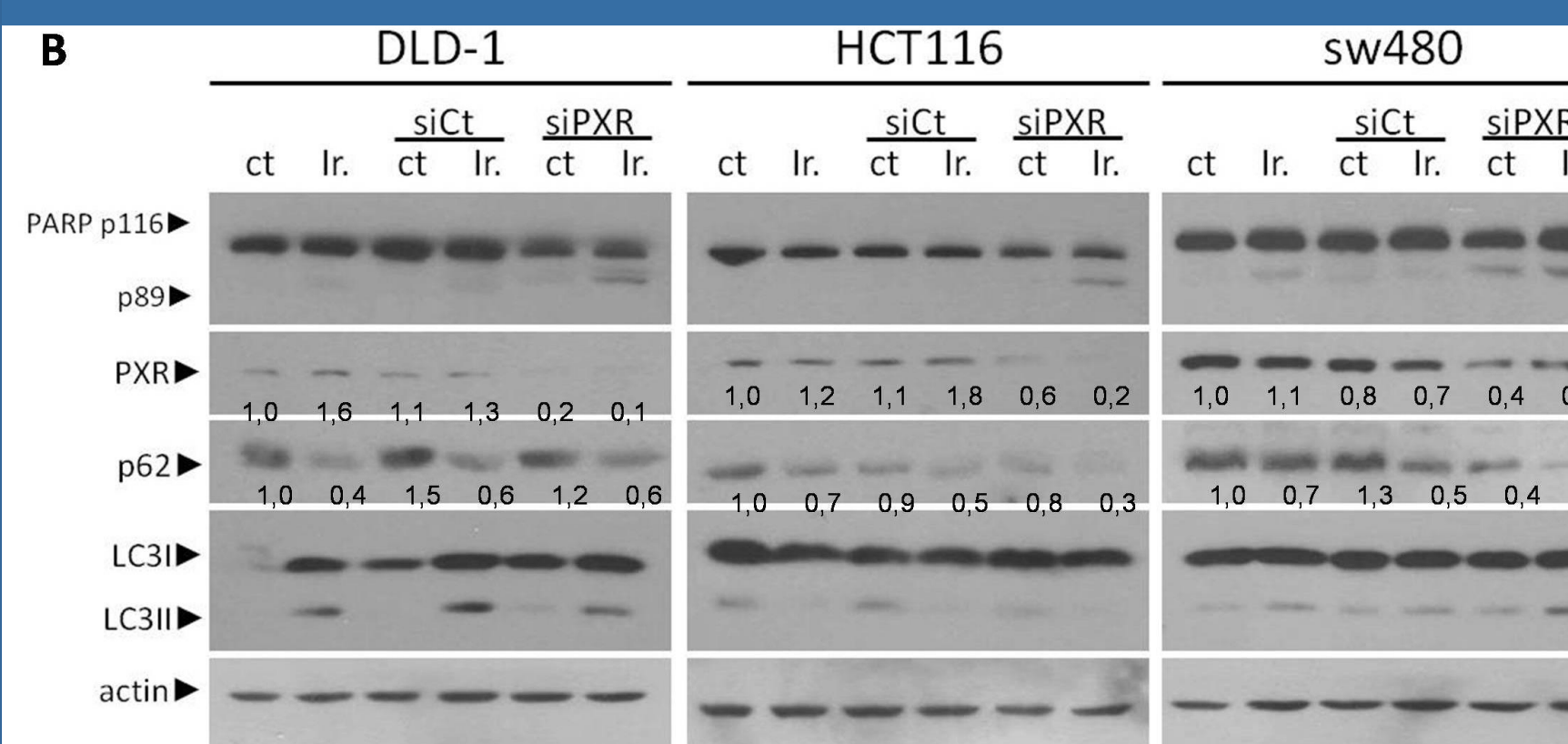
2. Η αποσιώπηση του PXR με siRNA δεν επηρέασε την αυτοφαγία μετά τη θεραπεία με ιρινοτεκάνη

Η ιρινοτεκάνη προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και μειώνει την κυτταρική βιωσιμότητα μετά από αποσιώπηση του PXR (Εικόνες Α,Β).



