



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ρόλος του πυρηνικού υποδοχέα NR5A2 στον
μεταβολισμό των κυττάρων
του γλοιοβλαστώματος»

Επιβλέπων καθηγητής: Πολίτης Παναγιώτης, PhD, Ερευνητής Β' Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.

Μηλιώτη Παναγιώτα

A.E.M.: 01296

Αθήνα 2020

UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**“The role of the nuclear receptor NR5A2
in metabolism of glioblastoma”**

Bachelor’s Diploma thesis

Milioti Panagiota

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Επιβλέπων: Πολίτης Παναγιώτης, PhD, Ερευνητής Β’ Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.

Συνεπιβλέπουσα: Ψαρρά Άννα-Μαρία, PhD, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας

Μέλος Επιτροπής: Μπαλατσός Νικόλαος, PhD, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	5
Όγκοι Νευρικού Συστήματος – Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα	6
Κύτταρα Νευρικού Συστήματος	6
Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)	6
Καρκίνος - Όγκοι Νευρικού Συστήματος.....	7
Αστροκυτταρικοί όγκοι.....	8
Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα.....	8
Μεταβολισμός.....	9
Μεταβολισμός και ενέργεια	9
Μεταβολισμός φυσιολογικών κυττάρων	10
Μεταβολισμός υδατανθράκων	11
Γλυκόλυση	11
Μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών (PPP).....	12
Γλυκονεογένεση	13
Μεταβολισμός λιπιδίων	13
Οξειδωση των λιπαρών οξέων	14
Σύνθεση λιπαρών οξέων	14
Λιπόλυση (υδρόλυση τριγλυκεριδίων)	15
Κύκλος Κιτρικού Οξέος και Οξειδωτική Φωσφορυλίωση	16
Κύκλος κιτρικού οξέος (TCA)	16
Οξειδωτική φωσφορυλίωση	16
Γλουταμινόλυση.....	17
Μεταβολισμός γλυκόζης και γλουταμίνης σε φυσιολογικό εγκέφαλο	17
Μεταβολισμός στο γλοιοβλάστωμα	19
Warburg effect και ρύθμιση της γλυκόλυσης.....	19
Υποξία στο γλοιοβλάστωμα	22
Το μικροπεριβάλλον του εγκεφαλικού όγκου	22
HIF-1α στο γλοιοβλάστωμα.....	22
Επαναπρογραμματισμός γλυκόλυσης	23
Πρόσληψη των λιπαρών οξέων και αποθήκευση των λιπιδίων	25
Γλουταμινόλυση	25
Σηματοδοτική ρύθμιση του καρκινικού μεταβολισμού	26

Πυρηνικός Υποδοχέας NR5A2	27
Πυρηνικοί Υποδοχείς.....	27
Ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας NR5A2 και οι λειτουργίες του	27
Σκοπός εργασίας.....	29
Υλικά και Μέθοδοι.....	29
Κυτταρικές Καλλιέργειες	29
Χειρισμός κυτταρικών σειρών.....	29
Καλλιέργεια/Ανακαλλιέργεια κυττάρων με θρυψίνη	30
Επιμόλυνση κυττάρων U87-MG με αδενοϊούς	30
Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA	30
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)	31
Απομόνωση πρωτεϊνών.....	33
Ανάλυση κατά Western (Western Blot)	33
Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	34
Αποτελέσματα	34
Ο NR5A2 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του εγκεφάλου.....	34
Η έκφραση του HIF-1α σε συνθήκες υπερέκφρασης και αποσιώπησης του NR5A2	35
Ρύθμιση έκφρασης των γλυκολυτικών γονιδίων στην υπερέκφραση του NR5A2.....	37
Ρύθμιση έκφρασης των γονιδίων του μεταβολισμού λιπιδίων στην υπερέκφραση του NR5A2	38
Ρύθμιση έκφρασης της γλουταμινάσης στην υπερέκφραση του NR5A2.....	39
Ρύθμιση έκφρασης γονιδίων του κύκλου του Krebs στην υπερέκφραση του NR5A2	40
Ρύθμιση έκφρασης των γλυκολυτικών γονιδίων στην αποσιώπηση του NR5A2.....	41
Ρύθμιση έκφρασης των γονιδίων του μεταβολισμού λιπιδίων στην αποσιώπηση του NR5A2	42
Ρύθμιση έκφρασης της γλουταμινάσης στην αποσιώπηση του NR5A2.....	43
Ρύθμιση έκφρασης γονιδίων του κύκλου του Krebs στην αποσιώπηση του NR5A2	43
Διαφορική έκφραση βασικών μεταβολικών γονιδίων στο γλοιοβλάστωμα και κλινικές ενδείξεις καθιστούν τον NR5A2 ιδανικό φαρμακολογικό στόχο με πιθανή αντικαρκινική δράση	44
Συζήτηση	46
ABSTRACT	50
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	51
Βιβλιογραφία	52

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Ο ρόλος του πυρηνικού υποδοχέα NR5A2 στον μεταβολισμό των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος» εκπονήθηκε στο εργαστήριο του κ. Παναγιώτη Πολίτη στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α) κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-20.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιστημονικό υπεύθυνο του έργου και διευθυντή του εργαστηρίου Δρ. Παναγιώτη Πολίτη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε συμπεριλαμβάνοντάς με στο εργαστήριό του και στην παρούσα μελέτη και φυσικά για την ανεκτίμητη επιστημονική καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου προσέφερε.

Φυσικά, ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα και φίλο μου Δημήτρη Γκίκα. Η βοήθεια και η καθοδήγησή του, η οποία δεν περιορίστηκε σε εργαστηριακά θέματα, οι γνώσεις, το πάθος του για την επιστήμη αλλά και η αστείρευτη ενέργειά του με ενέπνευσαν σε πολλούς τομείς και με έκαναν να αγαπήσω βαθιά την έρευνα.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο, Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής και ήταν πρόθυμοι να με βοηθήσουν σε ό,τι χρειαστεί.

Στη συνέχεια, ξεχωριστά ευχαριστώ τον προπτυχιακό φοιτητή Ισαάκ Ταραμπουλούς για τις συμβουλές του αλλά και τον μεταδιδακτορικό φοιτητή Γιώργο Μπάρκα που ήταν ο πρώτος που με μύησε στον εργαστηριακό πάγκο κατά την πρακτική μου άσκηση. Ευχαριστώ θερμά και όλα τα μέλη του εργαστηρίου του Δρ. Παναγιώτη Πολίτη για το φιλικότατο και θερμό κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο από την αρχή: την Δρ. Ισμήνη Ροζάνη, τις υποψήφιες διδάκτορες Τίνα Τσαμπούλα, Άρτεμις Μιχαήλ, Ελπινίκη Νίνου και Ποπιάννα Τσιορτού, την τεχνικό του εργαστηρίου Βαλέρια Καλτεζιώτη, τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Κατερίνα Δημητροπούλου και Μαρία Λαλά και την προπτυχιακή φοιτήτρια Βασιλική Φαράντζου.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την αμέριστη στήριξη τους στην πραγματοποίηση των στόχων μου.

Κύτταρα Νευρικού Συστήματος

Ο νευρικός ιστός, ο οποίος συγκροτεί ολόκληρο το νευρικό σύστημα, αποτελείται από δύο είδη κυττάρων, τους νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα (ή νευρογλοία).

Είναι πλέον σαφές ότι τα νευρογλοιακά κύτταρα βρίσκονται σε ίση αναλογία με τους νευρώνες, αντίθετα με την μέχρι πρότινος επικρατέστερη άποψη ότι καταλαμβάνουν το 90% του νευρικού συστήματος [1]. Επίσης, ο ρόλος τους δεν περιορίζεται απλώς στην υποστήριξη και θρέψη των νευρώνων αλλά είναι αρκετά πολυδιάστατος [2-4].

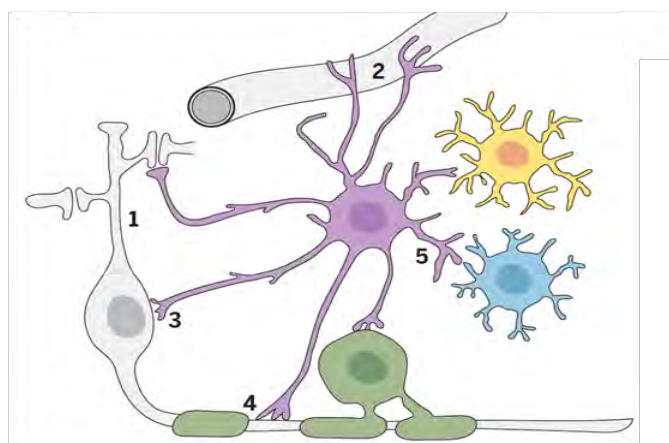
Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), που αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, τα νευρογλοιακά κύτταρα διακρίνονται στις εξής βασικές κατηγορίες: κύτταρα της μικρογλοίας, τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα.

Τα κύτταρα της μικρογλοίας έχουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του ανοσοποιητικού[4] ενώ παράλληλα αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς τύπους κυττάρων του ΚΝΣ και ρυθμίζουν πολλές αναπτυξιακές και λειτουργικές διεργασίες στον αναπτυσσόμενο και ενήλικο εγκέφαλο [5].

Τα ολιγοδενδροκύτταρα σχηματίζουν μυελίνη με την οποία επενδύουν τους άξονες της πλειονότητας των νευρώνων στο ΚΝΣ. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνουν την ηλεκτρική μόνωση των αξόνων, ρυθμίζουν την ταχύτητα της αγωγής του σήματος και υποστηρίζουν τις μεταβολικές διεργασίες του άξονα [6, 7] ενώ παράλληλα διευκολύνουν την ομοιόσταση των ιόντων που απαιτείται για την επίτευξη της αγωγιμότητας [8].

Τα αστροκύτταρα παίρνουν το χαρακτηριστικό όνομά τους από το αντίστοιχο σχήμα «αστεριού» των απολήξεών τους και είναι τα κύρια στηρικτικά κύτταρα του νευρικού ιστού αλλά και μέλος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Τα κύτταρα αυτά συνεισφέρουν τόσο στη νευρωνική επιβίωση και την συναπτογένεση όσο και σε λειτουργίες που αφορούν την στενή τους αλληλεπίδραση με το αγγειακό σύστημα [3].



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των αστροκυττάρων σε σύνδεση με νευρώνες και τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο. Τα αστροκύτταρα (μωβ) έχουν πολλαπλές διακλαδώσεις που καταλήγουν σε διαφορετικά σημεία αλληλεπιδρώντας με συνάψεις, αιμοφόρα αγγεία και άλλα κύτταρα. Τα αστροκύτταρα ρυθμίζουν τη λειτουργία των συνάψεων (1) έχουν απολήξεις που καταλήγουν στο αγγειακό σύστημα του ΚΝΣ και (2) εμφανίζουν αμοιβαία αλληλεπίδραση με νευρώνες. (3) Συνδέονται, επίσης, με κόμβους του Ranvier (4) και αλληλεπιδρούν αμφίδρομα με ολιγοδενδροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα. [9]

Τα αστροκύτταρα έχουν ρόλο ζωτικής σημασίας στο ΚΝΣ καθώς:

1. Συμμετέχουν στον σχηματισμό των συνάψεων και στη λειτουργία τους [10].
 - Εκφράζουν υποδοχείς στους οποίους συνδέεται πληθώρα νευροδιαβιβαστών, που προέρχονται από τους νευρώνες, και στη συνέχεια μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλα αστροκύτταρα επεκτείνουν την εμβέλεια της συναπτικής σηματοδότησης [11-13].
 - Ρυθμίζουν το ιονικό μικροπεριβάλλον και κυρίως τα εξωκυτταρικά επίπεδα των ιόντων K⁺, καθώς η συσσώρευση αυτών μπορεί να επηρεάσει καταστροφικά την ηλεκτρική διέγερση των νευρώνων [14, 15] αλλά και των ιόντων Ca⁺ που επηρεάζουν σημαντικά την νευρωνική δραστηριότητα [16].
2. Ρυθμίζουν το μεταβολισμό των νευροδιαβιβαστών.
Πιο συγκεκριμένα, διαθέτουν ειδικούς μεμβρανικούς μεταφορείς και ενδοκυτταρικά ένζυμα, ώστε να αντλούν και συνεπώς να απομακρύνουν σημαντικά τους νευροδιαβιβαστές, συμπεριλαμβανομένου του γλουταμινικού, από τις συνάψεις [17]. Επιτυγχάνεται, έτσι, ο τερματισμός της μετασυναπτικής δραστηριότητας [16]. Ένα μεγάλο μέρος, μάλιστα, του γλουταμινικού οξέος παρέχεται στους νευρώνες.
3. Συμμετέχουν στις μεταβολικές διεργασίες προμηθεύοντας τους νευρώνες με θρεπτικά από το αίμα, μέσω της σύνδεσής τους με το αγγειακό σύστημα και συλλέγοντας τα νευρωνικά απόβλητα [18].
4. Επάγουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα προς το σχηματισμό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [19].
5. Καθοδηγούν τους νευρώνες κατά την ανάπτυξη [20] και διεγείρουν την αύξηση των νευρώνων με την έκκριση αυξητικών παραγόντων [21].

Καρκίνος - Όγκοι Νευρικού Συστήματος

Ο όρος καρκίνος δεν αναφέρεται σε ένα συγκεκριμένο νόσημα αλλά περιγράφει μια σειρά παθολογικών διαδικασιών με ποικίλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που οδηγεί τελικά στον σχηματισμό μιας κυτταρικής μάζας, το νεόπλασμα. Για να θεωρηθεί, όμως, μια νεοπλασμία ως καρκίνος θα πρέπει απαραίτητα να χαρακτηρίζεται από κακοήθεια. Αυτό σημαίνει ότι θα πρέπει όχι μόνο η αύξηση να είναι ανεξέλεγκτη αλλά και ο όγκος να μπορεί να εισβάλλει στους γειτονικούς ιστούς ή να εξαπλώνεται σε πιο απομακρυσμένες περιοχές, μια διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση. Αντίθετα, υπάρχουν και οι καλοήθεις όγκοι οι οποίοι περιορίζονται στην αρχική τους θέση, δηλαδή δεν είναι διηθητικοί ή μεταστατικοί και χαρακτηρίζονται ως καλοήθεις νεοπλασμίες [22, 23].

Δεν είναι πάντα δυνατό να προσδιορίσουμε την ακριβή αιτία των κακοηθειών αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις η καρκινογένεση οφείλεται σε μεταλλάξεις εξαιτίας χημικών, φυσικών, ή βιολογικών παραγόντων που προκαλούν σημειακές μεταλλάξεις, χρωμοσωμική αστάθεια και επιγενετικές τροποποιήσεις (πχ μεθυλίωση). Αυτές οι γενετικές και επιγενετικές αλλαγές συνεπάγονται με αντίστοιχες μεταβολές στην έκφραση γονιδίων με ποιο βασικές την ενεργοποίηση των κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων και την σε απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων [24].

Οι παραπάνω τροποποιήσεις μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε εμπύρνηο κύτταρο του οργανισμού οδηγώντας στην δημιουργία των κυττάρων του όγκου (νεοπλασματικά ή μετασχηματισμένα κύτταρα) και προσδίδοντάς του χαρακτηριστικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. Τέτοιες ιδιότητες, που σχετίζονται με επιλεκτικά πλεονεκτήματα ανάπτυξης, είναι η αποφυγή της απόπτωσης, η μειωμένη ευαισθησία σε αυξητικούς παράγοντες και σε αντιμωτικά σήματα, η ικανότητα διήθησης και μετάστασης, η ικανότητα αγγειογένεσης και η ύπαρξη ατελείωτου αντιγραφικού δυναμικού[25].

Αστροκυτταρικοί όγκοι

Όταν ένα αστροκύτταρο αποκτήσει τα παραπάνω χαρακτηριστικά, ο καρκινικός όγκος που δημιουργείται ονομάζεται αστροκύττωμα. Ένας αστροκυτταρικός όγκος, μπορεί να είναι πιλοκυτταρικός, διηθητικός, αναπλαστικός και γλοιοβλάστωμα [26].

Η κατηγοριοποίηση αυτή σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (ΠΟΥ) γίνεται με βάση την μορφολογία του, το επίπεδο κακοήθειας (επίπεδο I-IV), τους δείκτες πολλαπλασιασμού, την απόκριση στη θεραπεία και το χρόνο επιβίωσης. Το επίπεδο I αφορά μη κακοήθεις όγκους, το επίπεδο II περιλαμβάνει σχετικά μη κακοήθεις όγκους, το επίπεδο III περιλαμβάνει όγκους χαμηλού επιπέδου κακοήθειας, ενώ το επίπεδο IV αφορά τους πιο κακοήθεις όγκους [27].

ΟΝΟΜΑ	ΣΤΑΔΙΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
Πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα	I	Σε νεαρά άτομα Σπάνια οδηγεί σε θάνατο.
Διηθητικό αστροκύττωμα	II	Σε νεαρούς ενήλικες, Αργή ανάπτυξη
Αναπλαστικό αστροκύττωμα	III	Στην παρεγκεφαλίδα Σε νεαρούς ενήλικες, Γρήγορα ανάπτυξη
Γλοιοβλάστωμα	IV	50% των γλοιωμάτων Υψηλή θνησιμότητα και Διαγιγνώσκονται αργά.

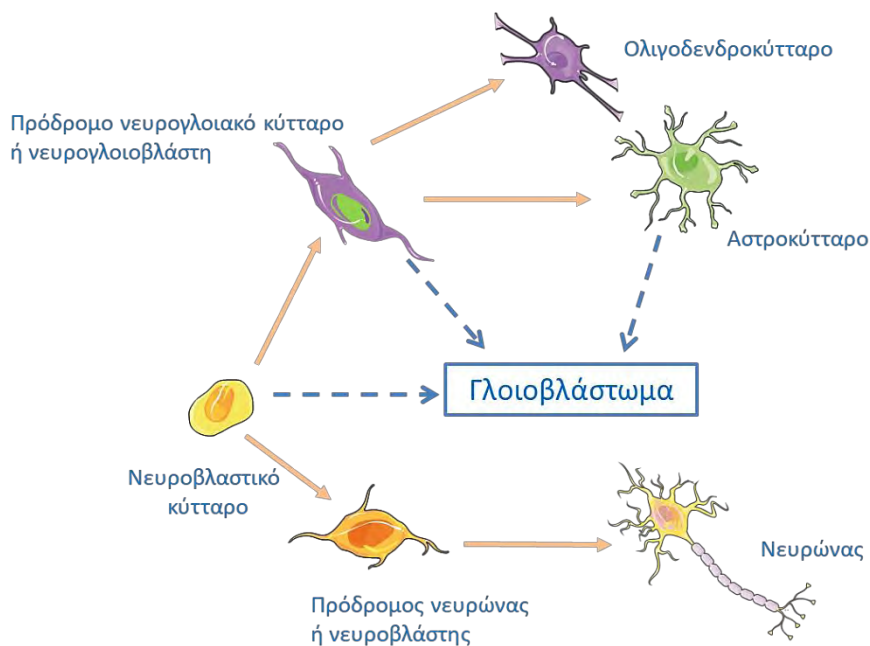
Πίνακας 1 Κατηγοριοποίηση των αστροκυττωμάτων ανάλογα με το στάδιο του καρκινικού όγκου.

Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα

Το Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (Glioblastoma Multiforme-GBM) είναι μια πρωτογενής νεοπλασία του εγκεφάλου που απαρτίζεται από μία γενετικά και φαινοτυπικά ετερογενή ομάδα όγκων και αποτελεί το επίπεδο IV βάσει της παραπάνω κατηγοριοποίησης [28, 29].

Δύο υποκατηγορίες του γλοιοβλαστώματος είναι το πρωτογενές, που αναπτύσσεται de novo και εξελίσσεται γρήγορα (3 μήνες) χωρίς να έχει προηγηθεί άλλη λιγότερο κακοήθης βλάβη, και το δευτερογενές το οποίο προέρχεται από την αργή εξέλιξη (5-10 έτη) χαμηλόβαθμων αστροκυτταρικών νεοπλασμάτων της βαθμίδας II ή III [30]. Το δευτερογενές γλοιοβλάστωμα αντιστοιχεί στο 10% των περιπτώσεων δευτερογενούς νεοπλασσίας και η διάγνωσή του γίνεται σε άτομα με μέσο όρο ηλικίας τα 39 έτη. Το πρωτογενές γλοιοβλάστωμα, απ' την άλλη, αντιπροσωπεύει το 90% αυτών των όγκων και αναπτύσσεται συχνότερα σε ασθενείς με ηλικία άνω των 60 ετών [31, 32]. Παρά τη διαφορετική γενετική βάση και συνεπώς τα διαφορετικά μοριακά μονοπάτια που συμμετέχουν στην ανάπτυξη τους, [28] οι δύο αυτοί υπότυποι του γλοιοβλαστώματος είναι μορφολογικά πανομοιότυποι [33, 34].

Το ΠΓΒ αναπτύσσεται κυρίως στον εγκέφαλο και πιο συγκεκριμένα εμφανίζεται στα ημισφαίρια [35] ή στο εγκεφαλικό στέλεχος [36] και την παρεγκεφαλίδα [37]. Η ικανότητα, επίσης, που διαθέτει ο όγκος να αναπτύσσεται διηθητικά τον καθιστά δύσκολα διακριτό από τον φυσιολογικό ιστό [28, 38]. Οι μεταστάσεις αυτές είναι σπάνιες και πραγματοποιούνται μέσω του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του αίματος [39, 40] στοχεύοντας τον σπλήνα, τα πλευρά, τους πνεύμονες, τους λεμφικούς κόμβους, το συκώτι, τα οστά το πάγκρεας και το λεπτό έντερο [41-46] ενώ λίγες βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν μετάσταση του ΠΓΒ στο δέρμα [1]. Η χαμηλή πιθανότητα μετάστασης του ΠΓΒ θεωρείται ότι οφείλεται στην απουσία λεμφικών αγγείων στον εγκέφαλο [41] και στην ύπαρξη αιματοεγκεφαλικού φραγμού [47]. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός κατά συνέπεια αποτελεί αιτία της γρήγορης ανάπτυξης του όγκου και σύντομης πορείας της ασθένειας.



Εικόνα 2. Προέλευση γλοιοβλαστώματος. Πρόδρομα νευροβλαστικά κύτταρα, με ικανότητα αυτό-ανανέωσης, σχηματίζουν πρόδρομα νευρογλοιακά κύτταρα και πρόδρομους νευρώνες με στόχο να διαφοροποιηθούν τελικά σε αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα και ώριμους νευρώνες αντίστοιχα [48]. Το γλοιοβλάστωμα φαίνεται να προέρχεται τόσο από τα νευροβλαστικά κύτταρα και τους νευρογλιοβλάστες όσο και από τα αστροκύτταρα (διακεκομμένα βέλη).

Μεταβολισμός

Μεταβολισμός και ενέργεια

Ο όρος «μεταβολισμός» αναφέρεται στο σύνολο των χημικών μετασχηματισμών εντός του κυττάρου που οδηγούν στις απαραίτητες για τη ζωή ουσίες και ενέργεια. Η συνεχής τροφοδότηση με ενέργεια μέσω των αλληλένδετων μεταβολικών αντιδράσεων επιτυγχάνει 1) την εκτέλεση της μηχανικού έργου για τη σύσπαση των μυικών ινών και για άλλες κυτταρικές κινήσεις 2) την ενεργό μεταφορά μορίων και ιόντων και 3) την σύνθεση μακρομορίων και άλλων βιολογικών μορίων από πρόδρομες ουσίες. Η ενέργεια αυτή διοχετεύεται στον οργανισμό από την καύση των θρεπτικών ουσιών που προσλαμβάνει μέσω της τροφής.