3. Η εξαρτώμενη από την ιρινοτεκάνη επαγωγή αυτοφαγίας ως προστατευτικός μηχανισμός

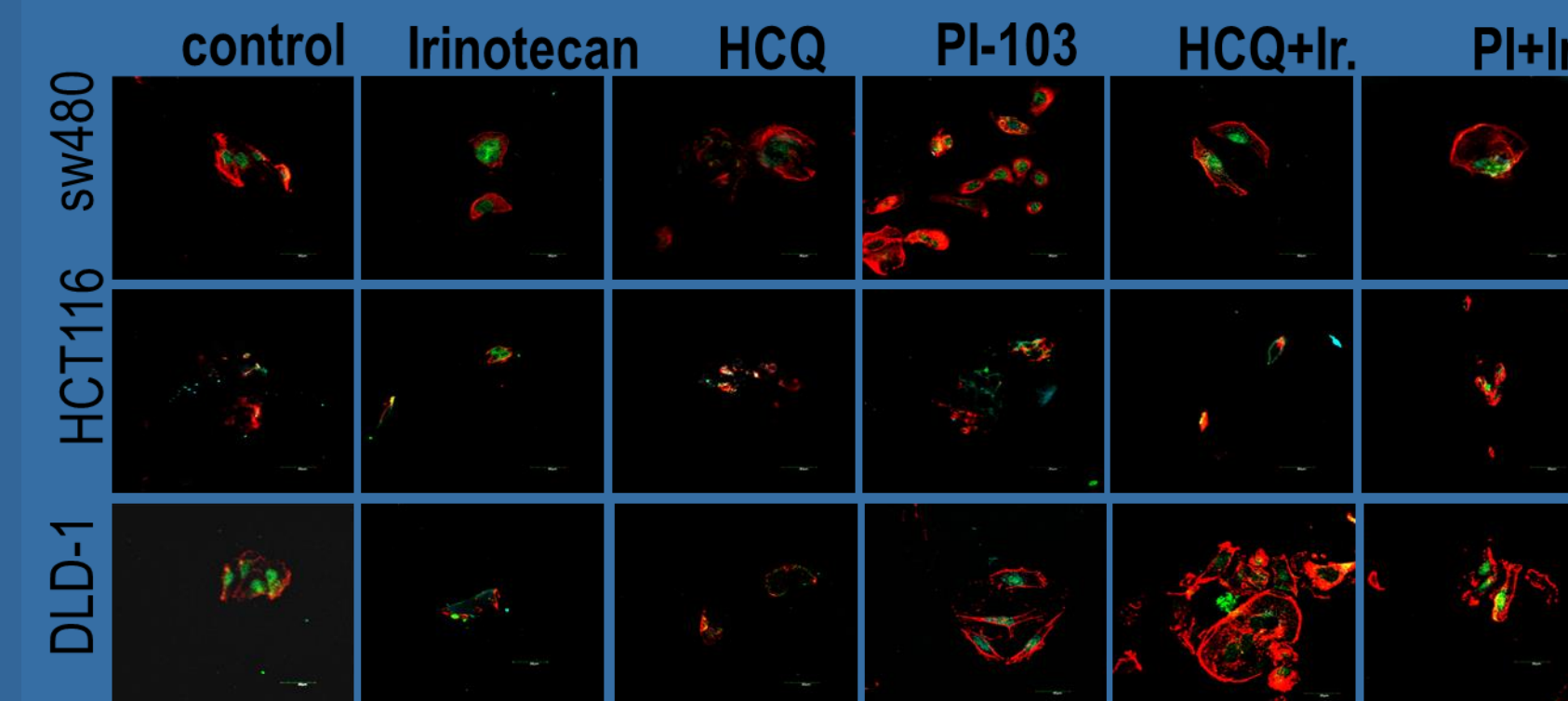
Η ιρινοτεκάνη ενεργοποιεί την αυτοφαγία στις κυτταρικές σειρές mtKRAS (DLD-1, HCT116 και sw480) καθώς αναγνωρίστηκε μέσω των επιπέδων πρωτεϊνών των p62 και LC3 και αυξάνει την έκφραση του PXR (Εικόνα Β).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. Η αυτοφαγία ρυθμίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του PXR σε κυτταρικές σειρές mtKRAS CRC

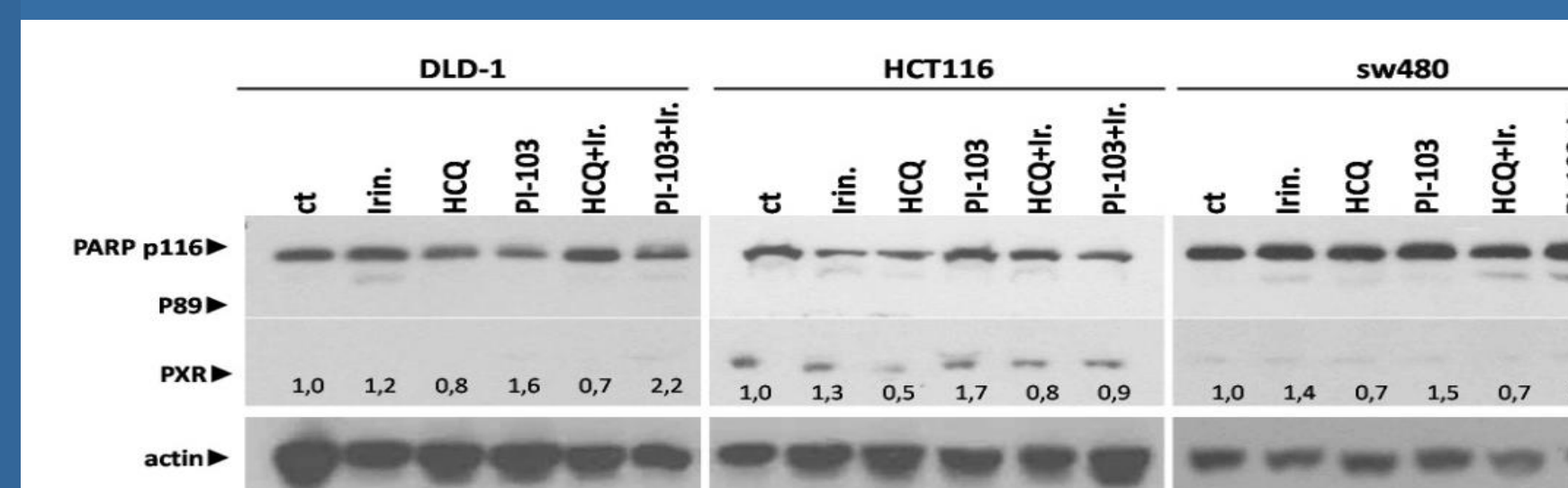
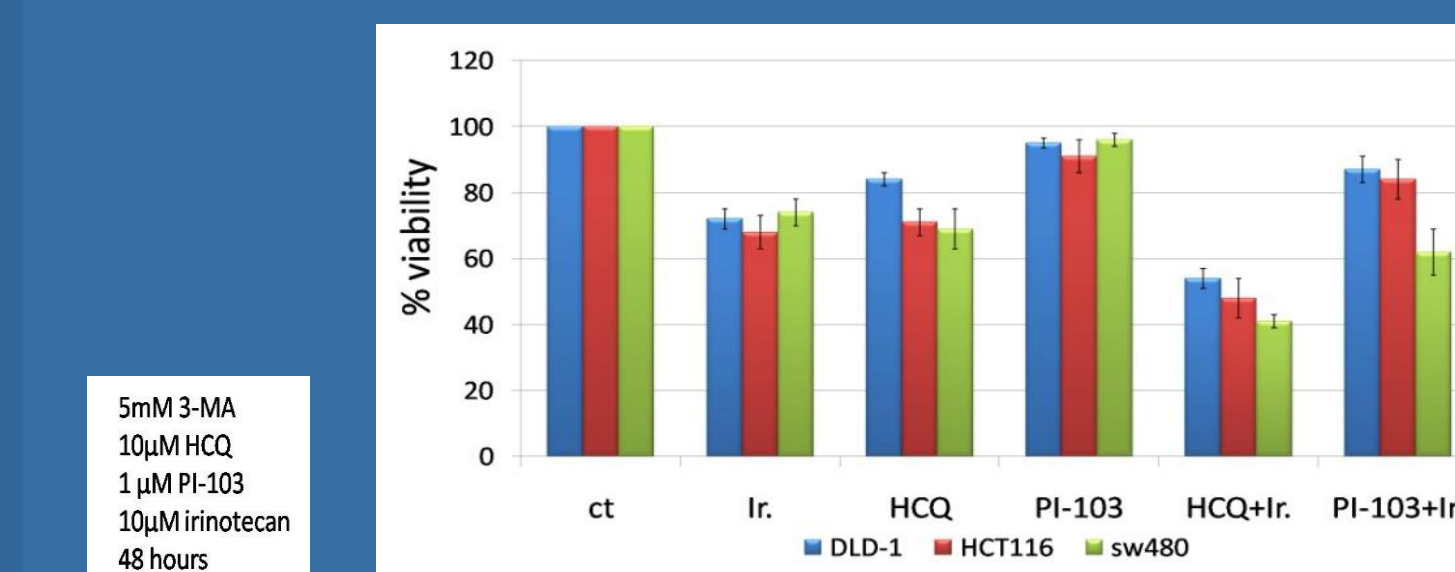
Η αναστολή της αυτοφαγίας με υδροξυχλωροκίνη (HCQ) αυξάνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του PXR στο κυτταρόπλασμα. Επαγωγή αυτοφαγίας με διπλό αναστολέα AKT και mTOR (PI-103) καθώς η ιρινοτεκάνη αυξάνει τον εντοπισμό του PXR στον πυρήνα. Επίσης, η αναστολή της αυτοφαγίας ενεργοποιεί τη μετακίνηση του PXR στον πυρήνα.