Τα μεταβολικά μονοπάτια διακρίνονται σε:

- **αναβολικά**, που σχηματίζουν σύνθετα μόρια, όπως πρωτεΐνες και λίπη, από απλούστερες ουσίες με παράλληλη κατανάλωση ενέργειας.
- **καταβολικά**, που διασπούν σύνθετα βιομόρια σε απλούστερα εκλύοντας την απαραίτητη ενέργεια για τις αναβολικές αντιδράσεις του οργανισμού αλλά και για όλες τις υπόλοιπες δραστηριότητές του [49].

ATP: Βασικός τροφοδότης ενέργειας

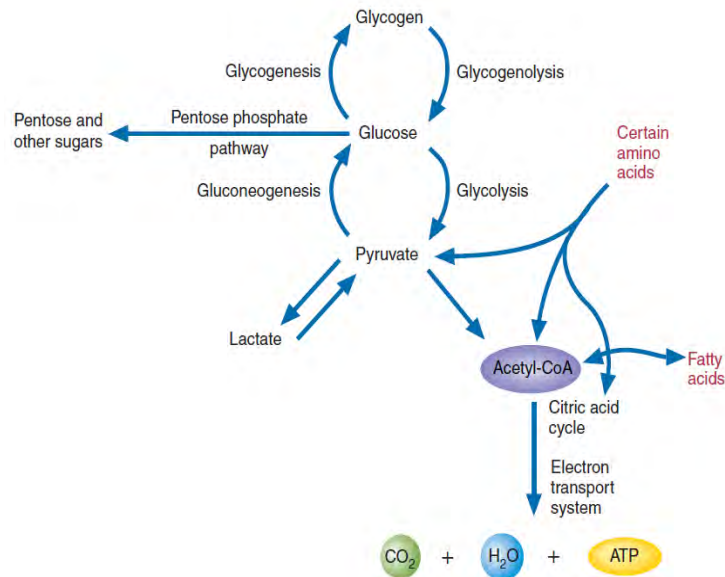
Η ενέργεια που παράγεται από τον μεταβολισμό μετασχηματίζεται σε τριφωσφορική αδενοσίνη ATP. Πρόκειται για ένα νουκλεοτίδιο που δομείται από μια αδενίνη, μια ριβόζη και μια τριφωσφορική ομάδα με δυο υψηλά ενεργειακούς δεσμούς φωσφορικού ανυδρίτη. Όταν η ATP υδρολύεται σε διφωσφορική αδενοσίνη ADP και ορθοφωσφορικό ή σε μονοφωσφορική αδενοσίνη AMP και πυροφωσφορικό P_{Pi} παράγεται μεγάλη ποσότητα ενέργειας. Αντιστρόφως, η ATP επανασχηματίζεται από ADP και P_i και αυτός ο κύκλος ATP-ADP αποτελεί βασικό μέσο ανταλλαγής ενέργειας στα βιολογικά συστήματα. Η ATP παράγεται από την οξείδωση καύσιμων οργανικών μορίων, όπως η γλυκόζη, τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα. Η διαδικασία αυτή εξαγωγής ενέργειας από τις τροφές κατηγοριοποιείται σε 3 στάδια σύμφωνα με τον Hans Krebs. Στο πρώτο, πραγματοποιείται η διάσπαση πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπών σε μικρότερες μονάδες όπως αμινοξέα, σάκχαρα, γλυκερόλη και λιπαρά οξέα αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα μικρότερα αυτά μόρια διασπώνται με τη σειρά τους σε απλούστερες μονάδες, με βασικό ρόλο στον μεταβολισμό, όπως το ακέτυλο-CoA (ακέτυλο – συνένζυμο A). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η παραγωγή του ATP από την οξείδωση της ακετυλικής ομάδας του ακέτυλο-CoA [50].

Μεταβολισμός φυσιολογικών κυττάρων

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, όλα τα κύτταρα προσλαμβάνουν θρεπτικά στοιχεία από την τροφή, τα οποία μέσω των κατάλληλων μεταβολικών μονοπατιών όπως η καύση των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών αποδίδουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση και διατήρηση της ομοιόστασής τους [51].

Μεταβολισμός υδατανθράκων

Στα κύτταρα, η βασική διαδικασία παραγωγής ATP είναι ο μεταβολισμός των υδατανθράκων.



Εικόνα 3. Κύριες Διαδρομές στο Μεταβολισμό των Υδατανθράκων. Η περίσσεια γλυκόζης μετατρέπεται σε γλυκογόνο, μία αποθηκεύσιμη μορφή της γλυκόζης. Όταν απαιτείται η χρήση γλυκόζης ως πηγή ενέργειας ή ως πρόδρομο μόριο σε βιοσυνθετικές διεργασίες, το γλυκογόνο αποικοδομείται με γλυκογονόλυση. Η γλυκόζη μπορεί να μετατραπεί σε 5-φωσφορική ριβόζη (βασικό συστατικό των νουκλεοτιδίων) και NADPH (ένας ισχυρός αναγωγικός παράγοντας) μέσω του PPP. Η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό μέσω της γλυκόλυσης ενώ απουσία οξυγόνου, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γαλακτικό. Παρουσία οξυγόνου το πυροσταφυλικό σχηματίζει ακετυλο-CoA. Σημαντικά ποσά ενέργειας, με τη μορφή ATP, μπορούν να εξαχθούν από ακετυλο-CoA μέσω του κύκλου κιτρικού οξέος και του σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων συνδέεται άρρηκτα με τον μεταβολισμό άλλων θρεπτικών συστατικών. Για παράδειγμα, το ακετύλο-CoA παράγεται επίσης από την διάσπαση λιπαρών οξέων και ορισμένων αμινοξέων. Από την άλλη, όταν το ακετυλο-CoA βρίσκεται σε περίσσεια μετατρέπεται σε FA.

Γλυκόλυση

Η γλυκόζη αποτελεί βασικό καύσιμο για τον άνθρωπο και συγκεκριμένα αποτελεί το μοναδικό καύσιμο που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Σε καταστάσεις, μάλιστα, επάρκειας τροφής αποτελεί το μοναδικό καύσιμο των κυττάρων του εγκεφάλου, ενώ απουσία τροφής ο εγκέφαλος εναλλακτικά έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί και τα κετονοσώματα [52, 53].

Η γλυκολυτική πορεία είναι αναερόβια, πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και αποτελεί μια σειρά αντιδράσεων που μεταβολίζουν ένα μόριο γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού συνοδευόμενη από την παραγωγή δύο μορίων ATP [54].

Αρχικά, η είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα επιτυγχάνεται μέσω μιας ομάδας υδρόφιλων πρωτεϊνών της μεμβράνης που χαρακτηρίζονται ως μεταφορείς γλυκόζης (glucose transporters -GLUTs) [55]. Μετά την είσοδό της στο κυτταρόπλασμα η γλυκόζη αρχικά φωσφορυλιώνεται προς 6-φωσφορική γλυκόζη με την κατανάλωση ενός μορίου ATP μέσω της εξοκινάσης (HK). Στη συνέχεια, η 6-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη (F-6P) από την ισομεράση της φωσφορικής γλυκόζης και μετά σε 1,6 διφωσφορική φρουκτόζη από τη φωσφοφρουκτοκινάση με ταυτόχρονη παραγωγή ενός ακόμα μορίου ATP. Ακολουθεί η διάσπαση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης σε φωσφορική διϋδροξυακετόνη (DHAP) και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (GA-3P) από την αλδολάση. Η GA-3P χρησιμοποιείται στη γλυκόλυση και η DHAP μετατρέπεται συνεχώς σε GA-3P. Η πρώτη μέσω της ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών μετατρέπεται και αυτή σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και έτσι προκύπτουν πλέον 2 μόρια της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Κάθε ένα εκ των οποίων μετατρέπεται σε 1,3-διφωσφογλυκερικό, με τη βοήθεια της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και με την ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός μορίου ATP. Το 3-φωσφογλυκερικό μετατρέπεται με τη σειρά του από την κινάση του φωσφογλυκερικού σε 2-φωσφογλυκερικό, το οποίο στη συνέχεια, με τη δράση της ενολάσης, αφυδατώνεται προς φωσφοενολοπυροσταφυλικό. Τέλος, από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό σχηματίζεται πυροσταφυλικό από την κινάση του πυροσταφυλικού, με ταυτόχρονη παραγωγή ενός μορίου ATP. Συνολικά κατά την γλυκόλυση παράγονται δύο μόρια ATP και έξι μόρια NADH ανά μόριο γλυκόζης. Στους φυσιολογικούς ιστούς, το μεγαλύτερο μέρος του πυροσταφυλικού κατευθύνεται απευθείας στα μιτοχόνδρια. [56]

Το πυροσταφυλικό οξύ, στη συνέχεια, μπορεί: 1) να αναχθεί σε γαλακτικό οξύ (γαλακτική ζύμωση) μέσω της γαλακτικής αφυδρογονάσης ή σε αιθανόλη (αλκοολική ζύμωση), κατά την αναερόβια γλυκόλυση και 2) να μετατραπεί σε ακέτυλο-συνένζυμο Α και να εισέλθει στον κύκλο του Krebs στην περίπτωση της αερόβιας γλυκόλυσης.

Μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών (PPP).

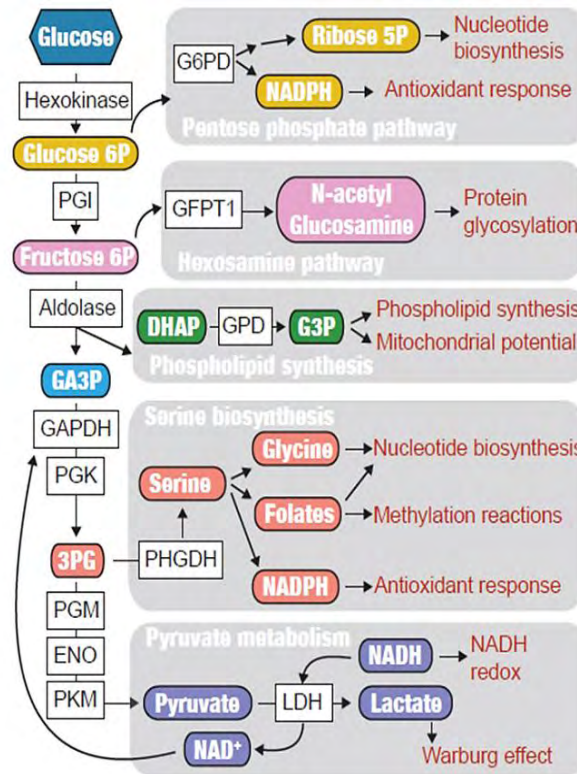
Το μονοπάτι αυτό είναι απαραίτητο για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων και συγκεκριμένα τα πεντανθρακικά σάκχαρα, που παράγονται μέσω του PPP, είναι συστατικά των RNA, DNA, ATP, NADH, FAD και του ακέτυλο-συνενζύμου Α.

Το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι, που εμπλέκεται στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, οδηγεί στην παραγωγή NADP και πεντοζών από την 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία προέρχεται από τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης. Το ένζυμο που καταλύει την είσοδο της G6P στο μονοπάτι των PPP ονομάζεται αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) και ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα του υποστρώματός του και την αναλογία NADPH προς NADP⁺. Στο πρώτο στάδιο του μονοπατιού, η G6P οξειδώνεται προς 6-φωσφογλυκονικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβουλόζη και διοξειδίο του άνθρακα. Ακολουθεί, ισομερίωση της 5-φωσφορικής ριβουλόζης από την ισομεράση της φωσφορικής ριβόζης και τελικά σύνθεση της 5-φωσφορικής ριβόζης, η οποία αποτελεί κύριο πρόδρομο μεταβολίτη για τη βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων και νουκλεοτιδίων. Οι αντιδράσεις αυτές συνοδεύονται από παραγωγή συνολικά δύο μορίων NADPH. Το NADPH είναι επίσης απαραίτητο για αναγωγική βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, ενώ παράλληλα αποτελεί πολύ σημαντικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό, καθώς διατηρεί τα επίπεδα γλουταθειόνης μειωμένα αποτρέποντας την οξειδωτική βλάβη. Για την κάλυψη των κυτταρικών αναγκών, η 5-φωσφορική ριβουλόζη μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και 6-φωσφορική φρουκτόζη απ' όπου εισέρχονται πίσω στο μονοπάτι της γλυκόλυσης [57-59].

Γλυκονεογένεση

Η γλυκονεογένεση αποτελεί τη σύνθεση γλυκόζης από μη υδατανθρακικές πρόδρομες ενώσεις και είναι απαραίτητη σε καταστάσεις μη επαρκούς πρόσληψης τροφής, όπου η ποσότητα της διαθέσιμης γλυκόζης δεν επαρκεί. Τα κύρια μόρια που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη του σκοπού αυτού είναι το γαλακτικό οξύ, που γίνεται διαθέσιμο μέσω του κύκλου του Cori, τα αμινοξέα και η γλυκερόλη [60].

Τα αμινοξέα μπορούν να συμβάλουν στην απόδοση γλυκόζης μέσω της μετατροπής τους σε πυροσταφυλικό ή σε ενδιάμεσες ενώσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος.



Εικόνα 4. Βιοσυνθετικά μονοπάτια που σχετίζονται με γλυκολυτικά ενδιάμεσα. Οι μεταβολίτες που προέρχονται από τη γλυκόζη κατευθύνονται προς διάφορες οδούς για τη σύνθεση αναβολικών ενδιάμεσων, όπως νουκλεοτίδια και φωσφολιπίδια, καθώς και για την τροφοδότηση με μόρια απαραίτητα για αντιοξειδωτική απόκριση ή γλυκοσυλίωση πρωτεϊνών. Η μη φυσιολογική πρόσληψη της γλυκόζης και η ενεργοποίηση της γλυκόλυσης εύνουν τον αναβολισμό, τροφοδοτώντας αυτές τις βιοσυνθετικές οδούς που προέρχονται από γλυκολυτικά ενδιάμεσα.

Μεταβολισμός λιπιδίων

Τα **λιπαρά οξέα** αποτελούν τη βασική δομική μονάδα των λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα, τα λιπαρά οξέα επιτελούν 4 σημαντικούς σκοπούς:

1. αποτελούν βασικά δομικά συστατικά των γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων, τα οποία παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών
2. έχουν τη δυνατότητα σύνδεσης με πρωτεΐνες και με αυτόν τον τρόπο τις μεταφέρουν στη θέση τους πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες.
3. αποτελούν σημαντικά καύσιμα μόρια, καθώς σχηματίζοντας εστέρες με γλυκερόλη, αποθηκεύονται ως τριακυλογλυκερόλες, από τις οποίες είναι δυνατόν κατόπιν να χρησιμοποιηθούν σε περίπτωση ενεργειακής ανάγκης.
4. παράγωγα των λιπαρών οξέων χρησιμεύουν ως ορμόνες και ως ενδοκυττάριοι αγγελιοφόροι [61, 62].

Οξείδωση των λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα (FA) αποικοδομούνται μέσω της β-οξείδωσης, μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια, παρέχοντας ενέργεια και ακετυλο-CoA. Αρκετές είναι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που διευκολύνουν την είσοδο των FA στο κύτταρο συμπεριλαμβανομένων των CD36, των πρωτεϊνών σύνδεσης με λιπαρά οξέα FA (FABP) και ορισμένων πρωτεϊνών μεταφοράς FA [63].

Μόλις βρεθούν στο κύτταρο, η συνθετάση του ακυλ-CoA ενώνει τα FA με τη σουλφυδρυλική ομάδα του συνενζύμου A (CoA) μετατρέποντάς τα σε ενεργοποιημένα λιπαρά οξέα με μια μακριά αλυσίδα ακυλο-CoA (Fatty Acyl-CoA). Προκειμένου, όμως, να μπορέσουν να εισέλθουν στο μιτοχόνδριο θα πρέπει πρώτα να συνδεθούν με την καρνιτίνη. Πιο συγκεκριμένα, η ακυλική ομάδα του κάθε λιπαρού οξέος μεταφέρεται στην υδροξυλική ομάδα της καρνιτίνης μέσω της παλμιτοϋλ-τρανσφεράσης 1 της καρνιτίνης (CPT 1), ώστε να σχηματιστεί τελικά μια ακυλ-καρνιτίνη (Acyl-Carnitine). Αυτή με τη σειρά της μεταφέρεται από μια τρανσλοκάση της ακυλοκαρνιτίνης (CT) στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου, όπου με τη βοήθεια της παλμιτοϋλτρανσφεράσης 2 της καρνιτίνης (CPT2) αποχωρίζεται την ακυλική της ομάδα και επανασυνδέεται με ένα μόριο CoA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον επανασχηματισμό λιπαρών οξέων. Για κάθε μόριο ακυλ-καρνιτίνης, που εισέρχεται στο μιτοχόνδριο η CT εξάγει στο κυτταρόπλασμα ένα μόριο ελεύθερης πια καρνιτίνης που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία. Επίσης, οι CPT1 και CPT2 βρίσκονται στις εξωτερικές και εσωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες, αντίστοιχα [62, 64, 65].

Τα ενεργοποιημένα λιπαρά οξέα, λοιπόν, που προκύπτουν έτσι στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου υφίστανται β-οξείδωσης, μια διαδικασία που επιτελείται σε 4 αντιδράσεις. Το τελικό αποτέλεσμα της β-οξείδωσης είναι ένα μόριο ακετυλο-CoA και ένα μόριο ακυλο-CoA ενώ παράλληλα απελευθερώνονται NADH και FADH₂. Το μόριο ακυλο-CoA υφίσταται πάλι νέο κύκλο οξείδωσης ενώ τα μόρια NADH και FADH₂ εισέρχονται στη συνέχεια στην αναπνευστική αλυσίδα. Το μόριο ακετυλο-CoA με τη σειρά του εισέρχεται στον κύκλο TCA αποδίδοντας ATP [66]. Η β-οξείδωση είναι αλληλένδετη με τη σύνθεση FA καθώς το μηλονυλο-CoA, που προέρχεται από το ACC2, αναστέλλει την πρόσληψη μιτοχονδριακών FA από το CPT1. (Εικόνα 5) Αντίθετα, καρβοξυλίωση του μηλονυλο-CoA μειώνει την αναστολή του CPT1 επάγωντας την αποκαρβοξυλίωση του μηλονυλο-CoA σε ακετυλο-CoA και οδηγώντας έτσι σε αυξημένο ρυθμό οξείδωσης FA [66, 67].

Συνολικά, σε κάθε κύκλο οξείδωσης ενός κορεσμένου λιπαρού οξέος απελευθερώνονται 17 μόρια ATP. Με αυτόν τον τρόπο αποδεικνύεται γιατί τα λιπαρά οξέα θεωρούνται τόσο αποδοτική μορφή αποθηκευμένης ενέργειας.

Σύνθεση λιπαρών οξέων

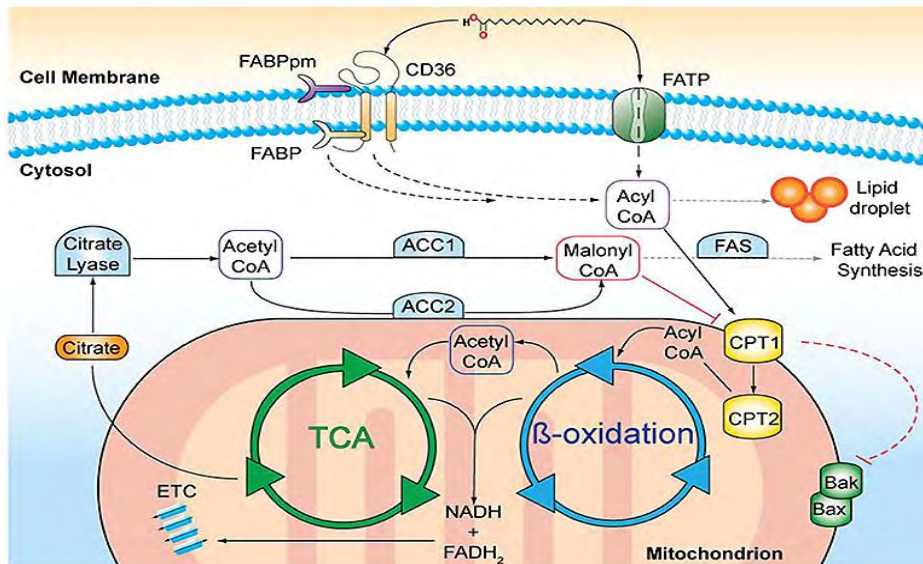
Η σύνθεση των λιπαρών οξέων λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, αντίθετα με την αποικοδόμηση που πραγματοποιείται κυρίως στην μιτοχονδριακή μήτρα. Το ακετυλο-CoA μετατρέπεται εντός του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) σε κιτρικό και στη συνέχεια μεταφέρεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα από τον μεταφορέα του κιτρικού. Στο κυτταρόπλασμα, από το κιτρικό επανασχηματίζεται μέσω της κιτρικής λυάσης του ακετυλο-CoA το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Καθοριστικό στάδιο στο μονοπάτι αυτό είναι η εξαρτώμενη από ATP καρβοξυλίωση του ακετυλο-CoA προς μηλονυλο-CoA με τη δράση της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA (ACC). Τα υπόλοιπα στάδια καταλύονται από ένα σύμπλοκο ενζύμων, τα οποία όλα μαζί ονομάζονται συνθάση των λιπαρών οξέων (FAS), οδηγώντας τελικά στην σύνθεση παλμιτικού οξέος. Το παλμιτικό στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως πρόδρομο μόριο για των σχηματισμό των ποικίλων άλλων λιπαρών οξέων [68] [67].

Το NADPH που απαιτείται για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων εξασφαλίζεται από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και με την αποκαρβοξυλίωση του μηλικού στο κυτταρόπλασμα από ένα μηλικό ένζυμο (ME) [69].

Λιπόλυση (υδρόλυση τριγλυκεριδίων)

Προκειμένου τα λίπη να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμα θα πρέπει να προηγηθεί υδρόλυση των τριακυλογλυκερών (TAG) προς απόδοση ελεύθερων λιπαρών οξέων. Στη διαδικασία αυτή σημαντικό ρόλο παίζουν οι λιποσταγόνες (Lipid Droplets- LDs). Οι λιποσταγόνες αποτελούν λειτουργικά οργανίδια όχι μόνο υπεύθυνα για την αποθήκευση λίπους που θα αξιοποιηθεί για παραγωγή ενέργειας, αλλά επίσης εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της μεμβράνης, στον μεταβολισμό των λιπιδίων, στην κυτταρική σηματοδότηση και στην προστασία έναντι της λιποτοξικότητας [70-73].

Τα οργανίδια αυτά διαθέτουν δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίζονται στην επιφάνεια των σταγονών και συμμετέχουν στη διατήρηση της λειτουργίας, της δομής και της μορφολογίας των LDs. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι περιλιπίνες, οι οποίες καλύπτουν την εξωτερική επιφάνεια της λιποσταγόνας και βρίσκονται σε επαφή με το κυτταρόπλασμα. Έχουν, επίσης, σημαντικό ρόλο, καθώς προστατεύουν τα περιεχόμενα στη λιποσταγόνα λιπίδια από την υδρολυτική δράση των κυτταροπλασματικών λιπασών, όταν υπάρχει επαρκής διαθέσιμη ενέργεια [74, 75].



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολισμού λιπαρών οξέων (FA). Τα μακράς αλυσίδας FA, όπως το παλμιτικό οξύ, μεταφέρονται ενεργά μέσω της κυτταρικής μεμβράνης από μεταφορείς που συνδέονται με τη μεμβράνη, όπως CD36 και πρωτεΐνες μεταφοράς FA (FATP). Οι πρωτεΐνες σύνδεσης FA (FABP) διευκολύνουν τη μεταφορά αυτή. Στο κυττόςολιο, τα FA μπορούν είτε να αποθηκευτούν σε λιποσταγόνες είτε να μετατραπούν σε FA-ακυλο-CoA που μπορεί να εισέλθει στα μιτοχόνδρια μέσω της παλμιτοϋλτρανσφεράσης της καρνιτίνης 1 και 2 (CPT1, CPT2), που βρίσκονται στις εξωτερικές και εσωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες, αντίστοιχα. Η ενεργοποίηση του CPT1 αποτελεί ένα σήμα επιβίωσης και αναστέλλει τον ολιγομερισμό των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, Bak και Bax. Μέσα στα μιτοχόνδρια, τα μόρια FA-ακυλ-CoA διασπώνται μέσω β-οξειδωσης. Τα FADH₂ και NADH απελευθερώνονται και χρησιμοποιούνται ως συμπαραγόντες στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) για την παραγωγή ATP. Το ακετυλ-CoA απελευθερώνεται και εισέρχεται στον κύκλο κιτρικού οξέος (TCA), όπου οξειδώνεται για την παραγωγή κιτρικού. Το κιτρικό μεταφέρεται στο κυττόςολιο όπου μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA. Το μαλονυλ-CoA ειδικότερα όταν παράγεται από ACC2, αναστέλλει την CPT1 και έτσι περιορίζει την β-οξείδωση [67].

Κύκλος Κιτρικού Οξέος και Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

Κύκλος κιτρικού οξέος (TCA)

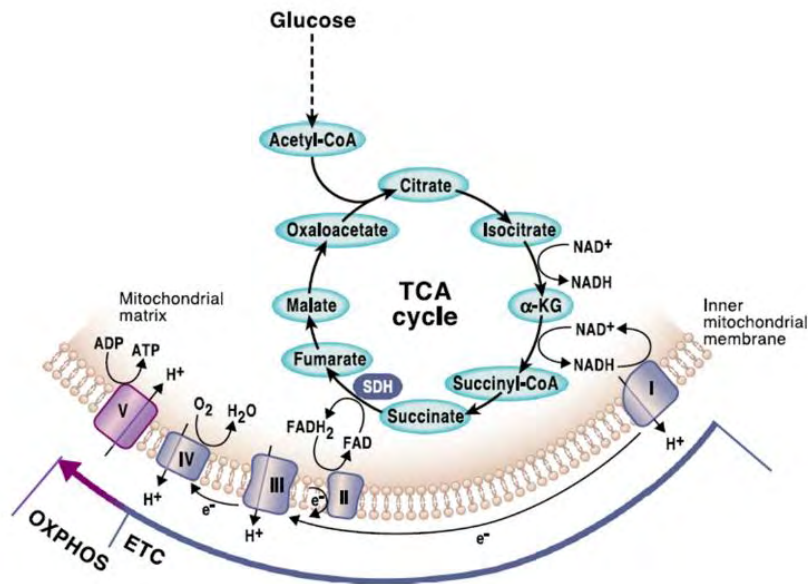
Οι πορείες μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων καταλήγουν όλες σε μια κοινή πορεία που ονομάζεται κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs. Πρόκειται για μια αερόβια διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα μέσα στα μιτοχόνδρια και στην οποία τα περισσότερα καύσιμα μόρια εισέρχονται με τη μορφή του ακετυλο-CoA. Πιο συγκεκριμένα, το πυροσταφυλικό, που σχηματίζεται κατά την αναερόβια γλυκόλυση, μπορεί να εισέλθει στο μιτοχόνδριο μέσω μιας ειδικής πρωτεΐνης-φορέα που βρίσκεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη (the mitochondrial pyruvate carrier-MPC) [76]. Εκεί, το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται σε ακετυλο-CoA από το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH). Εναλλακτικά, το πυροσταφυλικό εντός του μιτοχονδρίου μετατρέπεται σε οξαλοξικό από την καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού (PC). Τα μόρια αυτά, το ακετυλο-CoA και το οξαλοξικό (OAA), εισέρχονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και με τη βοήθεια της κιτρικής συνθάσης σχηματίζουν το κιτρικό. Το απαραίτητο ακετυλο-CoA μπορεί να προέρχεται και από την οξείδωση των λιπαρών οξέων που πραγματοποιείται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Κατά τον κύκλο του Krebs την παραγωγή του κιτρικού ακολουθούν 1) η ισομερείωση του κιτρικού οξέος σε ισοκιτρικό οξύ από την ακονιτάση 2) η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού προς α -κετογλουταρικό από την ισοκιτρική αφυδρογονάση (παραγωγή NADH) 3) η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του α -κετογλουταρικού προς ηλεκτρούλο-CoA από την α -κετογλουταρική αφυδρογονάση (παραγωγή NADH) 4) ο σχηματισμός ηλεκτρικού οξέος από τη συνθετάση του ηλεκτρούλο-CoA (απελευθέρωση GTP) 5) η παραγωγή φουμαρικού οξέος από την ηλεκτρική αφυδρογονάση (παραγωγή FADH₂) 6) η ενυδάτωση του φουμαρικού οξέος σε μηλικό από τη φουμαράση 7) οξείδωση του μηλικού προς σχηματισμό οξαλοξικού οξέος από τη μηλική αφυδρογονάση (παραγωγή NADH) [77, 78].

Κιτρικό στο κυτταρόπλασμα

Το κιτρικό μπορεί να εξέλθει από το μιτοχόνδριο, αντίθετα με το ακετυλο-CoA, και να διασπαστεί πάλι σε ακετυλο-CoA και οξαλοξικό από την κιτρική συνθάση (ACL). Κάτι που είναι πολύ σημαντικό, το ακετυλο-CoA μέσω μίας σειράς αντιδράσεων επάγει τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό αποτελεί πρόδρομο μόριο για την παραγωγή πυροσταφυλικού το οποίο στη συνέχεια μπορεί είτε να επιστρέψει στο μιτοχόνδριο ολοκληρώνοντας έναν ανατροφοδοτικό κύκλο για τον κύκλο του Krebs είτε να αποδώσει γαλακτικό μέσω της LDHA. [78] Το κιτρικό μπορεί επίσης να μετατραπεί σε ισοκιτρικό και μετά σε α -κετογλουταρικό από την ισοκιτρική αφυδρογονάση 1 (IDH1) με ταυτόχρονη παραγωγή NADPH [79].

Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Οξειδωτική φωσφορυλίωση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία παράγεται ATP με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH₂ προς το οξυγόνο μέσω μιας σειράς φορέων. Η οξείδωση του NADH αποδίδει 3 μόρια ATP, ενώ η οξείδωση του FADH₂ αποδίδει 2 μόρια ATP. Πιο συγκεκριμένα, η ηλεκτρική αφυδρογονάση (SDH) που καταλύει τον σχηματισμό του φουμαρικού κατά τον κύκλο του κιτρικού οξέος αποτελεί το μοναδικό ένζυμο που συμμετέχει τόσο στον κύκλο του κιτρικού οξέος όσο και στην αναπνευστική αλυσίδα. Το σύμπλοκο της SDH είναι ένα βασικό αναπνευστικό ένζυμο και το μόνο ένζυμο που συμμετέχει τόσο στον κύκλο του Krebs όσο και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Είναι επομένως κεντρικό ένζυμο για φυσιολογική αερόβια αναπνοή [80].



Εικόνα 6. Ο κύκλος του κιτρικού και η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι αυστηρώς συνδεδεμένα. Μέσω μιας σειράς ενζυματικών αντιδράσεων ο κύκλος TCA παράγει NADH και FADH₂, που απαιτούνται για τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (ETC). Καθώς τα ηλεκτρόνια διοχετεύονται μέσω των συμπλοκών στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, η ETC αλυσίδα δημιουργεί ένα δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP. Αυτή η διαδικασία απαιτεί την παρουσία οξυγόνου και είναι γνωστή ως οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS). Το μιτοχονδριακό σύμπλεγμα I και II στην ETC αναπληρώνουν τα NAD⁺ και FAD, αντίστοιχα, επιτρέποντας τη λειτουργία του οξειδωτικού TCA. Η ηλεκτρική αφυδρογόνωση είναι το μόνο ένζυμο που συμμετέχει τόσο στον κύκλο TCA όσο και στον ETC [80].

Γλουταμινόλυση

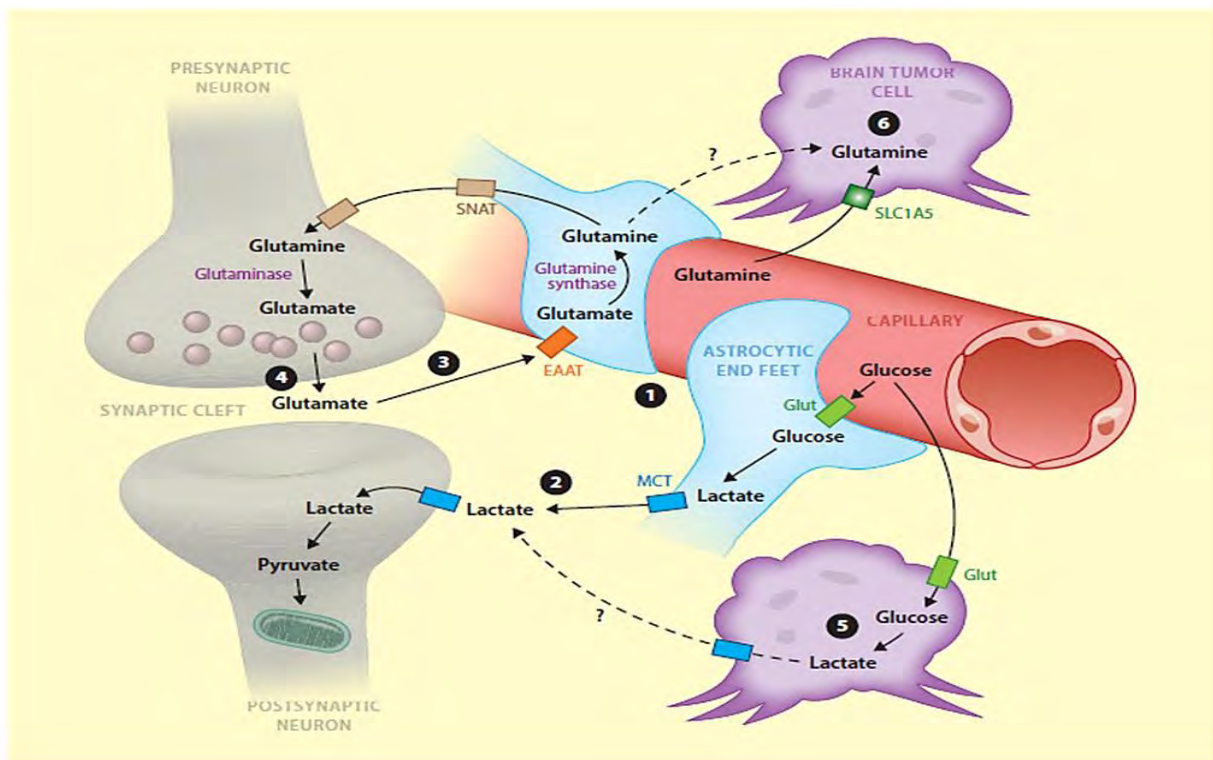
Εκτός από την γλυκόζη, υπάρχουν και αμινοξέα τα οποία μπορούν να τροφοδοτήσουν τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Κατά τη γλουταμινόλυση η γλουταμίνη μέσω της γλουταμινάσης (GLS) απαμινώνεται σε γλουταμινικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό και τροφοδοτεί τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Το γλουταμινικό μπορεί επίσης να μετατραπεί σε ασπαραγινικό οξύ, το οποίο συμβάλλει στη σύνθεση νουκλεοτιδίων. Μεγάλες ποσότητες γλουταμίνης που χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα οδηγούν σε εκκρίσεις αλανίνης και αμμωνίου [81].

Μεταβολισμός γλυκόζης και γλουταμίνης σε φυσιολογικό εγκέφαλο

Η μεταβολική ρύθμιση στον εγκέφαλο είναι πολύπλοκη και ρυθμίζεται αυστηρά. Ο μεταβολισμός των νευρώνων και των γλοιακών κυττάρων συνδέεται στενά. Διαταραχές σε αυτό το σύστημα μπορεί να συμβάλουν στην παθογένεση μιας ποικιλίας ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των ψυχιατρικών διαταραχών, των νευροεκφυλισμών και των διαφόρων τύπων καρκίνου όπως το γλοιοβλάστωμα.

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, που δομείται από ενδοθηλιακά κύτταρα και αστροκυτταρικές απολήξεις, αποτελεί έναν μηχανισμό για την προστασία των νευρωνικών κυττάρων από την άμεση έκθεσή τους σε τοξίνες από κυκλοφορία του αίματος. Οι απολήξεις των αστροκυττάρων καταλαμβάνουν περισσότερο από το 99% της επιφάνειας των τριχοειδών με αποτέλεσμα οι νευρώνες να έχουν περιορισμένη πρόσβαση στην γλυκόζη της κυκλοφορίας του αίματος. Τα αστροκύτταρα, μάλιστα, ελέγχουν την είσοδο της γλυκόζης στον εγκέφαλο μέσω του μεταφορέα γλυκόζης GLUT1 ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνεια των απολήξεών τους.

Έτσι τα αστροκύτταρα αποτελούν εξαιρετικά γλυκολυτικά κύτταρα συγκριτικά με τους νευρώνες, οι οποίοι πραγματοποιούν επίσης γλυκόλυση αλλά σε χαμηλότερους ρυθμούς. [82] Κάτι τέτοιο μπορεί να είναι ωφέλιμο, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της φωσφοφρουκτοκινάσης, τα χαμηλά επίπεδα της οποίας διεγείρουν το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών διατηρώντας έτσι την οξειδοαναγωγική ισορροπία στους νευρώνες [83]. Τα αστροκύτταρα, επίσης, εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα PDH οδηγώντας στη μειωμένη είσοδο πυροσταφυλικού στον κύκλο TCA [84] Εναλλακτικά, το πυροσταφυλικό αξιοποιείται για την παραγωγή γαλακτικού, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να μεταφερθεί στους νευρώνες για την κάλυψη των αναγκών σε βιοενέργεια και την παραγωγή γλουταμινικού [82]. Το γαλακτικό, δηλαδή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν καύσιμο, αντί της γλυκόζης, από τους νευρώνες [85-87].



Εικόνα 7. Σύνδεση μεταβολισμού γλυκόζης και γλουταμινικού μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων. 1) Τα αστροκύτταρα εκφράζουν τους μεταφορείς GLUT και μεταβολίζουν την γλυκόζη σε γαλακτικό 2) το γαλακτικό μπορεί στη συνέχεια να μεταφερθεί μέσω MCTs στους νευρώνες και να εισαχθεί στον κύκλο TCA. 3) Το γλουταμινικό, που απελευθερώνεται στην συναπτική σχισμή, προσλαμβάνεται από τα αστροκύτταρα και μεταβολίζεται σε γλουταμίνη. 4) Η γλουταμίνη μεταφέρεται στους νευρώνες, εξυπηρετώντας έτσι έναν κύκλο ανακύκλωσης γλουταμινικού-γλουταμίνης. 5,6) Τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν επίσης τους μεταφορείς γλυκόζης (GLUT) και τους μεταφορείς γλουταμίνης (ASCT2 / SLC1A5) και άρα προσλαμβάνουν και μεταβολίζουν τα αντίστοιχα θρεπτικά συστατικά [87].

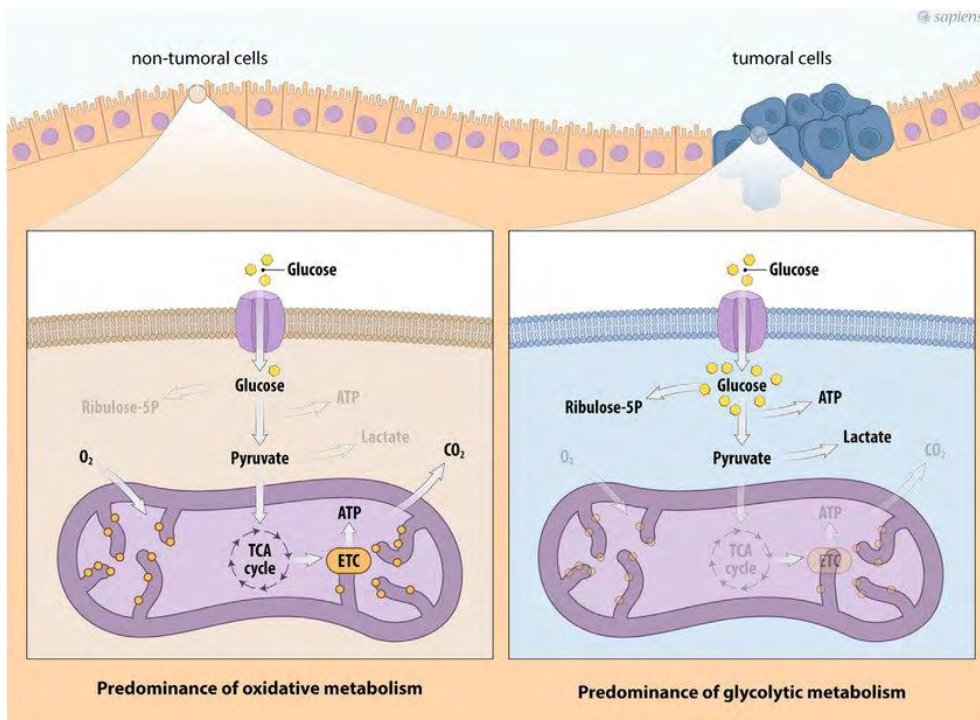
Ο εγκέφαλος, παρόλο που αποτελεί μόνο το 2% του ολικού σωματικού βάρους, χρησιμοποιεί περίπου το 20% του οξυγόνου ολόκληρου του σώματος καθώς και το 60% της γλυκόζης που προσλαμβάνεται καθημερινά. Παράλληλα, ο εγκέφαλος χρειάζεται μια συνεχή τροφοδότηση με γλυκόζη, καθώς στερείται ενεργειακών αποθεμάτων και δεν μπορεί να αποθηκεύσει το γλυκογόνο. Σε κυτταρικό επίπεδο, οι νευρώνες εμφανίζουν υψηλό ρυθμό οξειδωτικού μεταβολισμού συγκριτικά με τα αστροκύτταρα [86] που χαρακτηρίζονται από αυξημένο ρυθμό γλυκόλυσης και παράγουν το απαιτούμενο για την νευρωνική λειτουργία γαλακτικό οξύ. Παραδόξως, η ενεργοποίηση της γλυκόλυσης στους νευρώνες οδηγεί σε υψηλό οξειδωτικό στρες και απόπτωση, υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα αυτά περιορίζονται κυρίως σε οξειδωτική φωσφορυλίωση [86]. Σε μοριακό επίπεδο, η διαφορετική έκφραση μεταβολικών γονιδίων μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων ίσως εξηγεί τις διαφορές αυτές στον ρυθμό της γλυκόλυσης και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [88].

Μεταβολισμός στο γλοιοβλάστωμα

Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός στον καρκίνο χαρακτηρίζεται μεταξύ άλλων από ενισχυμένη γλυκόλυση, PPP, μεταβολισμός λιπιδίων, γλουταμινόλυση και μιτοχονδριακή βιογένεση. Τα μονοπάτια αυτά, όπως αναλύονται στη συνέχεια, τροφοδοτούν τα καρκινικά κύτταρα όχι μόνο με την απαραίτητη ενέργεια αλλά και με τα απαραίτητα πρόδρομα μόρια για την κάλυψη της αυξημένης ανάγκης για βιοσύνθεση, ανάπτυξη, μετάσταση και επιβίωση [89].

Warburg effect και ρύθμιση της γλυκόλυσης

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν για τον μεταβολισμό των φυσιολογικών κυττάρων παρουσία οξυγόνου, κατά την κυτταρική αναπνοή η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό, το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος TCA οδηγώντας τελικά σε παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να παράγεται ελάχιστη ποσότητα γαλακτικού. Παρόλα αυτά στα κύτταρα του όγκου παρατηρείται τόσο αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης όσο και αυξημένη παραγωγή γαλακτικού συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα, ακόμα και παρουσία οξυγόνου [90]. Το φαινόμενο αυτό του μεταβολισμού της γλυκόζης σε γαλακτικό παρά την παρουσία οξυγόνου ονομάζεται φαινόμενο Warburg ή αερόβια γλυκόλυση. Παρόλο που το φαινόμενο αυτό αποδίδει λιγότερα μόρια ATP, συγκριτικά με την πλήρη οξείδωση της γλυκόζης, τα κύτταρα του όγκου επιλέγουν την αερόβια γλυκόλυση. Όμως, το ATP δεν αποτελεί βασικό περιοριστικό παράγοντα για τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα [91]. Αντίθετα, τα κύτταρα που διπλασιάζονται θα πρέπει να διπλασιάσουν εξίσου το σύνολο των συστατικών τους, ώστε να παραχθούν τελικά δύο νέα κύτταρα. Επομένως, η βιομάζα που απαιτείται για αυτό (NADPH, αμινοξέα, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα) [69, 92, 93] καθίσταται ο περιοριστικός παράγοντας για την κυτταρική διαίρεση αλλά και την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες [94, 95].