Red: phalloidin
Green: PXR
Light blue: MDC

5. Η αυτοφαγία δρα ως κυτταροπροστατευτικός μηχανισμός κατά της ιρινοτεκάνης

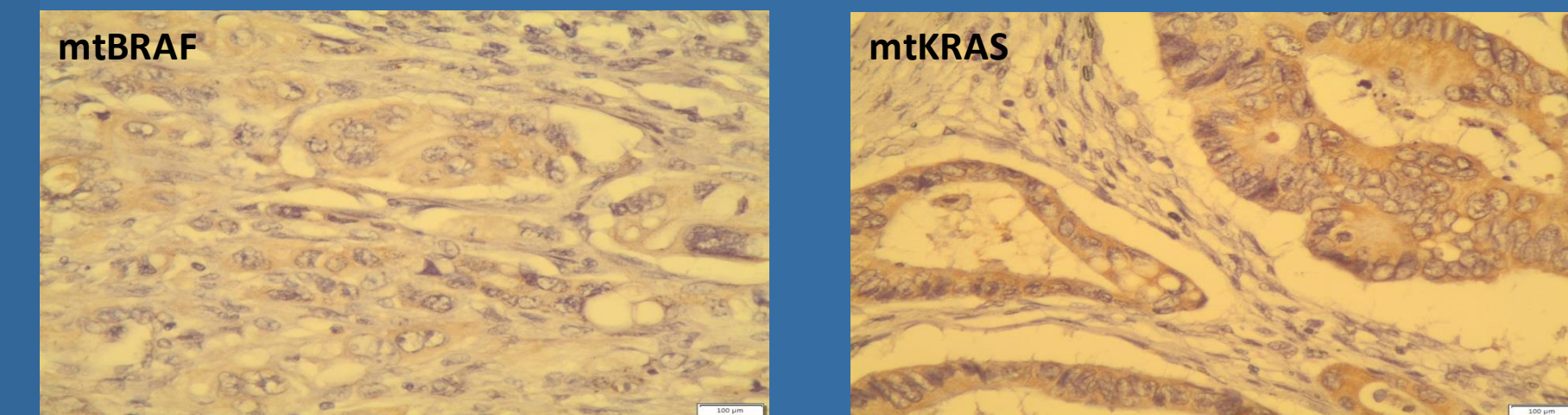
Η ιρινοτεκάνη προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε κυτταρικές σειρές mtKRAS. Η συγχρόνηση ιρινοτεκάνης και υδροξυχλωροκίνης μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων μέσω απόπτωσης. Η επαγωγή αυτοφαγίας με PI-103 προστατεύει τα κύτταρα CRC στην ιρινοτεκάνη.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6. Η έκφραση του PXR σε ανθρώπινα δείγματα mtKRAS είναι υψηλότερη από τα δείγματα mtBRAF

Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανοσοϊστοχημεία με το PXR αντίσωμα σε ανθρώπινα δείγματα CRC που φέρουν μετάλλαξη στο BRAF ή στο KRAS γονίδιο. Τα δείγματα mtKRAS έχουν υψηλότερη έκφραση PXR από τα δείγματα mtBRAF.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Στο control το PXR εντοπίζεται στον πυρήνα
- ✓ Με την ιρινοτεκάνη, αυξημένο στον πυρήνα
- ✓ Παρουσία inducer (PI-103) της αυτοφαγίας αύξηση του PXR στον πυρήνα
- ✓ Παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας (HCQ) το PXR εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα πλέον σε συνδυασμό με τα αυτοφαγικά vacuoles

Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αυτοφαγία ρυθμίζει την έκφραση του PXR σε κυτταρικές σειρές mtKRAS πιθανώς μέσω της επαγωγής και της υποκυτταρικής μεταφοράς PXR σε μοντέλα mtKRAS CRC. Επιπλέον, υποστηρίζεται η υπόθεση ότι η αυτοφαγία προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε κυτταρικές σειρές mtKRAS CRC.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Kotta-Loizou I, Patsouris E, Theocharis S. Pregnane X receptor polymorphisms associated with human diseases. Expert Opin Ther Targets. 2013;17(10):1167-1177. doi:10.1517/14728222.2013.823403
- Dong Y, Wang Z, Xie GF, et al. Pregnane X receptor is associated with unfavorable survival and induces chemotherapeutic resistance by transcriptional activating multidrug resistance-related protein 3 in colorectal cancer. Mol Cancer. 2017;16(1):71. Published 2017 Mar 29. doi:10.1186/s12943-017-0641-8

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

Όνοματεπώνυμο: Δρ. Μιχάλης Καραμούζης
Τηλ.: 6944290909
E-mail: mkaramouz@med.uoa.gr