Εικόνα 8. Το φαινόμενο Warburg σε φυσιολογικά κύτταρα (αριστερά) και σε καρκινικά κύτταρα (δεξιά) [96]

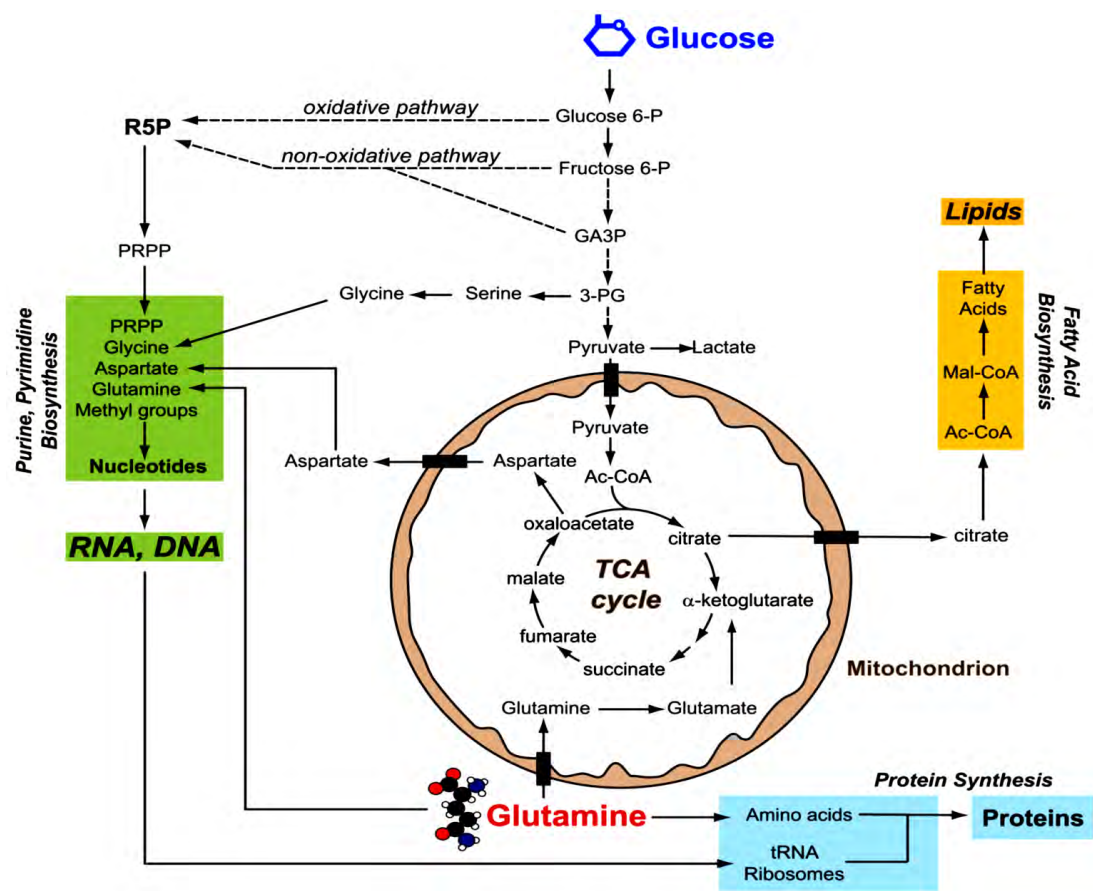
Το γλοιοβλάστωμα, όπως και τα άλλα είδη καρκίνων, χαρακτηρίζεται από το φαινόμενο Warburg και την ογκογονική σηματοδότηση μονοπατιών που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αερόβια γλυκόλυση [97]. Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στον μεταβολισμό του γλοιοβλαστώματος, καθώς προηγούμενες μελέτες οδήγησαν στον εντοπισμό μεταλλάξεων στα μεταβολικά ένζυμα και στις οδούς σηματοδότησης που ρυθμίζουν τον γλυκολυτικό και μιτοχονδριακό μεταβολισμό [98-100]. Επίσης, σημαντική είναι η προέλευση του όγκου, καθώς όπως αναφέρθηκε τα αστροκύτταρα χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη γλυκολυτική ικανότητα συγκριτικά με τους νευρώνες, πράγμα που μπορεί να εξηγήει την προτίμηση του αστροκυττώματος για πολύ υψηλούς γλυκολυτικούς ρυθμούς σε σχέση με τον φυσιολογικό εγκέφαλο [101]. Τέλος, επειδή η κυτταρική ενέργεια αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επιβίωση του καρκίνου, η γνώση για τον μεταβολισμό του γλοιοβλαστώματος είναι σημαντική για υποσχόμενες θεραπευτικές προσεγγίσεις [92, 97, 102-104].

Ένα μεγάλο ποσοστό της απαραίτητης βιομάζας για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εξασφαλίζεται από ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης. Η σύνθεση των νουκλεοτιδίων στηρίζεται στην παράγωγη 5-φωσφορικής ριβόζης κατά το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, ενώ η σύνθεση των λιπιδίων βασίζεται σε διάφορους μεταβολίτες της γλυκόλυσης, όπως η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, το 3-φωσφογλυκερικό οξύ και το ακετυλοσυνένζυμο Α. Τέλος, όπως και υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αμινοξέα σερίνη, γλυκίνη και κυστεΐνη παράγονται από το 3-φωσφογλυκερικό οξύ, ενώ η αλανίνη μπορεί να παραχθεί από το πυροσταφυλικό.

Προκειμένου, τα καρκινικά κύτταρα να αυξήσουν τους γλυκολυτικούς ρυθμούς μειώνουν την εξάρτησή τους από τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Με αυτόν τον τρόπο καταφέρνουν να συσσωρεύουν ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βιομάζας αντί για παραγωγή ενέργειας [91]. Το NADH που καταναλώνεται κατά τη γλυκόλυση αναπληρώνεται μέσω της αυξημένης παραγωγής γαλακτικού από το πυροσταφυλικό. Το γαλακτικό οξύ αποτελεί πηγή εναλλακτικού μεταβολικού καυσίμου, αλλά και ως σηματοδοτικό μόριο συμμετέχει στην προσαρμογή του μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων για την προώθηση της μετάστασης [105].

Συγκεκριμένα, στο γλοιοβλάστωμα ενισχύεται η de novo σύνθεση των λιπαρών οξέων και το μέρος του πυροσταφυλικού, που δεν μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ, σχηματίζει τελικά ακετυλοσυνένζυμο Α μέσω του κιτρικού στο κυτταρόπλασμα [106]. Νέα δεδομένα υποδηλώνουν ότι στοχεύοντας σε ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση των λιπαρών οξέων, που χρησιμοποιούν ενδιάμεσα του TCA, είναι δυνατό να περιοριστεί η ανάπτυξη του όγκου [106, 107]. Για παράδειγμα, η αναστολή της ACL έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει την αύξηση του γλοιοβλαστώματος [108]. Η ακετυλ-CoA καρβοξυλάση ACACA και η συνθάση FASN είναι επίσης δύο ένζυμα που αυξάνονται στο γλοιοβλάστωμα και συμμετέχουν στην καρκινογένεση [109, 110] και μάλιστα η αναστολή τους έχει συσχετιστεί με ενίσχυση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων [110-112]. Η οξειδωση των λιπαρών οξέων είναι εξίσου σημαντική για τα καρκινικά κύτταρα, καθώς έτσι εξασφαλίζουν ενέργεια, NADPH και άλλους απαραίτητους μεταβολίτες [89]. Για αυτό είναι σημαντική και η χαρακτηριστική αύξηση των επιπέδων της CPT1A στο γλοιοβλάστωμα [113].

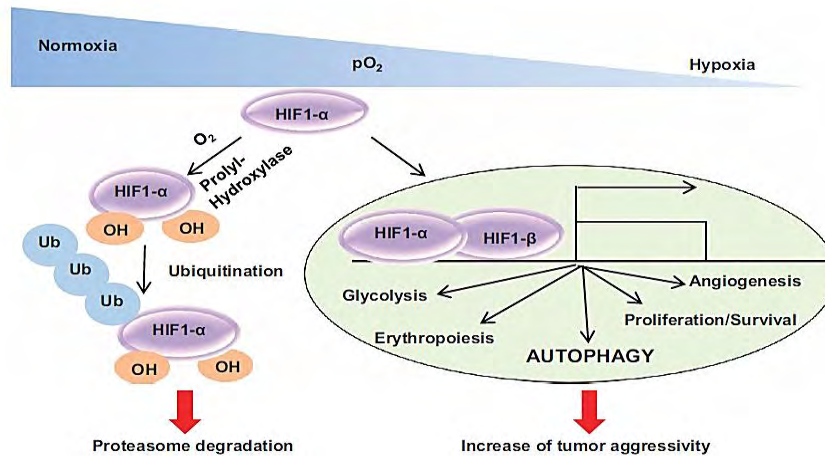
Η έξοδος του κιτρικού από το μιτοχόνδριο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων αφήνει ανεκπλήρωτο τον κύκλο του κιτρικού οξέος στα καρκινικά κύτταρα. Για την αναπλήρωση του κύκλου του TCA επιστρατεύεται η γλουταμινόλυση που αποτελεί την κύρια οδό παραγωγής κιτρικού οξέος στα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται υπό συνθήκες στρες [114]. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση της δραστηριότητας της γλουταμινάσης GLS στο γλοιοβλάστωμα [115, 116] και έχει αποτελέσει επιτυχή πειραματικό θεραπευτικό στόχο [117]. Τα προϊόντα της γλουταμινόλυσης είναι πολύ σημαντικά καθώς τροφοδοτούν τον κύκλο του κιτρικού οξέος στους όγκους. Τα ενδιάμεσα του TCA αξιοποιούνται για την σύνθεση των λιπιδίων, της χοληστερόλης, των αμινοξέων και άλλων απαραίτητων μεταβολιτών. Επιπλέον, τα παραγόμενα μόρια NADH και FADH₂ από τον TCA παρέχουν ηλεκτρόνια για την παραγωγή ATP στα μιτοχόνδρια μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας. Όπως, λοιπόν, συμβαίνει με την γλυκόλυση έτσι και η γλουταμινόλυση τροφοδοτεί τα καρκινικά κύτταρα όχι μόνο με ATP αλλά και με τα απαραίτητα πρόδρομα μόρια για συνεχή βιοσύνθεση και αυξημένο πολλαπλασιασμό [69, 118-122].



Εικόνα 9. Χάρτης μεταβολικών αλλαγών στα καρκινικά κύτταρα[69]

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός κατά το φαινόμενο Warburg ελέγχεται από ογκογονίδια και αναστολείς των όγκων. Ανάμεσα στα ογκογονίδια αυτά περιλαμβάνονται τα Akt, PI3K, Ras, and VHL, τα οποία δρουν μέσω του HIF-1α [123] οδηγώντας στην έκφρασή του ακόμα και σε μη υποξικές συνθήκες.

Υποξία στο γλοιοβλάστωμα



Εικόνα 10. Η υποξία σταθεροποιεί τον HIF1 και προάγει την επιβίωση των κυττάρων. Παρουσία οξυγόνου, ο HIF1α υδροξυλιώνεται και στη συνέχεια αποικοδομείται από το πρωτεασώμα. Ωστόσο, στην υποξία, η απουσία οξυγόνου οδηγεί σε σταθεροποίηση και δημιουργία συμπλόκου του HIF1-α με τον HIF1-β. Το σύμπλοκο HIF1α / HIF1-β είναι ενεργό μεταγραφικά και στοχεύει σε συγκεκριμένα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση [30].

Το μικροπεριβάλλον του εγκεφαλικού όγκου

Το μικροπεριβάλλον του όγκου στον εγκέφαλο επηρεάζει την βιολογία του όγκου σε πολλά επίπεδα. Όπως αναφέρθηκε, η αλληλεπίδραση μεταξύ γλοιακών κυττάρων και νευρώνων είναι κρίσιμη για την φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου. Το πώς τα καρκινικά κύτταρα επηρεάζουν αυτή την αλληλεπίδραση και πώς τελικά τα κύτταρα του όγκου επηρεάζουν τα φυσιολογικά εγκεφαλικά κύτταρα σε μεταβολικό επίπεδο δεν είναι πλήρως κατανοητό ακόμα. Επιπλέον, οι όγκοι του εγκεφάλου εμφανίζουν ετερογένεια εξαιτίας του μεταβολικού στρες που προκύπτει από διαφορές στη διαθεσιμότητα θρεπτικών και οξυγόνου. Για παράδειγμα, στο γλοιοβλάστωμα, σε υποξικές περιοχές του όγκου, εντοπίζονται διάφορες αλλαγές στα μεταβολικά μονοπάτια [87].

HIF-1α στο γλοιοβλάστωμα

Οι εγκεφαλικοί όγκοι γενικά χαρακτηρίζονται από την αυξημένη πυκνότητα του όγκου και την διαταραγμένη αγγειογένεση που οδηγεί σε δυσχερή διάχυση και υποξία (παρουσία λιγότερου από 2% του φυσιολογικού οξυγόνου). Η υποξία αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του γλοιοβλαστώματος και επηρεάζει την εξέλιξη και την αντίσταση του όγκου στη θεραπεία. Τα υποξικά καρκινικά κύτταρα του όγκου προκειμένου να επιβιώσουν προσαρμόζονται με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIFs [124]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIFs σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από HIF-1α και HIF-1β. Παρουσία οξυγόνου, ο HIF-1α υφίσταται αποικοδόμηση από το πρωτεασώμα (χρόνος ημιζωής <5 λεπτά) και έτσι δεν συγκροτείται το λειτουργικό σύμπλοκο του HIF-1. [125-127] Σε συνθήκες υποξίας, αντίθετα, αναστέλλεται η αποικοδόμηση του HIF-1α με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση και την είσοδό του στον πυρήνα. Ο HIF-1α στη συνέχεια συνδέεται με HIF1-β και μεσολαβεί στη μεταγραφή γονιδίων. [128, 129] Αν και ο HIF-1α ενεργοποιείται κυρίως ως απόκριση στην υποξία, συχνά σε καρκινικά κύτταρα ενεργοποιείται ακόμη και υπό φυσιολογικές

συνθήκες μέσω ενεργοποίησης ογκογονιδίων και / ή αναστολής ογκοκατασταλτικών γονιδίων [130, 131]. Επιπλέον, ο HIF-1α ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε σημαντικά γεγονότα καρκινογένεσης, συμπεριλαμβανομένων την κυτταρική αθανασία, την αγγειογένεση, την απόπτωση και την μετάσταση [132].

Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός έχει πλέον αναγνωριστεί ως βασικό χαρακτηριστικό του γλοιοβλαστώματος (GBM). Σε αυτή τη διαδικασία, ο HIF-1 παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετάβαση του ενεργειακού μεταβολισμού από την OXPHOS στην αερόβια γλυκόλυση, ιδιαίτερα υπό υποξικές συνθήκες, ώστε να παρέχει στα κύτταρα του GBM ένα πλεονέκτημα επιβίωσης. Ο HIF-1α αποτελεί επομένως μεταγραφικό παράγοντα-κλειδί που ρυθμίζει την ενεργοποίηση μιας μεγάλης ομάδας γονιδίων, πολλά εκ των οποίων ενισχύουν την επιβίωση και τον μεταβολισμό των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος. Σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως και στο GBM, η κακή πρόγνωση σχετίζεται με διατάραξη στα επίπεδα και τη δραστηριότητα του HIF-1. Ως εκ τούτου, ο HIF-1 και οι σχετιζόμενες μεταβολικές οδοί μπορεί να είναι πολλά υποσχόμενοι θεραπευτικοί στόχοι για το γλοιοβλάστωμα [133].

Επαναπρογραμματισμός γλυκόλυσης

Η υποξία, βασικό χαρακτηριστικό των όγκων του γλοιοβλαστώματος, οδηγεί στην αυξημένη ενεργοποίηση του HIF-1α και κατ' επέκταση στον επαναπρογραμματισμό διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών. Τα γονιδια-στόχοι του HIF-1α εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλυκόζης [134] και συγκεκριμένα κωδικοποιούν για όλα τα γλυκολυτικά ένζυμα εκτός από τη φωσφογλυκερική μουτάση (PGM) [135, 136].

Στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος, ο HIF-1α επάγει την υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τους μεταφορείς γλυκόζης GLUT1 και GLUT3, οι οποίοι αποτελούν τις δύο κύριες ισομορφές στον εγκέφαλο [132, 137-139]. Οι αναστολές των GLUT αποτελούν μια θεραπευτική προσέγγιση για τύπους καρκίνου στους οποίους υπερεκφράζονται οι μεταφορείς [140-142], όπου προκαλούν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Όσον αφορά όμως τον εγκέφαλο, όπου η γλυκόζη δεν μπορεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό χωρίς την βοήθεια των πρωτεϊνών της οικογένειας GLUT, η στόχευση τους για θεραπεία είναι δύσκολη. Για το λόγο αυτό γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης θεραπευτικών μορίων για το γλοιοβλάστωμα που χρησιμοποιούν το σύστημα των GLUT και όχι αναστολές τους [140, 143].

Η σταθεροποίηση του HIF-1α επάγει, επίσης, την έκφραση της HK2, απαραίτητη για την επαγωγή της αερόβιας γλυκόλυσης και την προσαρμογή στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Στον φυσιολογικό εγκέφαλο εκφράζεται κυρίως η HK1 ενώ η HK2 αποτελεί την κύρια ισομορφή της εξοκινάσης στο γλοιοβλάστωμα. Η *in vitro* αναστολή της HK2, χωρίς αυτή να επηρεάζει την έκφραση της HK1, εμποδίζει την αερόβια γλυκόλυση, αυξάνει την φυσιολογική οξειδωτική αναπνοή και επάγει την απόπτωση διευκολύνοντας την επιβίωση σε GB μοντέλα xenograft [103, 144].

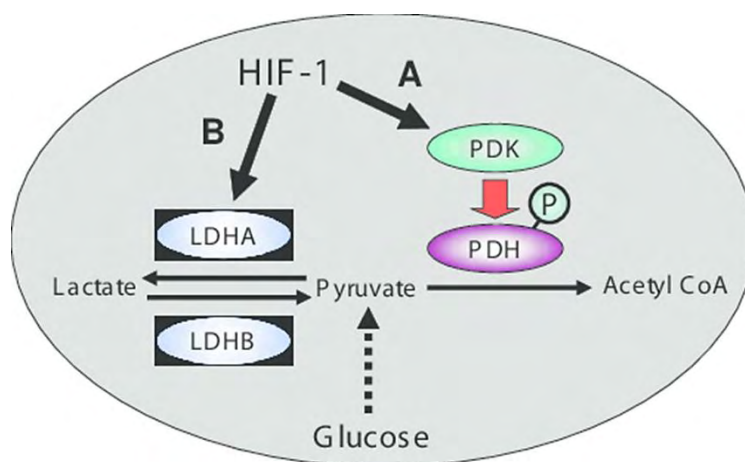
Η PFK1 είναι ένα ακόμα γλυκολυτικό ένζυμο που αυξάνεται στα καρκινικά κύτταρα. Ένας αλλοστερικός ενεργοποιητής της PFK1 είναι η 2,6- διφωσφορική φρουκτόζη (F2,6BP). Φυσιολογικά, η δραστηριότητα της PFK1 παρεμποδίζεται από το ATP, αλλά η F2,6BP υπερνικά αυτή την αναστολή και ενισχύει την γλυκολυτική πορεία, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να διατηρούν υψηλούς ρυθμούς γλυκόζης παρά την παρουσία ATP. Μια ισομορφή της PFKFB, το ισοένζυμο 3 (PFKFB3), αποδείχτηκε πρόσφατα ότι προωθεί τον πολλαπλασιασμό [145, 146]. Η έκφραση του γονιδίου της PFKFB3 ρυθμίζεται από τον HIF-1α [147, 148].

Η κινάση του πυροσταφυλικού PK είναι ένα ακόμα γλυκολυτικό ένζυμο του οποίου τα επίπεδα αυξάνονται στο γλοιοβλάστωμα. [149-151] Συγκεκριμένα, η ισομορφή PKM1 εντοπίζεται αποκλειστικά σε φυσιολογικούς ιστούς, ενώ τα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος φαίνεται να χαρακτηρίζονται από την ισομορφή PKM2 [152-154]. Ο HIF-1α επάγει την μεταγραφή της PKM2 προκειμένου να αυξήσει την παραγωγή ATP κατά τη γλυκόλυση [115, 155].

Τόσο η υποξία όσο και η αυξημένη αερόβια γλυκόλυση οδηγούν στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου. Η εξαγωγή γαλακτικού, που καθιστά το περιβάλλον του όγκου πιο όξινο, προκαλεί τοπική φλεγμονώδη απόκριση που προσελκύει ανοσοκύτταρα συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων. Τα μακροφάγα, με τη σειρά τους, εκκρίνουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. 47,48 Επιπλέον, το γαλακτικό στο μικροπεριβάλλον μπορεί να επηρεάσει την ανοσοαπόκριση [156-158] ενώ παράλληλα λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο, το οποίο μετά την μεταφορά του μέσω MCT1, επάγει την μετανάστευση και αγγειογένεση όγκου [159-161].

Ο HIF-1α περιορίζει επίσης τον μιτοχondριακό οξειδωτικό μεταβολισμό και καταστέλλει την είσοδο του πυροσταφυλικού στον κύκλο τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA). Αυτό οφείλεται κυρίως στην ενεργοποίηση της κινάσης 1 της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDK1) η οποία καταστέλλει την πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH). Μέσω της ενεργοποίησης της PDK1, λοιπόν, ο HIF-1α προκαλεί μείωση της οξειδωσης του πυροσταφυλικού στον TCA και συσσώρευση γαλακτικού στο κυττοσόλιο [162].

Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH) καταλύει την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλ-CoA εντός των μιτοχondρίων συνδέοντας έτσι το γλυκολυτικό μονοπάτι με τον κύκλο του Krebs και την οξειδωτική φωσφορυλίωση Η PDK1 εμποδίζει την δράση της PDH και συνεπώς την είσοδο του πυροσταφυλικού στο μιτοχόνδριο [129, 162] ενώ παράλληλα ευνοεί την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό. Αντίθετα, η αποφωσφορυλίωση της PDH από φωσφατάση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης PDP καταλύει την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλ-CoA εντός του μιτοχondρίου τροφοδοτώντας τον κύκλο του Krebs.

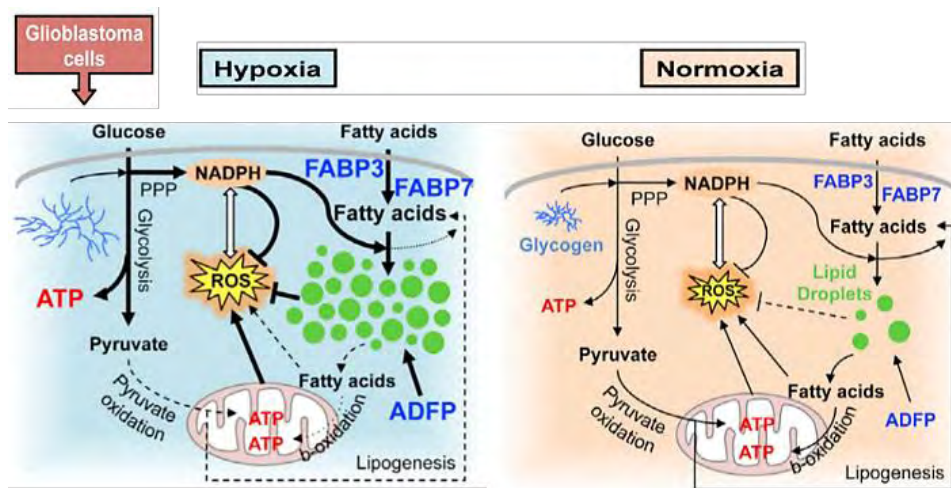


Εικόνα 11. Εκτροπή της ροής της γλυκόζης από τον οξειδωτικό μεταβολισμό προς την αερόβια γλυκόλυση. (Α) Ο HIF-1 επάγει την αναστολή της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH) μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάσης της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDK). (Β) HIF-1 διέγερση της έκφρασης της υπομονάδας Α της γαλακτικής αφυδρογονάσης [163].

Η χαρακτηριστική, αυτή, αύξηση του γαλακτικού στο γλοιοβλάστωμα οφείλεται και στην επαγόμενη αύξηση της έκφρασης της LDHA από τον HIF-1α.[164] Η υπερέκφραση της LDHA, δηλαδή της Α υπομονάδας της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, έχει συσχετιστεί με κακή διάγνωση, σε τέτοιο βαθμό ώστε η αλλαγή στα επίπεδα της στον ορό και στο πλάσμα να αποτελούν πιθανό βιοδείκτη για διάφορους τύπους καρκίνου. [165, 166]. Αποτελεί, επιπλέον, πιθανό θεραπευτικό στόχο καθώς η καταστολή της LDHA καθιστά τα κύτταρα περισσότερο οξειδωτικά και επιβραδύνει τον πολλαπλασιασμό. [167] Γενικά, η LDHA θεωρείται ότι είναι ένας σημαντικός μοριακός μεσολαβητής του φαινομένου Warburg και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του γλυκολυτικού φαινοτύπου του καρκίνου.[168]

Πρόσληψη των λιπαρών οξέων και αποθήκευση των λιπιδίων

Υπό συνθήκες υποξίας στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος ο HIF-1α επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών σύνδεσης με λιπαρά οξέα FABP3 και FABP7 αλλά και της περιλιπίνης PLIN2 (PLIN2, adipophilin ADRP), η οποία είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των μεμβρανών στις λιποσταγόνες. Η αύξηση των επιπέδων των FABP3, FABP7 και PLIN2 από τον HIF-1α οδηγεί σε συσσώρευση των LDs [169], αλλά και σε γενικότερη αύξηση του μεταβολισμού των λιπιδίων [170-172]. Η αποθήκευση των LD είναι απαραίτητη σε υποξικές συνθήκες καθώς παρατηρείται ότι 1) τα αυξημένα επίπεδα των LDs προστατεύουν από την τοξικότητα των ROS και 2) τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι σημαντικά για την παραγωγή ATP μέσω της β-οξειδωσης. Τα καρκινικά κύτταρα, δηλαδή, χρησιμοποιούν τα TGs που περιέχονται στις LDs προκειμένου να παράξουν ελεύθερα λιπαρά οξέα όταν υπάρχει αυξημένη ανάγκη για σύνθεση νέων μεμβρανών ή παραγωγή ATP μέσω της β-οξειδωσης. Αντίστοιχα, έρευνες δείχνουν ότι η αναστολή της έκφρασης των FABP3, FABP7 και PLIN2 εμποδίζει τον σχηματισμό των LD στην υποξία καθιστώντας τα γονίδια αυτά θεραπευτικούς στόχους [71, 173-175].



Εικόνα 12. Η πρόσληψη των λιπαρών οξέων και αποθήκευση των λιπιδίων σε συνθήκες υποξίας στο γλοιοβλάστωμα (αριστερά) και υπό φυσιολογικές συνθήκες (δεξιά) [174] (τροποποιημένη εικόνα)

Η σύνθεση των λιπαρών οξέων φαίνεται επίσης να συνεχίζεται απουσία οξυγόνου και θρεπτικών [176], μία διαδικασία που ενεργοποιείται μέσω σηματοδότησης από τον HIF-1α. Ο HIF-1α, δηλαδή, δεν επάγει μόνο την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως οι FABP, PLIN2 και FASN, υπεύθυνες για την πρόσληψη και σύνθεση λιπαρών οξέων αλλά ελέγχει και την διαδικασία οξείδωσης των λιπαρών οξέων (FAO), ρυθμίζοντας την έκφραση της CPT1 [177] [178].

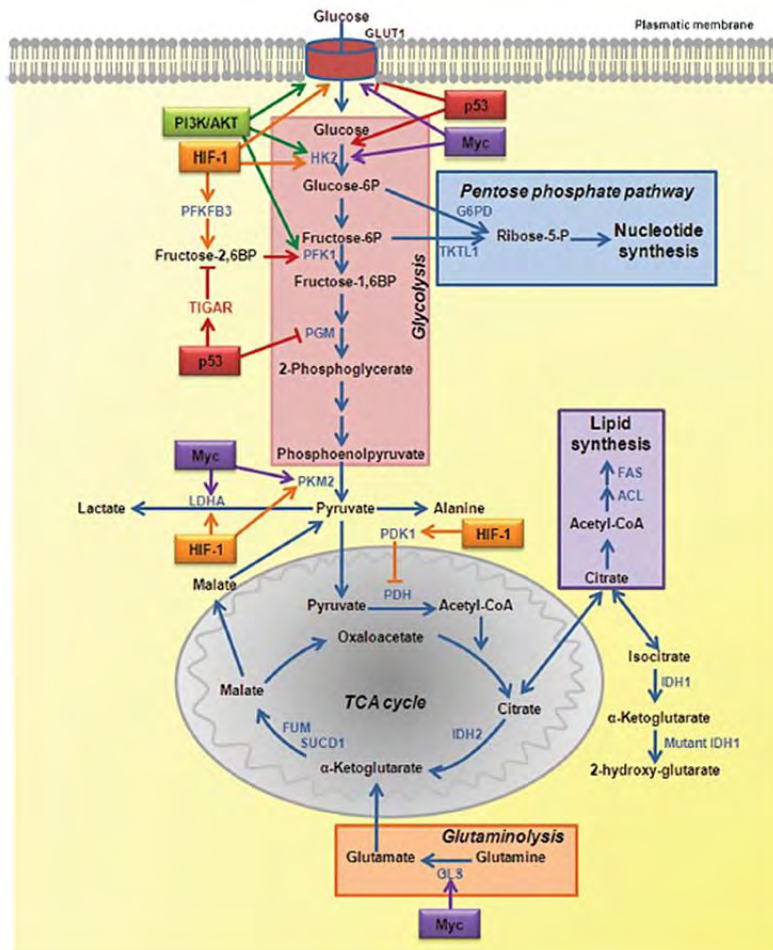
Γλουταμινόλυση

Ένα ακόμα μονοπάτι που επαναπρογραμματίζεται σε συνθήκες υποξίας είναι ο μεταβολισμός της γλουταμίνης. Όσον αφορά τη γλουταμινόλυση, ο HIF-1α ενισχύει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη γλουταμινάση GLS [117, 179, 180] Ενώ η ακριβής συμβολή της δραστηριότητας HIF στη σύνθεση λιπιδίων, που εξαρτώνται από τη γλουταμίνη, είναι ακόμα ασαφής, έχει διαπιστωθεί ότι η σηματοδότηση μέσω HIF-1 είναι ικανή να διεγείρει αυτόν το μεταβολικό επαναπρογραμματισμό [181, 182].

Σηματοδοτική ρύθμιση του καρκινικού μεταβολισμού

Οι επιπτώσεις των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στο μεταβολικό επαναπρογραμματισμό του καρκίνου αποτελούν ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του καρκίνου. Οι μεταβολικές αλλαγές στον καρκίνο είναι τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης του ογκογονιδίων και των μεταλλαγμένων μεταβολικών ενζύμων. Ο επαναπρογραμματισμός του καρκίνου προάγει την ογκογένεση με τη διευκόλυνση και την ταχεία διάδοση, επιβίωση, εισβολή, μετάσταση, αντίσταση στις θεραπείες και άλλες κεντρικές κυτταρικές διαδικασίες ογκογένεσης.

Από την άλλη πλευρά, καθώς προχωρά η ογκογένεση, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν περισσότερες μεταλλάξεις και αλλαγές που ενισχύουν περαιτέρω τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό και με τη σειρά τους επιταχύνουν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του όγκου. Οι καταστολείς του όγκου, όπως τα p53 και AMPK, ασκούν κατασταλτική ρύθμιση για τις μεταβολικές μεταβολές του καρκίνου, μπλοκάροντας τη λειτουργία, την ενεργοποίηση και την έκφραση των βασικών καρκινικών μεταβολικών γονιδίων όπως αυτά που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ογκογονίδια όπως το c-Myc, HIF-1α, Ras και Akt είναι σημαντικοί παράγοντες που ενισχύουν μεταβολές στη διαδικασία παραγωγής της βιοενέργειας του όγκου ρυθμίζοντας την έκφραση ή ενεργοποίηση βασικών μεταβολικών ενζύμων όπως HK2, GLS1, LDHA, μεταξύ άλλων. Η ισορροπία μεταξύ ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ογκογονιδίων έχει καθοριστική επίδραση στην κατάσταση του μεταβολισμού του καρκίνου.



Εικόνα 13. Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός στα καρκινικά κύτταρα και η ρύθμιση του από σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα ένζυμα-κλειδιά της γλυκόλυσης, του TCA, του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών, της γλουταμινολύσης, της βιοσύνθεσης νουκλεοτιδίων και λιπιδίων αποτελούν τους στόχους των ρυθμιστικών αυτών γονιδίων. [56]

Πυρηνικός Υποδοχέας NR5A2

Πυρηνικοί Υποδοχείς

Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούν κάποιους από τους πιο βασικούς μεταγραφικούς ρυθμιστές στα ζώα. Μεταξύ άλλων συμμετέχουν στη ρύθμιση σημαντικών διεργασιών του οργανισμού, όπως η ομοιοστάση, η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη και το μεταβολισμό [183]. Συγκεκριμένα, οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τον προσδέτη και κατά συνέπεια συνδέουν τα σηματοδοτικά μόρια που ελέγχουν αυτές τις διαδικασίες με τις επαγόμενες μεταγραφικές αποκρίσεις. Μέχρι στιγμής, έχει αναγνωριστεί ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών υποδοχέων μέσω της ομοιότητας ακολουθίας με γνωστούς υποδοχείς, αλλά δεν έχουν εντοπιστεί ακόμα οι φυσικοί προσδέτες τους, και για αυτό χαρακτηρίζονται ως «ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς». Η αναζήτηση των προσδετών των ορφανών υποδοχέων, καθώς και η ταυτοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που αυτοί ενεργοποιούν έχουν πλέον μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον [184, 185].

Ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας NR5A2 και οι λειτουργίες του

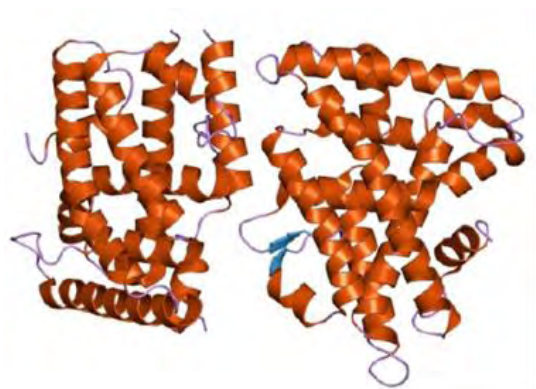
Ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας NR5A2 ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων 5A, η οποία περιλαμβάνει 4 αναγνωρισμένα μέλη (NR5A1-NR5A4). Στον άνθρωπο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον NR5A2 αποτελείται από οκτώ εξόνια και καλύπτει περίπου 150 κιλοβάσεις (kb) του χρωμοσώματος 1 στον γενετικό τόπο 1q32.11. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον τρεις ισόμορφες. Στον ποντικό, ο NR5A2 εδράζεται στην περιοχή E4 του χρωμοσώματος 1. Διαθέτει τρεις θέσεις πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες GATA και ένα μοτίβο που αναγνωρίζει τις homeodomain (ομοιοπεριοχή πρωτεϊνών) πρωτεΐνες Nkx που είναι συντηρημένα στον υποκινητή του NR5A2 από το ποντίκι μέχρι τον άνθρωπο [186]. Ομόλογα του NR5A2 προσδιορίστηκαν αργότερα σε άλλα είδη, όπως στον επίμου, στο κοτόπουλο, στο άλογο, στο zebrafish, στο βάτραχο και στον άνθρωπο. Το πιο κοντινό ομόλογό του στα θηλαστικά είναι ο SF-1 (steroidogenic factor-1; NR5A1), ένας υποδοχέας ο οποίος εκφράζεται κυρίως σε στεροειδογενικούς ιστούς και σε ιστούς του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (HPA axis). Πρόσφατες κρυσταλλικές αναλύσεις ταυτοποίησαν τα φωσφολιπίδια σαν πιθανούς προσδέτες των NR5A2 και SF-1 [187]. Στη βιβλιογραφία, ο NR5A2 αναφέρεται και ως LRH-1 (liver receptor homologue 1), CPF, FTF, FTZ-F1, hB1F. Ο NR5A2 συνδέεται με το DNA ως μονομερές στην αλληλουχία YCAAGG YCR (όπου Y οποιαδήποτε πυριμιδίνη και όπου R οποιαδήποτε πουρίνη) [186, 188-190]. Η περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (Ligand Binding Domain-LBD) των περισσότερων πυρηνικών υποδοχέων αποτελείται από δώδεκα περιοχές α-έλικα αναδιπλωμένες σε ένα τριεπίπεδο ελικοειδές «σάντουιτς» με μια συντηρημένη β-στροφή [186] αλλά και μια θήκη στην οποία προσδένει κάποιος συνδέτης. Η σύνδεση αυτή μπορεί να προκαλέσει κάποια αναστρέψιμη διαμορφωτική αλλαγή [186, 190].

Ο NR5A2 έχει προς το παρόν εντοπιστεί σε ιστούς που προέρχονται από το ενδόδερμα, όπως το ήπαρ, το πάγκρεας και το έντερο. Για το λόγο αυτό, κατηγοριοποιείται ως ένας εντερο-ηπατικός πυρηνικός υποδοχέας. Εντοπίζεται ακόμα στις ωοθήκες, στα προλιποκύτταρα και σε χαμηλότερα επίπεδα στον πλακούντα και είναι απαραίτητος για την εγκυμοσύνη. Χαρακτηριστική είναι και η έκφρασή του στο ΚΝΣ των ενήλικων θηλαστικών [191] και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού [192], καθώς είναι απαραίτητος για την εμβρυογένεση. Ο NR5A2 έχει σημαντικό ρόλο και στην ανάπτυξη. Μελέτες αποδεικνύουν ότι ο NR5A2 μπορεί να αντικαταστήσει τον Oct4 στον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων ποντικού σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (τεχνητά πολυδύναμα βλαστοκύτταρα - iPS cells) [193]. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, καθίσταται απαραίτητος για τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων στο στάδιο του επιβλάστη [194], όπου συνεντοπίζεται με τους ρυθμιστές Nanog και Sox2 [195].

Ένας ακόμα σημαντικός ρόλος του NR5A2 είναι η συμβολή του στη στεροειδογένεση και στη ρύθμιση της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Πιο συγκεκριμένα, ρυθμίζει τη βιοσύνθεση, την κυκλοφορία των χολικών οξέων και την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης [186]. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την απομάκρυνση της χοληστερόλης από το σώμα μέσω της αποικοδόμησης σε χολικά οξέα λαμβάνει χώρα στο ήπαρ και καταλύεται από το ένζυμο υδροξυλάση-7α της χοληστερόλης (CYP7A1), το οποίο αποτελεί μέλος της οικογένειας του κυτοχρώματος P450. Τα χολικά οξέα αποτελούν τα τελικά προϊόντα του μονοπατιού και ρυθμίζουν τη σύνθεσή τους μέσω καταστολής της μεταγραφής του συγκεκριμένου γονιδίου. Για το λόγο αυτό ο NR5A2 αποτελεί έναν ρυθμιστή-κλειδί για την έκφραση διαφόρων λειτουργικών γονιδίων των ηπατοκυττάρων, όπως του CYP7A1 γονιδίου και του κυτοχρώματος P450 [196, 197].

Τελευταίες έρευνες έδειξαν ότι η χρήση ειδικών μορίων που δρουν ως αγωνιστές του NR5A2, μειώνουν τα τριγλυκερίδια και τη γλυκόζη του ορού στο αίμα, ενώ παράλληλα βελτιώνουν την ομοιόσταση των χολικών οξέων. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο yeast two hybrid, έχει αποδειχθεί ότι ο NR5A2 αλληλεπιδρά άμεσα με τον Prox1 (Prospero homeobox protein 1) [198]. Ο Prox1, ακόμα, μπορεί και καταστέλλει την επαγόμενη από τον NR5A2 μεταγραφική ενεργοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου CYP7A1 στο ήπαρ [197]. Περεταίρω μελέτες που έγιναν σε ηπατικά βλαστικά κύτταρα ποντικών, έδειξαν ότι η υπερέκφραση του NR5A2 εμποδίζει την δημιουργία της αποικίας των πρώιμων ηπατοκυττάρων, ενώ η υπερέκφραση του Prox1 ευνοεί τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των πρώιμων ηπατικών κυττάρων. Ο Prox1, επίσης, φαίνεται να επάγει την έκφραση των κυκλινών D2, E1, E2 ενώ παρεμποδίζει την έκφραση της πρωτεΐνης p16ink4a και του καταστολέα των κυκλινών. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο NR5A2 και ο Prox1 συντονίζονται για να ρυθμίζουν την ανάπτυξη των πρώιμων ηπατοκυττάρων [199].

Ανάμεσα στις λειτουργίες του NR5A2 που αναφέρθηκαν συμπεριλαμβάνεται η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η ιδιότητά του αυτή έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνων του παχέος εντέρου [200], του μαστού [201], και του παγκρέατος [202] αλλά και με την ογκογένεση σε πολλά όργανα, δρώντας είτε ως ογκοκαταστολέας, είτε ως ογκογονίδιο, το οποίο εξαρτάται από το κυτταρικό περιεχόμενο των οργάνων [203-207].



Εικόνα 14. Απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής του NR5A2

Σκοπός εργασίας

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο NR5A2 εμπλέκεται σε ποικίλες λειτουργίες συμπεριλαμβανομένων του μεταβολισμού [186] και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως του παχέος εντέρου, του μαστού και του παγκρέατος [201, 202, 208]. Παρ' όλα αυτά ακόμα δεν γνωρίζουμε αρκετά για την δράση του NR5A2 στις νεοπλασίες του Νευρικού Συστήματος. Πρόσφατα δεδομένα του εργαστηρίου μας δείχνουν πως ο NR5A2/LRH1 παρουσιάζει μια αντιπολλαπλασιαστική και αντιγλοιογενετική δράση στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη, ενώ η υπερέκφραση του NR5A2 οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων νευροβλαστώματος και γλοιοβλαστώματος. Στο γλοιοβλάστωμα, όπως και στους άλλους τύπου καρκίνου, ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός και κυρίως η μετατόπιση του ενεργειακού μεταβολισμού από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στην αερόβια γλυκόλυση καθίστανται αναγκαία για την εξασφάλιση της απαραίτητης βιομάζας (νουκλεοτίδια, λιπαρά οξέα και αμινοξέα). Ο επαγόμενος από υποξία παράγοντας-1α (HIF-1α) είναι ο κύριος ρυθμιστής αυτής της μεταβολικής προσαρμογής και η υψηλή έκφρασή του υποδεικνύει κακή πρόγνωση στο γλοιοβλάστωμα. Η κατανόηση, λοιπόν, της επίδρασης του HIF-1α στην έκφραση μεταβολικών γονιδίων στο GBM θα μπορούσε να προσφέρει μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους.

Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να δούμε αν η αντιπολλαπλασιαστική δράση του NR5A2 σχετίζεται με τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό στο γλοιοβλάστωμα, διερευνούμε μία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του NR5A2 με τα επίπεδα του HIF-1α. Εξετάζουμε, επιπλέον, την επίδραση του NR5A2 στην έκφραση μεταβολικών γονιδίων-στόχων του HIF-1α που εμπλέκονται σε μονοπάτια απαραίτητα για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, όπως είναι η πρόσληψη γλυκόζης, η αερόβια γλυκόλυση, ο μεταβολισμός των λιπιδίων (πρόσληψη λιπαρών οξέων, αποθήκευση, de novo βιοσύνθεση), η β-οξείδωση, ο κύκλος TCA και η γλουταμινόλυση.

Υλικά και Μέθοδοι

Κυτταρικές Καλλιέργειες

Χειρισμός κυτταρικών σειρών

Οι χειρισμοί των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής με αποστειρωμένα υλικά και σκεύη. Η αποστείρωση του θαλάμου γίνεται με υπεριώδη (UV) ακτινοβολία. Για την αποστείρωση των σκευών και της επιφάνειας του θαλάμου χρησιμοποιείται διάλυμα αιθανόλης 70%. Η αποστείρωση όλων των υλικών και των σκευών πραγματοποιείται σε αυτόκαυστο στους 120 C και πίεση 1kr/cm² για 2 h, ενώ αυτών ευαίσθητων στην υψηλή θερμοκρασία γίνεται με φίλτρο 0,22μm. Τα κύτταρα φυλάσσονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂.

Καλλιέργεια/Ανακαλλιέργεια κυττάρων με Θρυψίνη

Το θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των **U87-MG**, κυτταρική σειρά από ανθρώπινο γλοιοβλάστωμα περιλαμβάνει:

- RPMI
- 10% Fetal Bovine Serum (FBS)
- 100 mg/mL pen/strep (Invitrogen)

Ανακαλλιέργεια γινόταν όταν τα κύτταρα είχαν καλύψει το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου για να διατηρηθούν σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Κατά την ανακαλλιέργεια τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και μετά του προστίθεται θρυψίνη/EDTA για να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια του τρυβλίου. Στη συνέχεια, στο διάλυμα θρυψίνης με τα κύτταρα προστίθεται λίγο θρεπτικό το οποίο λόγω των πρωτεϊνών που περιέχει προσφέρει περίσσεια θέσεων για δράση της θρυψίνης με αποτέλεσμα αυτή να «απενεργοποιείται». Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος κυττάρων στις 1000 rpm για 10' και επαναδιαλυτοποίηση σε θρεπτικό μέσο το οποίο και μοιράζεται στα νέα τρυβλία.

Για την καλλιέργεια των **SH-SY5Y** πραγματοποιήθηκαν οι ίδιοι χειρισμοί και το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε:

- DMEM (1.0 g/l D-Glucose)/F-12 (1:1)
- 10% Fetal Bovine Serum (FBS)
- 100 mg/mL pen/strep (Invitrogen)

Επιμόλυνση κυττάρων U87-MG με αδενοϊούς

Τα κύτταρα αρχικά ανακαλλιεργήθηκαν και επιστρώθηκαν σε 6-φρεατίων πιάτο καλλιέργειας, προκειμένου να γίνει η απομόνωση του RNA. Στη συνέχεια, επώαστηκαν στον κλίβανο στους 37 °C με 5% CO₂ παρουσία του προαναφερθέντος θρεπτικού μέσου.

Την επόμενη μέρα επιμολύνθηκαν με αδενοϊούς Ad-NR5A2 και Ad-GFP για επιμόλυνση κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρας. Συγκεκριμένα, για τη διαδικασία της επιμόλυνσης ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- 1) Προσθήκη 30 μl ιού σε κάθε ένα φρεάτιο των 6-φρεατίων πιάτο καλλιέργειας
- 2) Επώαση για 6 ώρες
- 3) Αφαίρεση θρεπτικού με αδενοϊό και προσθήκη καινούριου

Τέλος, αφού επώαστηκαν στους 37 °C απομονώθηκε το ολικό τους RNA

Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει την χρήση του αντιδραστηρίου TRIZOL της εταιρείας Invitrogen, ενώ εφαρμόστηκε και το ανάλογο πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA. Μετά το τέλος της διαδικασίας απομόνωσης, 5μl από κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης 1% [5xTBE (54g Tris, 27.5g Boricacid, 20ml 0.5M EDTA pH 8.0, dH₂O μέχρι το 1lt), 6x DNA loading buffer (0.25% bromophenolblue, 40% (w/v) sucrose σε dH₂O)] για να επιβεβαιωθεί η παρουσία ακέραιου RNA. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του RNA με φωτομέτρηση στα 260 nm και ακολουθήθηκε

κατεργασία των δειγμάτων με το ένζυμο RQ1 DNAaseI (Promega) για την αποικοδόμηση υπολειμάτων DNA. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν: 5μg δείγματος RNA, 3μl DNaseI, 3μL 10x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 30μl και η κάθε αντίδραση επώαστηκε στους 37°C για 60 λεπτά. Ακολούθησε η προσθήκη 1,5μl DNAase Stop Solution για τον τερματισμό της αντίδρασης και επώαση στους 65°C για 10 λεπτά για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Μετά την κατεργασία με τη DNAase μετρήθηκε η συγκέντρωση του δείγματος RNA στα 260 nm και πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του cDNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, με τη χρήση του ενζύμου Im Prom II reverse transcriptase system από την Promega. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκε αρχικά 1.5μg RNA, 1μl μείγματος τυχαίων εκκινητών (randomprimers) και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 12μl, και μετά από επώαση 5 λεπτών στους 70°C για την αποδιάταξη του RNA η αντίδραση μεταφέρθηκε στον πάγο. Ακολούθησε προσθήκη 4μl 5x διαλύματος αντίδρασης, 1μl 10mM dNTPs, 2μl MgCl₂ και επώαση 2 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, σε κάθε αντίδραση προστέθηκε 1μl ενζύμου ImPromII και πραγματοποιήθηκε επώαση σε αυξανόμενες θερμοκρασίες: σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, στους 42°C για 60 λεπτά (σύνθεση cDNA) και στους 70°C για 15 λεπτά (απενεργοποίηση ενζύμου). Στη συνέχεια, το cDNA φυλάχθηκε στους -80°C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)

Για την αντίδραση της real-time PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Taq platinum με τα κατάλληλα διαλύματα (10x reaction Buffer και MgCl₂ 50mM) που την συνόδευαν. Ακόμη ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με κατάλληλο on-line πρόγραμμα της εταιρίας Invitrogen. Τα dNTPs έχουν λειτουργική συγκέντρωση 300nM ενώ, η φθορίζουσα ουσία, το SYBR Green αραιώνεται περίπου 60000 φορές. Παρακάτω φαίνεται ο πίνακας με τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τις RealTimePCR.

Η αντίδραση έλαβε χώρα στο ειδικό μηχάνημα LightCycler 96 της Roche στις εξής συνθήκες:

- Ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 50°C για 2min
 - Αποδιάταξη του ολικού δείγματος DNA στους 95°C για 2min
 - Αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 20''sec
 - Επαναδιάταξη των εκκινητών και πολυμερισμός στους 60 °C για 1min
 - Meltingcurveanalysis από 60 °C έως 95°C κάθε μισό βαθμό
- } 45 κύκλοι

Την αντίδραση συνόδευσε ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης του προϊόντος (meltingcurveanalysis) από τους 55°C στους 99°C με λήψη μετρήσεων κάθε 0.5°C. Η ανάλυση αυτή διαβεβαίωσε την παρουσία ενός μόνο προϊόντος στην αντίδραση.

ΓΟΝΙΔΙΑ	κατεύθυνση Primer	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
human GLUT1	forward	TCTCGAAACTGGGCAAGTCC
	reverse	TCACCCACATACATGGGCAC
human GLUT3	forward	TGGCCCAGATCTTTGGTCTG
	reverse	ATGGAAGGGCTGCACTTTGT
human HK2	forward	ACAAATTTCCGGGTCCTGCT
	reverse	TGTGGTCAAAGAGCTCGTCC
human PFKFB3	forward	AGAACGAGCACAACCTCCAG
	reverse	GGTCCTTCAGGTTCTGCTCC
human PGK1	forward	GCCCATGCCTGACAAGTACT
	reverse	CCACTTCTGGGCCTACACAG
human PKM	forward	AGAAAGGTGCCGACTTCCTG
	reverse	GCTCGACCCCAAACCTCAGA
human LDHA	forward	AGAGGTTACAAGCAGGTGG
	reverse	GTGCACCCGCCTAAGATTCT
human PDK1	forward	TGCTGTATGGCCTGCAAGAT
	reverse	ACATTCTGGCTGGTGACAGG
human FABP3	forward	CCTGGAAGCTAGTGGACAGC
	reverse	GTGGTAGGCTTGGTCATGCT
human FABP7	forward	GGCTTTCTGTGCTACCTGGA
	reverse	GTCACATTTCCACCTGCCT
human PLIN2	forward	AGAGCCGCAAATTGCAGTTG
	reverse	CTTGCCCCAGTCACAGTAG
human ACLY	forward	CTCCGCTCTGCCTATGACAG
	reverse	TCCGATGATGGTCACTCCCT
human ACACA	forward	AGGAGCTGTCTATTCGGGGT
	reverse	TCCGATGATGGTCACTCCCT
human FASN	forward	GAGGTGTCAGAGAACGGCAA
	reverse	TAAACTTCAGCCTGGGCCAG
human CPT1A	forward	AGTCGTGCCACCAAGATCTG
	reverse	AGGCCTCACCGACTGTAGAT
human GLS	forward	CCGATTTGTGGGGTGTGTCT
	reverse	GTCCACTCGGCTCTTTCCA
human IDH1	forward	GCATAGGCTCATCGACGACA
	reverse	CATCATGCCGAGAGAGCCAT
human IDH2	forward	AGATGCTGGAGAAGGTGTGC
	reverse	GCTCTGTCCAGGTTGCTCTT
human SDHA	forward	GCGTGTGCAAGAAGTTGT
	reverse	CATCAGGTTCTGCAGCTCCA
human RPL	forward	GCGGACCGTGCGAGGTAT
	reverse	CACCATCCGCTTTTTCTTGTC
human β-Actin	forward	CTCTCCAGCCTTCCTCCT
	reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Απομόνωση πρωτεϊνών

Η απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα έγινε ως εξής:

Από το στάδιο του RNA isolation έχει φυλαχθεί το υπερκείμενο στους 2-8 ° C. Πραγματοποιείται προσθήκη 100% Et-OH και φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για πέντε λεπτά. Ακολουθεί απομόνωση του υπερκειμένου. Στη συνέχεια, γίνεται πρρασθήκη προπανόλης (2-propanol) και φυγοκέντρηση στους 12.000 στροφές για 10 λεπτά. Την αφαίρεση του υπερκειμένου ακολουθούν τρεις διαδοχικές πλύσεις του pellet με διάλυμα guanidine hydrochloride/95% ethanol και φυγοκέντρηση στις 7.500xg μετά από κάθε πλύση. Μετά αφαιρείται η υδατική φάση και πραγματοποιείται προσθήκη RIPA στο pellet.

Ανάλυση κατά Western (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση Western είναι μια αποτελεσματική τεχνική για τη ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα δείγματα των πρωτεϊνών αρχικά ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου, μετά αποτυπώνονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσω ηλεκτρομεταφοράς και τέλος πραγματοποιείται η διαδικασία εμφάνισης του σήματος.

Κατά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, οι πρωτεΐνες κινούνται λόγω διαφοράς δυναμικού και εγκλωβίζονται στο πλέγμα της μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες μετά τη μεταφορά τους διατηρούν τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι είναι δυνατό στη συνέχεια να αναγνωριστούν από τα αντίσωμα. Πιο συγκεκριμένα, η μεμβράνη επώάζεται σε διάλυμα που περιέχει το συγκεκριμένο αντίσωμα, το οποίο και θα δεσμευτεί σε αυτή και μετά πραγματοποιούνται πλύσεις της μεμβράνης και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, που αναγνωρίζει το πρώτο και το οποίο τελικά ανιχνεύεται.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία έχει εμποτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) τοποθετούνται στη συσκευή της ηλεκτρομεταφοράς ανάμεσα σε 2 διηθητικά χαρτιά Whatman, τα οποία έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο ίδιο διάλυμα. Η τοποθέτησή τους πραγματοποιείται με τη μεμβράνη προσανατολισμένη προς το θετικό πόλο και το πήκτωμα στον αρνητικό, για να μπορέσουν οι πρωτεΐνες του πηκτώματος να μεταφέρονται στη μεμβράνη μέσω εφαρμογής σταθερής έντασης ρεύματος. Ο χρόνος διάρκειας της ηλεκτρομεταφορά εξαρτάται από τις ανάγκες του πειράματος, δηλαδή από το μέγεθος της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει και από την περιεκτικότητα του πηκτώματος σε πολυακρυλαμίδη. Η ένταση του ρεύματος που εφαρμόζεται είναι σταθερή στα 350 mA.



Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πάνω στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες, επώάζεται σε blocking buffer (5% αλβουμίνη ορού βοδιού, BSA) για 1,5 h υπό ελαφριά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι, πραγματοποιείται κορεσμός της μεμβράνης από την αλβουμίνη και μπλοκάρονται οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης, ώστε το αντίσωμα που προστίθεται να δεσμεύεται αποκλειστικά στην ειδική πρωτεΐνη αναγνώρισης.

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση, για 2h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφριά ανάδευση.

Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται είναι ειδικό για την αναγνώριση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει να εντοπίσουμε και δεσμεύεται αποκλειστικά σε αυτή. Μετά, στη μεμβράνη γίνονται 3 πλύσεις με διάλυμα TBST για 10 λεπτά, ώστε να αφαιρεθεί όλο το πρωτογενές αντίσωμα, που δεν προσδέθηκε στη μεμβράνη. Μετά γίνεται επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε TBST, το οποίο αναγνωρίζει συντηρημένη περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος και παράλληλα φέρει μόριο-ιχνηθέτη, για να μπορεί να ανιχνευτεί η προς μελέτη πρωτεΐνη με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Στη συνέχεια, γίνονται άλλες 3 πλύσεις για 10 λεπτά με TBST και ακολουθεί η εμφάνιση του σήματος με κατάλληλο υπόστρωμα για το δευτερογενές αντίσωμα. Η νιτροκυτταρίνη διαβρέχεται για 2 λεπτά με το μίγμα των αντιδραστηρίων ECL (Luminol Reagent), τοποθετείται σε ειδική κασέτα και εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ.

ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΖΩΟ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΕΤΑΙΡΙΑ
HIF-1A	Rabbit	NB100-479	Novus Biologicals

Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

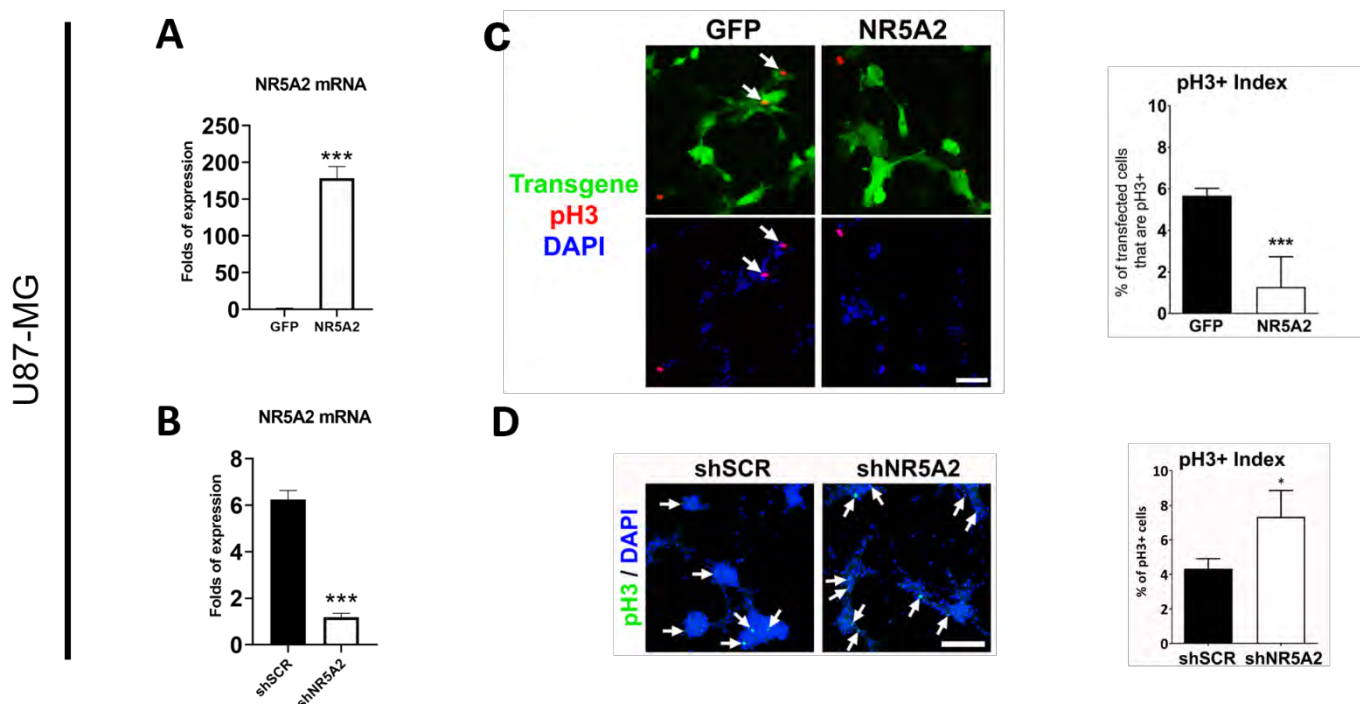
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού στατιστικής GraphPad Prism, ενώ οι συγκρίσεις (μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα) πραγματοποιήθηκαν μεταξύ κάθε πειραματικής ομάδας και του αντίστοιχου πειράματος αναφοράς.

Αποτελέσματα

Ο NR5A2 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του εγκεφάλου

Αρχικά, επιμολύναμε κύτταρα U87-MG με αδενοϊό Ad-NR5A2, ο οποίος υπερεκφράζει τον NR5A2, αλλά και άλλα κύτταρα τις ίδιες κυτταρικής σειράς με αδενοϊό Ad-GFP, που εκφράζει μόνο το GFP γονίδιο, και χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Επίσης, χρησιμοποιήσαμε σταθερές κυτταρικές σειρές U87 στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί αποσιώπηση (knockdown) του γονιδίου του NR5A2 (shNR5A2 κύτταρα). Η κυτταρική σειρά Scramble (shSCR) που χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας έχει ενσωματώσει στο γενετικό τους υλικό με γενετικό ανασυνδυασμό αλληλουχίες από το ίδιο πλασμίδιο με το shRNA του NR5A2 (μέσω λεντιού) αλλά η shRNA αλληλουχία στα Scramble είναι μία τυχαία αλληλουχία που δε στοχεύει σε κάποιο γονίδιο. Χρησιμοποιείται λοιπόν για τον έλεγχο της διαδικασίας και οι όποιες διαφορές του με το shNR5A2 οφείλονται στην καταστολή του NR5A2 και όχι στη διαδικασία της διαμόλυνσης με τον ιό. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε RT-PCR για να επιβεβαιώσουμε την υπερέκφραση του NR5A2 (**Εικόνα 15A**) και την αποσιώπησή του αντίστοιχα (**Εικόνα 15B**).

Γνωρίζοντας από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ότι ο NR5A2 έχει την ικανότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων κατά την εμβρυική ανάπτυξη, εξετάσαμε αν αυτή η ικανότητα διατηρείται και στα καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος (U87-MG). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η υπερέκφραση του NR5A2 στα κύτταρα αυτά μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των pH3⁺ κυττάρων, που βρίσκονται στη μίτωση (**Εικόνα 15C**), υποδηλώνοντας ότι η αντι-πολλαπλασιαστική ικανότητά του διατηρείται και σε αυτά τα κύτταρα. Επιπροσθέτως, η αποσιώπηση του NR5A2 αυξάνει τον αριθμό των pH3⁺ (**Εικόνα 15D**), επιβεβαιώνοντας την προαναφερθείσα παρατήρησή μας για τη συμβολή του NR5A2 στην αναστολή του πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 15. (A) Αποτέλεσμα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA του NR5A2 στην περίπτωση που δεν υπερεκφράζεται το γονίδιο του αλλά εκφράζεται μόνο το γονίδιο του GFP στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (GFP) και στην περίπτωση που υπερεκφράζεται το γονίδιο του (NR5A2). (B) Αποτέλεσμα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA του NR5A2 στην περίπτωση που δεν έχει κατασταλεί το γονίδιο του στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (shSCR) και στην περίπτωση που έχει κατασταλεί το γονίδιο του (shNR5A2). (C) Η υπερέκφραση του NR5A2 στα U87-MG μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των pH3⁺ κυττάρων, που βρίσκονται στη μίτωση, ενώ (D) η αποσιώπηση του NR5A2 αυξάνει τον αριθμό των pH3⁺ κυττάρων. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$

Η έκφραση του HIF-1α σε συνθήκες υπερέκφρασης και αποσιώπησης του NR5A2

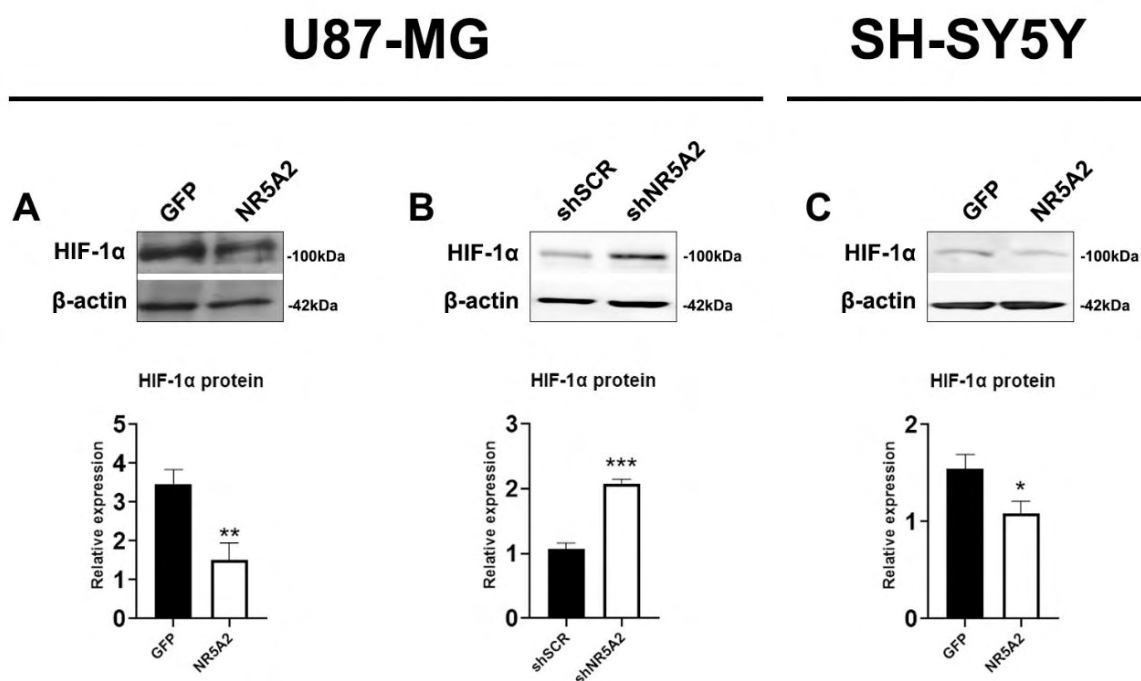
Όπως ήδη αναφέρθηκε, έχει διαπιστωθεί ότι επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α, ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων την έκφραση διαφόρων μεταβολικών γονιδίων, εμπλέκεται σε σημαντικά γεγονότα καρκινογένεσης, συμπεριλαμβανομένων την κυτταρική αθανασία, την αγγειογένεση, την απόπτωση και την μετάσταση. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση του HIF-1α. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα έγινε μία αρχική υπόθεση ότι ο NR5A2 επηρεάζει την έκφραση του HIF-1α.

Προκειμένου να ελέγξουμε αν αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται, αρχικά, πραγματοποιήσαμε Western blot για τον έλεγχο της έκφρασης του HIF-1α σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2. Συγκριτικά, για κάθε δείγμα, εφαρμόστηκε Western Blot για το γονίδιο της β-ακτίνης ως housekeeping gene. Τα αποτελέσματα από την ανοσοαποτύπωση Western έδειξαν ότι τα επίπεδα του HIF-1α μειώνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2 (**Εικόνα 16A**).

Η ίδια διαδικασία, για τον έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης του HIF-1α πραγματοποιήθηκε και στις σταθερές κυτταρικές σειρές U87 στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί αποσιώπηση (knockdown) του γονιδίου του NR5A2 (shNR5A2 κύτταρα). Τα αποτελέσματα από την ανοσοαποτύπωση Western έδειξαν ότι τα επίπεδα του HIF-1α αυξάνονται στα κύτταρα U87-MG τα οποία έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του NR5A2 (**Εικόνα 16B**).

Συνεχίζοντας την πορεία μας στην διερεύνηση μιας πιθανής σύνδεσης της έκφρασης του NR5A2 και του HIF-1α στον καρκίνο του Νευρικού Συστήματος, επεκταθήκαμε και σε άλλη σειρά καρκινικών κυττάρων τα SH-SY5Y. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από ανθρώπινο νευροβλάστωμα και μάλιστα προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του NR5A2 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων SH-SY5Y. Επαναλάβαμε, λοιπόν, την διαδικασία επιμόλυνσης με αδενοϊό Ad-GFP καθώς και με αδενοϊό που υπερεκφράζει τον NR5A2 Ad-NR5A2 αυτή τη φορά για τα κύτταρα SH-SY5Y. Προκειμένου να ελέγξουμε την έκφραση του HIF-1α σε αυτές τις συνθήκες πραγματοποιήσαμε ανοσοαποτύπωση Western Blot χρησιμοποιώντας πάλι για κάθε δείγμα τη β-ακτίνη ως housekeeping gene. Τα αποτελέσματα από την Western blot έδειξαν ότι τα επίπεδα του HIF-1α μειώνονται και στα κύτταρα SH-SY5Y που υπερεκφράζουν τον NR5A2 (**Εικόνα 16C**).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η υπερέκφραση του NR5A2 στις δύο κυτταρικές καρκίνου του Νευρικού Συστήματος που μελετήθηκαν μειώνει την έκφραση του HIF-1α. Σε συμφωνία με αυτό το εύρημα, η αποσιώπηση του γονιδίου του NR5A2 φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα του HIF-1α.



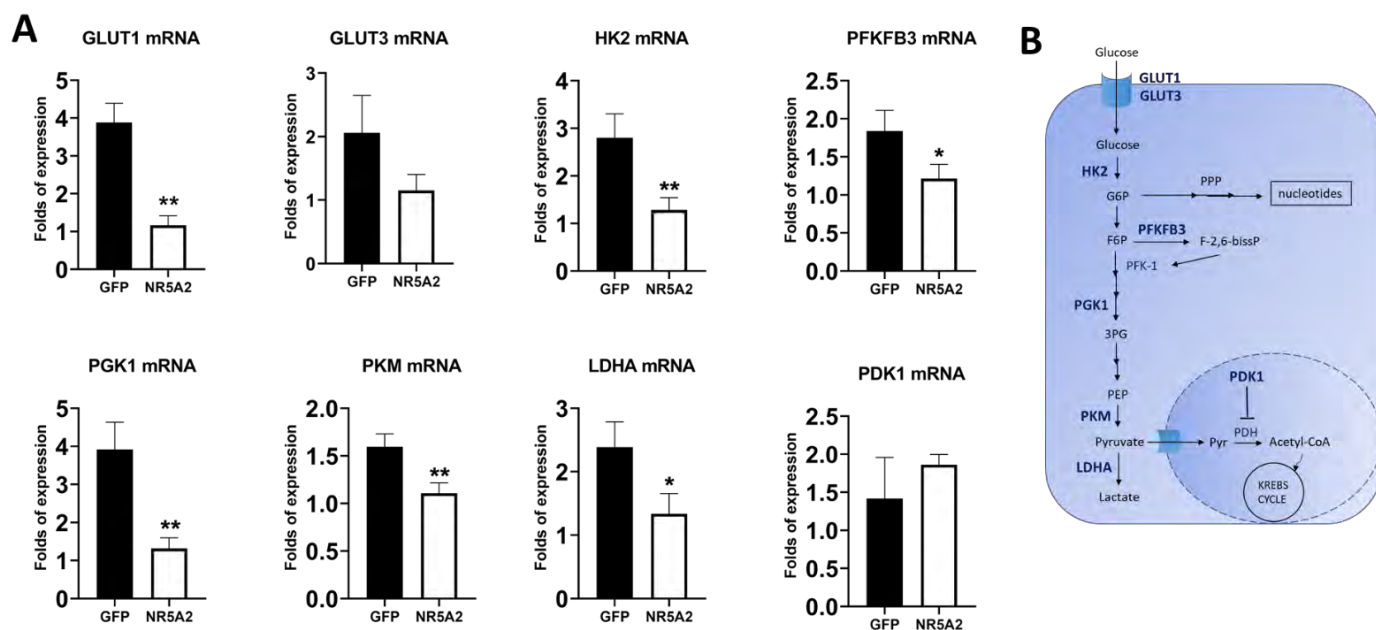
Εικόνα 16. Τα αποτελέσματα από τις ανοσοαποτυπώσεις Western υποδεικνύουν ότι τα επίπεδα του HIF-1α μειώνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2 (A) ενώ αντίθετα φαίνεται να αυξάνονται στα shNR5A2 (B). Τα αποτελέσματα από το Western Blot έδειξαν ότι τα επίπεδα του HIF-1α μειώνονται επίσης στα κύτταρα SH-SY5Y που υπερεκφράζουν τον NR5A2. Η γραμμική σφάλματος απεικονίζει την τυπική απόκλιση από n = 3 βιολογικές επαναλήψεις. *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001

Ρύθμιση έκφρασης των γλυκολυτικών γονιδίων στην υπερέκφραση του NR5A2

Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός έχει πλέον αναγνωριστεί ως βασικό χαρακτηριστικό του GBM, το οποίο μάλιστα χαρακτηρίζεται από αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού οξέος. Ο HIF-1 παίζει καθοριστικό ρόλο σε αυτή τη μετάβαση του ενεργειακού μεταβολισμού από την ΟΧΡΗΟΣ στην αερόβια γλυκόλυση, ακόμα και παρουσία οξυγόνου, ώστε να παρέχει στα κύτταρα του GBM ένα πλεονέκτημα επιβίωσης. Διαπιστώνουμε, επομένως, ότι HIF-1α αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα-κλειδί που ρυθμίζει την ενεργοποίηση μιας μεγάλης ομάδας γλυκολυτικών γονιδίων, πολλά εκ των οποίων ενισχύουν την επιβίωση και τον μεταβολισμό των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος.

Μετά την παρατήρηση, λοιπόν, ότι τα επίπεδα του HIF-1α μειώνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2, μελετήσαμε η έκφραση διαφόρων γλυκολυτικών γονιδίων-στόχων του HIF-1α στην ίδια κυτταρική σειρά, ώστε να διαπιστώσουμε εάν υπόκεινται σε ανάλογη αλλαγή της έκφρασής τους. Για το σκοπό αυτό, απομονώσαμε το ολικό mRNA από τα κύτταρα U87-MG που έχουν επιμολυνθεί με τον αδενοϊό Ad-NR5A2 και Ad-GFP και στη συνέχεια συνθέσαμε cDNA. Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών για το κάθε γονίδιο εφαρμόσαμε real-time RT-qPCR (βλ. «υλικά και μέθοδοι»). Συγκριτικά, για κάθε δείγμα, εφαρμόστηκε και real-time RT-qPCR για το γονίδιο της ριβοσωμικής πρωτεΐνης RPL ως housekeeping gene. Συγκεκριμένα τα γονίδια που μελετήσαμε κωδικοποιούν για τους μεταφορείς της γλυκόζης (GLUT1, GLUT3), την εξοκινάση 2 (HK2), την κινάση που ενεργοποιεί αλλοστερικά την 6-φωσφοφρουκτο-1-κινάση PFK-1 (PFKFB3), την κινάση του φωσφογλυκερικού 1 (PGK1), την κινάση του πυροσταφυλικού (PKM) και την γαλακτική αφυδρογονάση (LDHA), η έκφραση των οποίων ενισχύεται από τον HIF-1α στο γλοιοβλάστωμα. Επίσης μελετήθηκε η κινάση 1 της πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDK1) η οποία καταστέλλει την πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH) και άρα την είσοδο του πυροσταφυλικού στον κύκλο τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA).

Τα αποτελέσματα της RT-qPCR έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA των GLUT1, HK2, PFKFB3, PGK1, PKM και LDHA μειώνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα του mRNA των GLUT3 και PDK1 στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2.



Εικόνα 17. (A) Αποτέλεσμα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA των GLUT1, GLUT3, HK2, PFKFB3, PGK1, PKM, LDHA και PDK1 στην περίπτωση που υπερεκφράζεται το γονίδιο του NR5A2 στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (NR5A2). Το mRNA των γονιδίων GLUT1, HK2, PFKFB3, PGK1, PKM και LDHA φαίνεται να μειώνεται στα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2. (B) Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης των γονιδίων στο αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

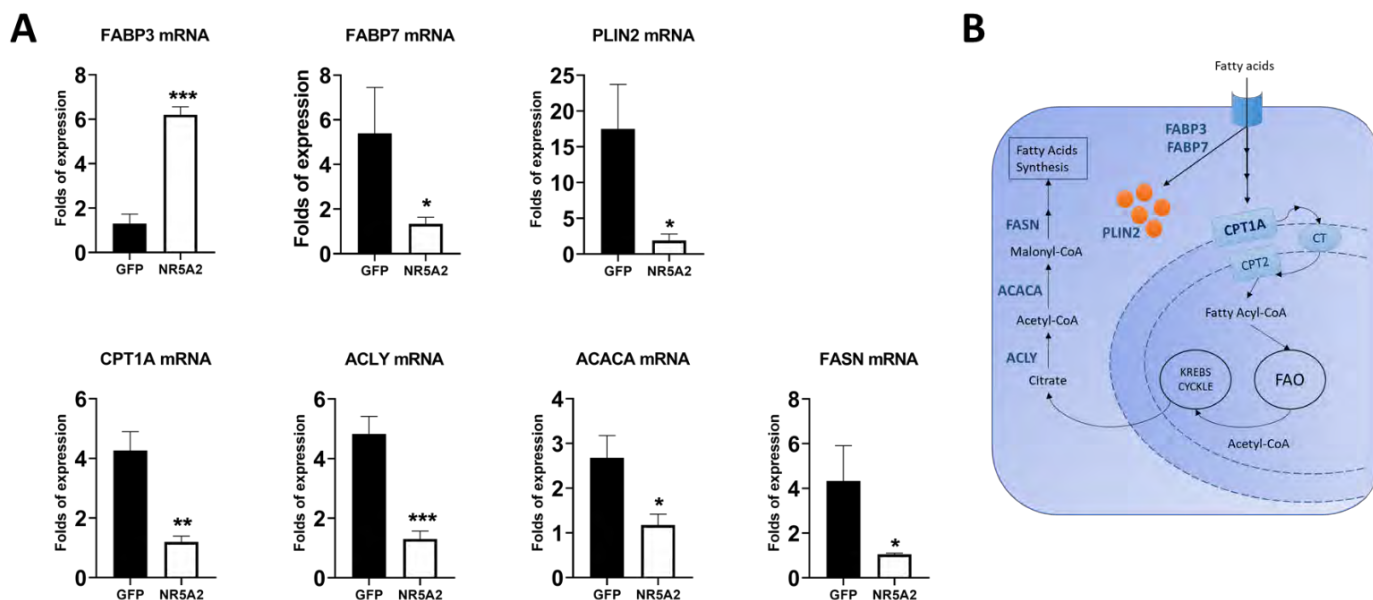
Ρύθμιση έκφρασης των γονιδίων του μεταβολισμού λιπιδίων στην υπερέκφραση του NR5A2

Το γλοιοβλάστωμα χαρακτηρίζεται επίσης από επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των λιπιδίων, που περιλαμβάνει τη διαδικασία σύνθεσης, αποθήκευσης και αποικοδόμησης λιπιδίων, μονοπάτια που ρυθμίζονται μεταξύ άλλων από τον HIF-1α. Όπως αναφέρθηκε, ο HIF-1α επάγει την πρόσληψη και σύνθεση λιπαρών οξέων αλλά και την αποθήκευση των λιπιδίων σε λιποσταγόνες LDs (lipid droplets).

Την αναζήτηση μας για το πώς επηρεάζει η έκφραση του NR5A2 τα μεταβολικά ένζυμα, μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του HIF-1α, ακολούθησε η μελέτη των γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε πάλι το mRNA από τα κύτταρα U87-MG που έχουν επιμολυνθεί με τον αδενοϊό Ad-NR5A2 αλλά και από αυτά που επιμολύνθηκαν με τον αδενοϊό Ad-GFP, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ως ιός-μάρτυρας. Αφού συνθέσαμε cDNA με RT πολυμεράση, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών για το κάθε προς μελέτη γονίδιο και το γονίδιο RPL (housekeeping gene) πραγματοποιήσαμε RT-qPCR.

Μελετήσαμε τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες FABP3 και FABP7 αλλά και την περιλιπίνη PLIN2, οι οποίες συμμετέχουν στην πρόσληψη λιπαρών οξέων και στον σχηματισμό των λιποσταγόνων αντίστοιχα. Μελετήθηκαν, επίσης γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες ACLY, ACACA και FASN, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη σύνθεση των λιπιδίων ενώ η CPT1A κατευθύνει τα λιπαρά οξέα στο μιτοχόνδριο όπου υφίστανται β-οξειδωση.

Τα αποτελέσματα της real-time RT-qPCR έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA του FABP3 αυξάνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2. Αντίθετα, τα επίπεδα του mRNA των FABP7, PLIN2, CPT1A, ACLY, ACACA και FASN φαίνεται να μειώνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.



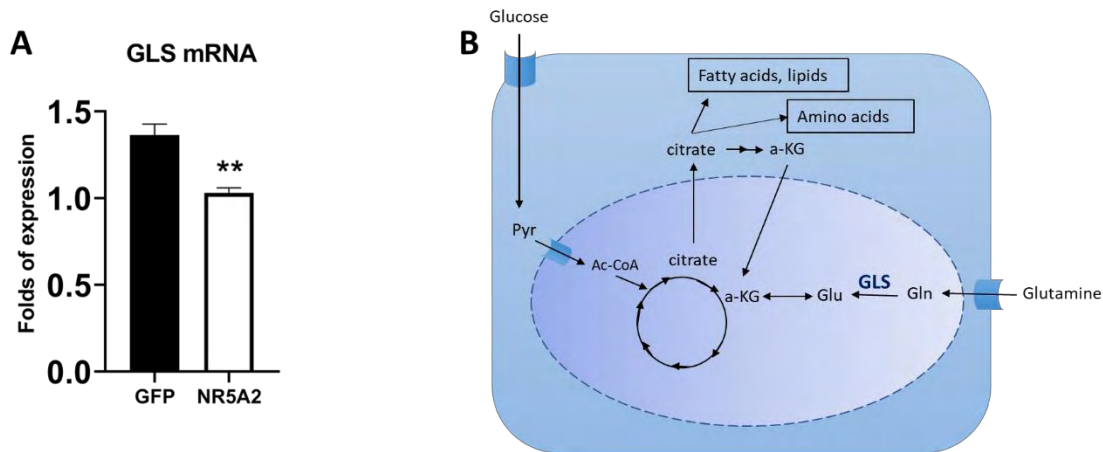
Εικόνα 18. (Α)Αποτέλεσμα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA των FABP3,FABP7, PLIN2 ,CPT1A, ACLY, ACACA και FASN στα U87 που έχουν μολυνθεί με αδενοϊό που υπερεκφράζει τον NR5A2 (Ad-NR5A2) κι αδενοϊό που εκφράζει το GFP (Ad-GFP). Τα επίπεδα του mRNA του FABP3 φαίνεται να αυξάνονται ενώ των FABP7, PLIN2, CPT1A, ACLY, ACACA και FASN φαίνεται να μειώνονται στα U87 που υπερεκφράζουν τον NR5A2. (Β) Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης των γονιδίων στο αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Ρύθμιση έκφρασης της γλουταμινάσης στην υπερέκφραση του NR5A2

Η έξοδος του κιτρικού από το μιτοχόνδριο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων αφήνει ανεκπλήρωτο τον κύκλο του κιτρικού οξέος στα καρκινικά κύτταρα, που δυνητικά θα οδηγούσε στην στέρση σημαντικών προδρόμων μορίων για τη βιοσύνθεση απαραίτητων μακρομορίων. Για την αναπλήρωση του κύκλου του TCA επιστρατεύεται η γλουταμινόλυση που αποτελεί την κύρια οδό παραγωγής κιτρικού οξέος στα καρκινικά κύτταρα. Στο γλοιοβλάστωμα εντοπίζεται αυξημένη έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την γλουταμινάση GLS, η έκφραση μάλιστα του οποίου ενισχύεται από τον HIF-1α.

Συνεχίσουμε, λοιπόν, τον έλεγχο της επίδρασης της έκφρασης του NR5A2 στην έκφραση διαφόρων μεταβολικών ενζύμων-στόχων του HIF-1α, μελετώντας αυτή τη φορά την έκφραση της γλουταμινάσης GLS.

Τα αποτελέσματα της real-time RT-qPCR έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA της GLS μειώνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2.



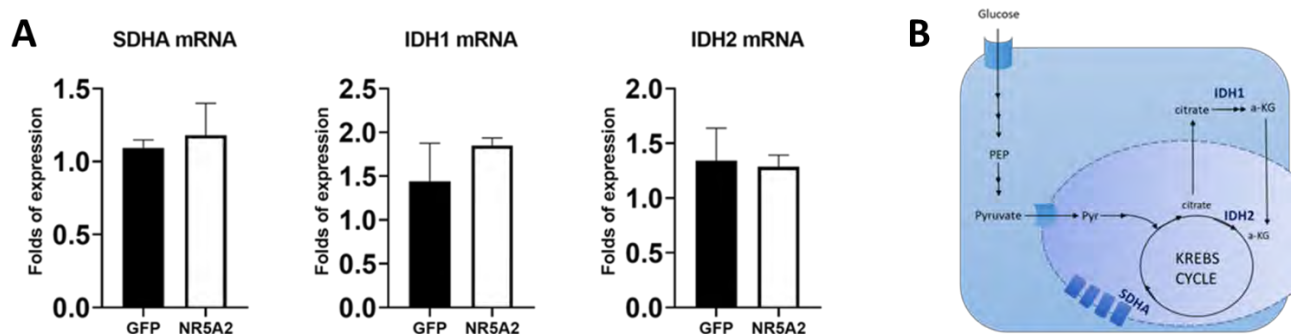
Εικόνα 19. (A) Αποτέλεσμα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA της GLS στην περίπτωση που υπερεκφράζεται το γονίδιο του NR5A2 στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (NR5A2). (B) Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης του γονιδίου στο αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι. **: $p < 0.01$

Ρύθμιση έκφρασης γονιδίων του κύκλου του Krebs στην υπερέκφραση του NR5A2

Προκειμένου, τα καρκινικά κύτταρα να αυξήσουν τους γλυκολυτικούς ρυθμούς μειώνουν την εξάρτησή τους από τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Με αυτόν τον τρόπο καταφέρνουν να συσσωρεύουν ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βιομάζας αντί για παραγωγή ενέργειας.

Θέλοντας να διαπιστώσουμε αν οι παρατηρήσεις που κάναμε για τα προηγούμενα μεταβολικά μονοπάτια επιβεβαιώνονται και στα γονίδια που σχετίζονται με τον κύκλο του κιτρικού οξέος, μελετήσαμε τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες SDHA, IDH1 και IDH2. Η SDHA συνδέει τον κύκλο του Krebs με την αναπνευστική αλυσίδα, ενώ οι IDH1 και IDH2 οδηγούν στην παραγωγή α-κετογλουταρικού εκτός και εντός του μιτοχονδρίου αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την RT-qPCR έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA των SDHA, IDH1 και IDH2 δεν φαίνεται να εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική αλλαγή στα κύτταρα που U87 που υπερεκφράζουν τον NR5A2.



Εικόνα 20. (A) Αποτέλεσμα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA των SDHA, IDH1 και IDH2 στα U87 που έχουν μολυνθεί με αδενοϊό που υπερεκφράζει τον NR5A2 (Ad-NR5A2) κι αδενοϊό που εκφράζει το GFP (Ad-GFP). (B) Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης του γονιδίου στο αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι.

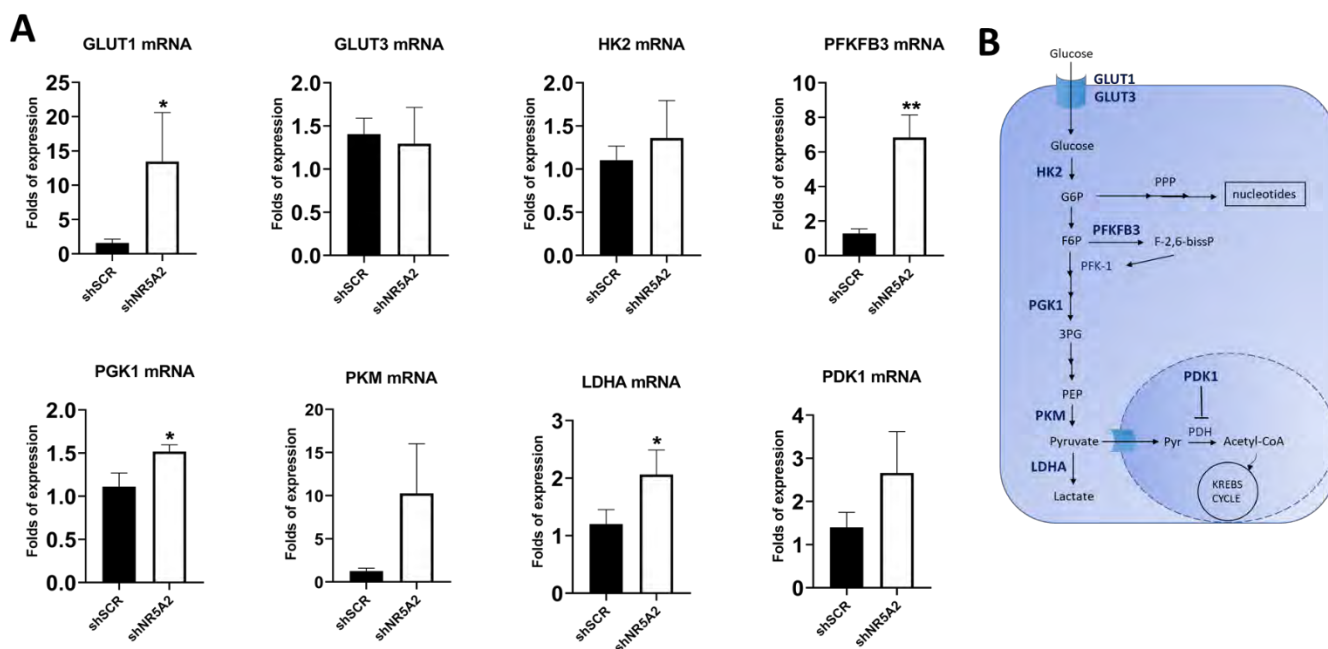
Ρύθμιση έκφρασης των γλυκολυτικών γονιδίων στην αποσιώπηση του NR5A2

Όπως είδαμε από τα παραπάνω πειράματα, στα κύτταρα U87 που υπερεκφράζουν τον NR5A2 παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του HIF-1α (αποτέλεσμα 1^Α) αλλά και αντίστοιχη μείωση της έκφρασης διαφόρων μεταβολικών γονιδίων που επάγονται από τον HIF-1α. (αποτέλεσμα 2,3,5). Έχουμε, επίσης, παρατηρήσει (αποτέλεσμα 1β) ότι τα επίπεδα του HIF-1α αυξάνονται στα κύτταρα U87-MG τα οποία έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του NR5A2 (shNR5A2)

Συνεχίζοντας, έτσι, την πορεία μας στην διερεύνηση μιας πιθανής σύνδεσης της έκφρασης του NR5A2 και του HIF-1α στον καρκίνο του Νευρικού Συστήματος, μελετήσαμε την έκφραση των ίδιων μεταβολικών γονιδίων-στόχων του HIF-1α αυτή τη φορά σε κύτταρα U87 τα οποία έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον NR5A2, ώστε να διαπιστώσουμε αν και πως επηρεάζεται ο φαινότυπός τους.

Αρχικά, μελετήσαμε την έκφραση των γλυκολυτικών γονιδίων GLUT1, GLUT3, HK2, PFKFB3, PGK1, PKM, LDHA και PDK1 ανάλυση RT- qPCR. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε cDNA από το mRNA κυττάρων U87 στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί καταστολή (knockdown) του γονιδίου του NR5A2 (shNR5A2 κύτταρα) μέσω κατάλληλου λεντιού αλλά και για τα κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί το shRNA που δεν προκαλεί καταστολή της έκφρασης του NR5A2(shSCR). Συγκριτικά, για κάθε δείγμα, εφαρμόστηκε και real-time RT-qPCR για το γονίδιο της ριβοσωμικής πρωτεΐνης RPL ως housekeeping gene.

Τα αποτελέσματα της RT-qPCR έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA των GLUT1, PFKFB3, PGK1 και LDHA αυξάνονται στα κύτταρα shNR5A2. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα του mRNA των GLUT3, HK2, PKM και PDK1 στα κύτταρα U87-MG που έχουν υποστεί καταστολή του γονιδίου του NR5A2.

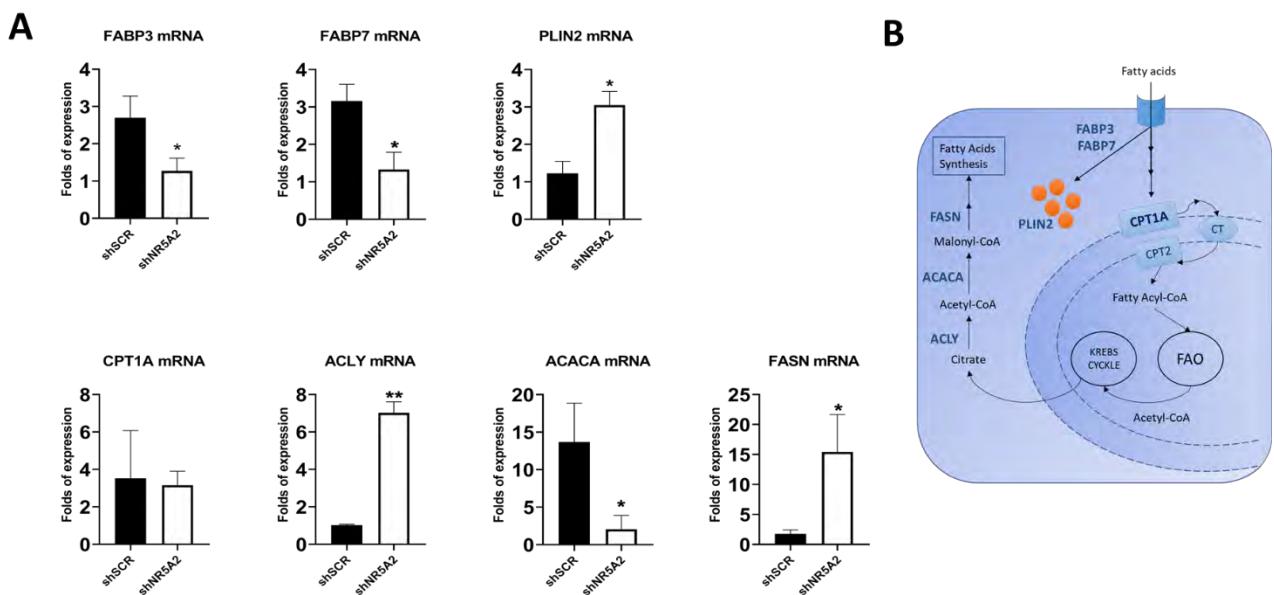


Εικόνα 21. (Α)Τα αποτελέσματα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA των GLUT1, GLUT3, HK2, PFKFB3, PGK1, PKM, LDHA και PDK1 στην περίπτωση στην περίπτωση που δεν έχει κατασταλεί το γονίδιο της στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (shSCR) και στην περίπτωση που έχει κατασταλεί το γονίδιο της (shNR5A2). Το mRNA των γονιδίων GLUT1, PFKFB3, PGK1 και LDHA φαίνεται να αυξάνεται στα shNR5A2 ενώ η διαφορά στο mRNA των GLUT3, HK2, PKM και PDK1 δεν είναι στατιστικώς σημαντική. (Β) Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης των γονιδίων στο αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

Ρύθμιση έκφρασης των γονιδίων του μεταβολισμού λιπιδίων στην αποσιώπηση του NR5A2

Συνεχίσαμε, λοιπόν, τον έλεγχο της επίδρασης της έκφρασης του NR5A2 στην έκφραση διαφόρων μεταβολικών ενζύμων-στόχων του HIF-1α που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων, αυτή τη φορά στα κύτταρα U87 που έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον NR5A2. Επαναλάβαμε την ίδια διαδικασία με πριν, κάνοντας RT- qPCR με cDNA που συντέθηκε από το mRNA κυττάρων shSCR και shNR5A2. Για την RT- qPCR χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές για τα γονίδια FABP3, FABP7, PLIN2, CPT1A, ACLY, ACACA, FASN αλλά και για το γονίδιο της ριβοσωμικής πρωτεΐνης RPL ως housekeeping gene.

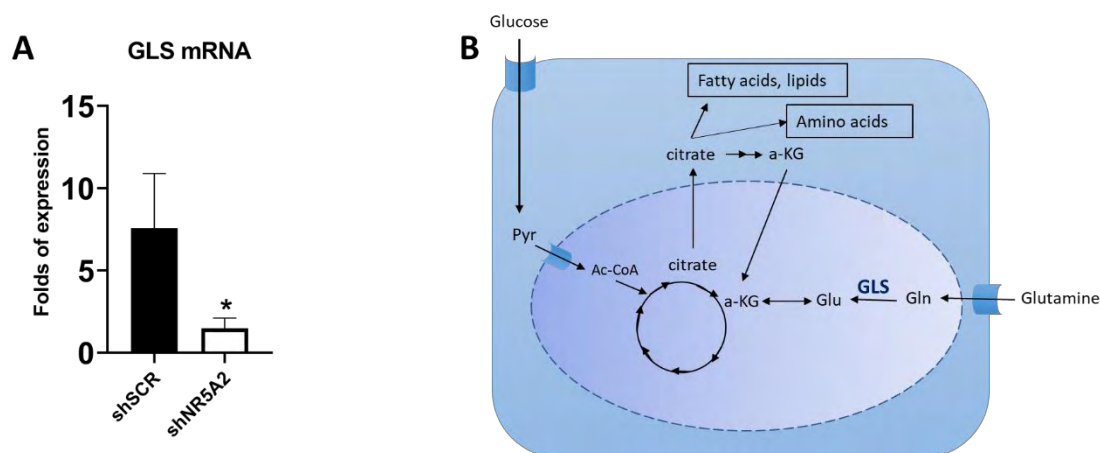
Τα αποτελέσματα της RT-qPCR έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA των FABP3, FABP7 και ACACA μειώνονται στα κύτταρα shNR5A2, ενώ αυτά των PLIN2, ACLY και FASN φαίνεται να αυξάνονται. Τα επίπεδα του mRNA της CPT1A δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική στα U87 κύτταρα που έχουν υποστεί αποσιώπηση του NR5A2.



Εικόνα 22. (Α) Τα αποτελέσματα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA των FABP3, FABP7, PLIN2, CPT1A, ACLY, ACACA και FASN στην περίπτωση που δεν έχει κατασταλεί το γονίδιο της στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (shSCR) και στην περίπτωση που έχει κατασταλεί το γονίδιο της (shNR5A2). Το mRNA των γονιδίων FABP3, FABP7 και ACACA φαίνεται να μειώνεται, ενώ των PLIN2, ACLY και FASN φαίνεται να αυξάνονται. στα shNR5A2 (B) Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης των γονιδίων στο αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

Ρύθμιση έκφρασης της γλουταμινάσης στην αποσιώπηση του NR5A2

Αφού ελέγξαμε πως επηρεάζει η αποσιώπηση του NR5A2 στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος την έκφραση διαφόρων γονιδίων-στόχων του HIF-1α στον μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων, μελετήσαμε αντίστοιχα το μονοπάτι της γλουταμινόλυσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήσαμε RT- qPCR με cDNA που συντέθηκε από το mRNA των κυττάρων shSCR και shNR5A2, χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές για το γονίδιο που κωδικοποιεί την γλουταμινάση GLS. Συγκριτικά, εφαρμόστηκε και real-time RT-qPCR για το γονίδιο της ριβοσωμικής πρωτεΐνης RPL ως housekeeping gene. Τα αποτελέσματα της RT-qPCR έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA της GLS μειώνονται στα κύτταρα U87 που έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του NR5A2 με χρήση λεντιού.

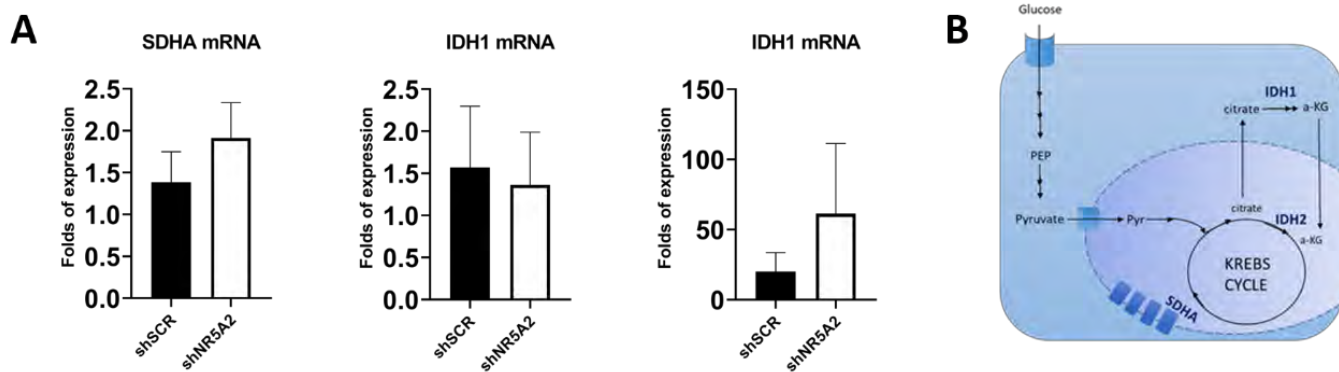


Εικόνα 23. (A) Αποτέλεσμα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA της GLS στην περίπτωση που δεν έχει κατασταλεί το γονίδιο της στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (shSCR) και στην περίπτωση που έχει κατασταλεί το γονίδιο της (shNR5A2). (B) Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης του γονιδίου στο αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι. *: $p < 0.05$

Ρύθμιση έκφρασης γονιδίων του κύκλου του Krebs στην αποσιώπηση του NR5A2

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος σχετίζεται με όλες τις μεταβολικές πορείες που μελετήθηκαν, δηλαδή τον μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπιδίων και της γλουταμίνης. Έτσι, θέλοντας να διαπιστώσουμε αν οι παρατηρήσεις που κάναμε για τα προηγούμενα μεταβολικά μονοπάτια επιβεβαιώνονται και στα γονίδια που σχετίζονται με τον κύκλο του κιτρικού οξέος, μελετήσαμε τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες SDHA, IDH1 και IDH2.

Επαναλάβαμε, λοιπόν, την ίδια διαδικασία με τα προηγούμενα πειράματα, κάνοντας ανάλυση RT- qPCR χρησιμοποιώντας cDNA που προέρχεται από το mRNA των κυττάρων U87-MG στα οποία είχε πραγματοποιηθεί καταστολή (knockdown) του γονιδίου του NR5A2 (shNR5A2 κύτταρα) μέσω κατάλληλου λεντιού αλλά και για τα κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί το shRNA που δεν προκαλεί καταστολή της έκφρασης του NR5A2 (shSCR). Κατά την RT- qPCR χρησιμοποιήσαμε κατάλληλους εκκινητές για SDHA, IDH1, IDH2 ενώ συγκριτικά εφαρμόστηκε και real-time RT-qPCR για το γονίδιο της RPL ως housekeeping gene.

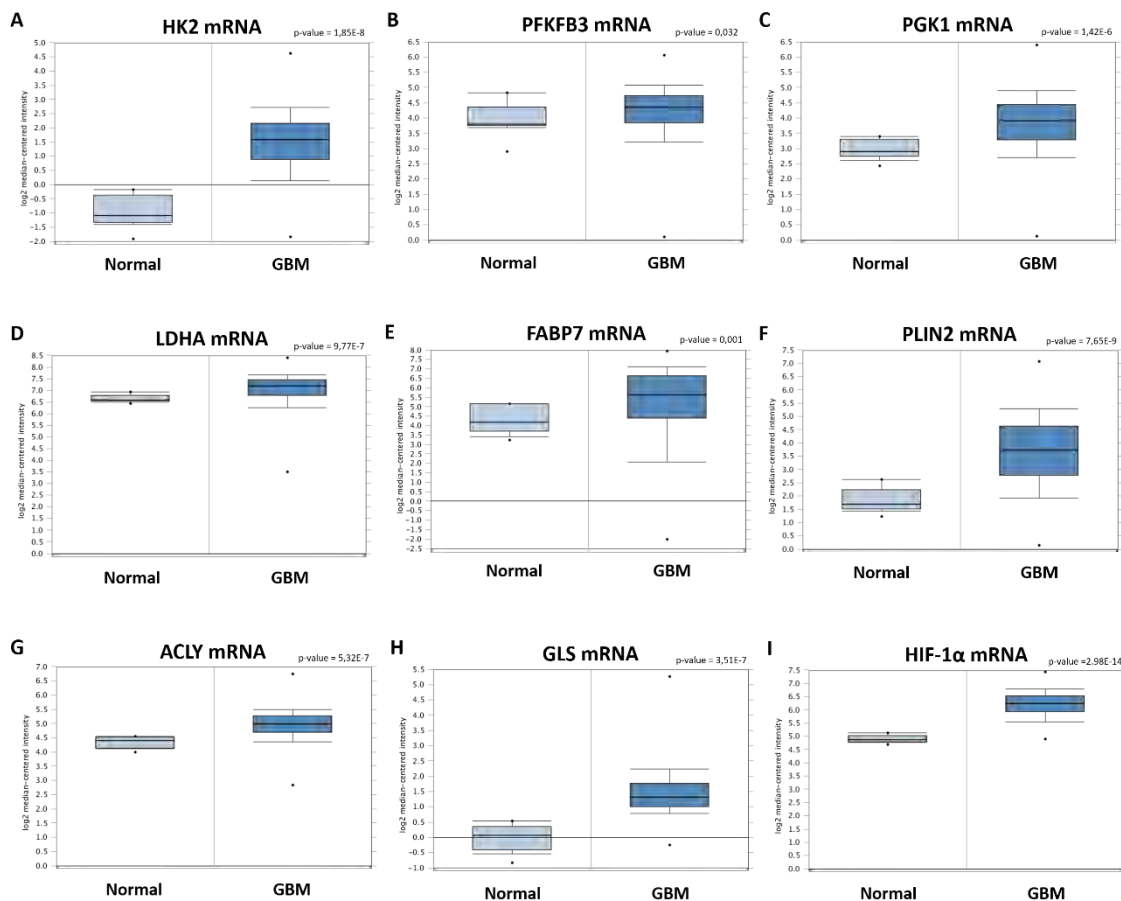


Εικόνα 24. (A) Αποτέλεσμα της RT-PCR για τα σχετικά επίπεδα του mRNA των SDHA, IDH1 και IDH2 στα U87 στα οποία δεν έχει κατασταλεί το γονίδιο της στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (shSCR) και στην περίπτωση που έχει κατασταλεί το γονίδιο της (shNR5A2). Δεν παρατηρείται κάποια στατιστικώς σημαντική αλλαγή στην έκφρασή τους στα shNR5A2 (B) Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης του γονιδίου στο αντίστοιχο μεταβολικό μονοπάτι.

Διαφορική έκφραση βασικών μεταβολικών γονιδίων στο γλοιοβλάστωμα και κλινικές ενδείξεις καθιστούν τον NR5A2 ιδανικό φαρμακολογικό στόχο με πιθανή αντικαρκινική δράση

Παρατηρώντας ότι η έκφραση ορισμένων μεταβολικών γονιδίων στο γλοιοβλάστωμα οδηγεί σε διαταραγμένο φαινότυπο υπό συνθήκες υπερέκφρασης και αποσιώπησης του NR5A2, στη συνέχεια, ελέγξαμε κλινικά δεδομένα που αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων TCGA, ώστε να δούμε πώς αλλάζει η έκφραση των γονιδίων αυτών, σε δείγματα ασθενών με γλοιοβλάστωμα.

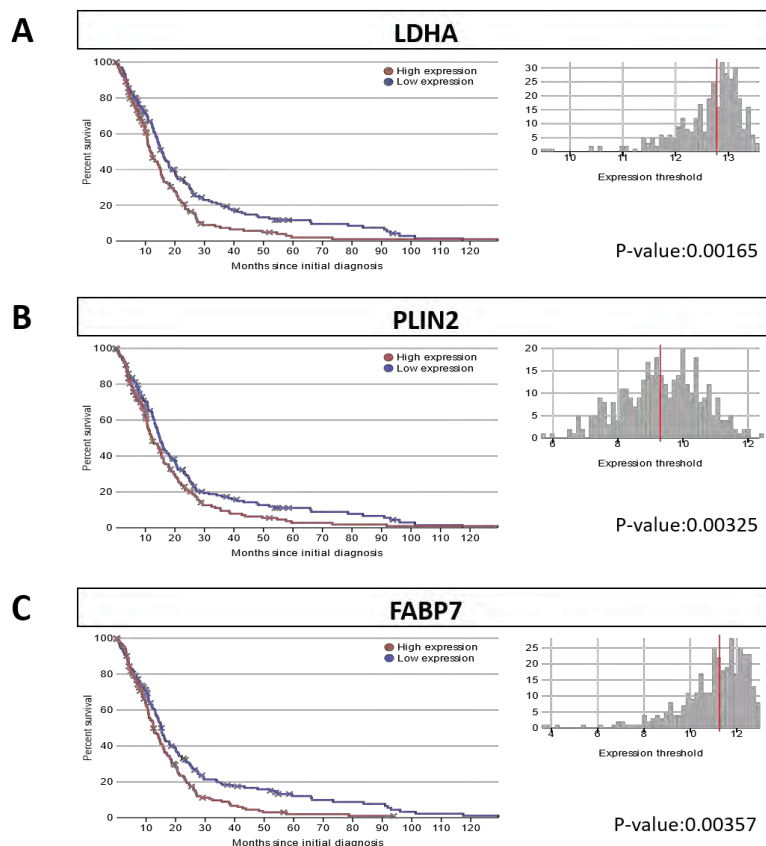
Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, όπως φαίνονται στην εικόνα 25 τα επίπεδα των mRNA των HK2, PFKFB3, PGK1, LDHA, FABP7, PLIN2, ACLY, GLS αλλά και του HIF-1α εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική αύξηση στα δείγματα ασθενών με γλοιοβλάστωμα συγκριτικά με δείγματα υγείων ατόμων.



Εικόνα 25. Κλινικά δεδομένα για τη σχετική έκφραση των mRNA των γονιδίων HK2, PFKFB3, PGK1, LDHA, FABP7, PLIN2, ACLY, GLS και του HIF-1α σε δείγματα ασθενών με γλοιοβλάστωμα (GBM) και σε δείγματα υγιών ατόμων (Normal) από τη βάση δεδομένων TCGA (Normal: 10, GBM: 542). Τα επίπεδα του mRNA του HK2 αυξάνονται στα δείγματα GBM συγκριτικά με τα Normal με επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} = 1,85E-8$. (A) Τα επίπεδα του mRNA του PFKFB3 αυξάνονται στα δείγματα ασθενών GBM με επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} = 0,032$. (B) Τα επίπεδα του mRNA του PGK1 αυξάνονται στα δείγματα GBM με επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} = 1,42E-6$. (C) Τα επίπεδα του mRNA του LDHA αυξάνονται στα δείγματα GBM με επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} = 9,77E-7$. (D) Τα επίπεδα του mRNA του FABP7 αυξάνονται στα δείγματα GBM με επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} = 1,85E-8$. (E) Τα επίπεδα του mRNA του PLIN2 αυξάνονται στα δείγματα GBM με επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} = 7,65E-9$. (F) Τα επίπεδα του mRNA του ACLY αυξάνονται στα δείγματα GBM με επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} = 5,32E-7$. (G) Τα επίπεδα του mRNA του GLS αυξάνονται στα δείγματα GBM με επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} = 3,51E-7$. (H) Τα επίπεδα του mRNA του HIF-1α αυξάνονται στα δείγματα GBM με επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} = 2,98E-14$. (I).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση ορισμένων μεταβολικών γονιδίων από αυτά που μελετήσαμε στην παρούσα μελέτη μεταβάλλεται σημαντικά σε δείγματα ασθενών με γλοιοβλάστωμα και συσχετίζεται με τα αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών.

Συγκεκριμένα, από τα κλινικά δεδομένα που φαίνονται στην εικόνα παρατηρήσαμε ότι η μειωμένη έκφραση των γονιδίων LDHA, PLIN2 και FABP7 σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα φαίνεται να σχετίζεται με αύξηση του ποσοστού επιβίωσής τους (**Εικόνα 26**).



Εικόνα 26. Γραφήματα της συνάρτησης επιβίωσης (Kaplan-Meier) ασθενών με γλοιοβλάστωμα που εμφανίζουν υψηλή (κόκκινο) και χαμηλή έκφραση (μπλε) των γονιδίων LDHA, PLIN2 και FABP7. Η μειωμένη έκφραση της LDHA σχετίζεται με αυξημένη επιβίωση με επίπεδο σημαντικότητας P-value =0,00165. (A) Η μειωμένη έκφραση του PLIN2 σχετίζεται με αυξημένη επιβίωση με επίπεδο σημαντικότητας P-value =0,00325. (B) Η μειωμένη έκφραση του FABP7 σχετίζεται με αυξημένη επιβίωση με επίπεδο σημαντικότητας P-value =0,00357.

Συζήτηση

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα αποτελεί τον πιο κοινό και πιο επιθετικό όγκο του εγκεφάλου. Παρά την εξέλιξη σε τεχνολογικό και επιστημονικό επίπεδο, την βελτίωση των χειρουργικών μεθόδων και της συμβατικής χημειοθεραπείας, καθώς και τις χιλιάδες ασθενών που έχουν συμμετάσχει σε κλινικές μελέτες, το γλοιοβλάστωμα παραμένει μη θεραπεύσιμο, και μάλιστα χαρακτηρίζεται από διάμεση επιβίωση (median survival) 12-16 μήνες. [209, 210] Αυτός ο επιθετικός φαινότυπος οφείλεται μεταξύ άλλων στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό, ο οποίος τροφοδοτεί τα καρκινικά κύτταρα όχι μόνο με την απαραίτητη ενέργεια αλλά και με τα κατάλληλα πρόδρομα μόρια για την κάλυψη της αυξημένης ανάγκης για βιοσύνθεση, αύξηση, ανάπτυξη, μετάσταση και επιβίωση.[87] Στο μεταβολισμό ενός καρκινικού κυττάρου, βασικός ρυθμιστικός παράγοντας είναι ο HIF-1α, ο οποίος παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετάβαση του ενεργειακού μεταβολισμού από την OXPHOS στην αερόβια γλυκόλυση, ιδιαίτερα υπό υποξικές συνθήκες, ώστε να παρέχει στα κύτταρα του GBM ένα πλεονέκτημα επιβίωσης. Ο HIF-1α αποτελεί, παράλληλα, μεταγραφικό παράγοντα-κλειδί που ρυθμίζει την ενεργοποίηση μιας μεγάλης ομάδας γονιδίων, ενισχύοντας εκτός από την αερόβια γλυκόλυση και άλλα μονοπάτια για τον μεταβολισμό των λιπιδίων και αμινοξέων.[211] Πρόσφατα δεδομένα του εργαστηρίου μας δείχνουν πως ο NR5A2/LRH1 παρουσιάζει μια αντιπολλαπλασιαστική και αντιγλοιογενετική δράση στα νευρικά βλαστικά κύτταρα κατά την εμβρυική ανάπτυξη του ΚΝΣ, ενώ η υπερέκφραση του NR5A2 οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων νευροβλαστώματος και γλοιοβλαστώματος. Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν τον NR5A2 ως έναν φαρμακολογικό στόχο για την αντιμετώπιση των νεοπλασιών του Νευρικού Συστήματος.

Επίδραση NR5A2 στην έκφραση του HIF-1α

Η παρούσα μελέτη, λοιπόν, εστιάζει στον ρόλο του NR5A2 στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό του γλοιοβλαστώματος. Αρχικά, ερευνήσαμε μία πιθανή συσχέτιση της έκφρασης του NR5A2 και του HIF-1α και βρέθηκε κατά την υπερέκφραση του NR5A2, σε κύτταρα U87, τα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α μειώνονται τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης, ενώ αντίθετα σε συνθήκες αποσιώπησης του NR5A2 η πρωτεϊνική συγκέντρωση του HIF-1α αυξάνεται.

Σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως και στο GBM, η κακή πρόγνωση σχετίζεται με διατάραξη στα επίπεδα και τη δραστηριότητα του HIF-1α. Ως εκ τούτου, ο HIF-1α και οι σχετιζόμενες μεταβολικές οδοί μπορεί να είναι πολλά υποσχόμενοι θεραπευτικοί στόχοι για το γλοιοβλάστωμα. [133] Έρευνες έχουν δείξει ότι η καταστολή του HIF-1α μέσω siRNA έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης του γλοιώματος, την αύξηση του ποσοστού επιβίωσης αλλά και την αναστολή της μετανάστευσης και διεισδυτικότητας των κυττάρων γλοιώματος *in vitro*. [140, 212] Επιπλέον, η καταστολή του HIF-1α καθιστά τα καρκινικά κύτταρα περισσότερο ευαίσθητα σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα [213] και σε ακτινοβολίες. [214, 215]

Συμπερασματικά, ο NR5A2 αποτελεί έναν υποψήφιο φαρμακολογικό στόχο με αντικαρκινική δράση, καθώς αναστέλλοντας τον HIF-1α μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή της ανάπτυξης, της μετανάστευσης και διεισδυτικότητας του γλοιοβλαστώματος. Επειδή μάλιστα ο HIF-1α είναι βασικός παράγοντας ρύθμισης διαφόρων μεταβολικών ενζύμων, ο NR5A2 καθίσταται πολλά υποσχόμενος ρυθμιστής των αντίστοιχων μεταβολικών μονοπατιών.

Επίδραση NR5A2 στην αερόβια γλυκόλυση

Το βασικό χαρακτηριστικό στον μεταβολισμό του γλοιοβλαστώματος είναι η αυξημένη πρόσληψη και κατανάλωση γλυκόζης, η οποία αντί να καταναλώνεται για την παραγωγή ενέργειας μέσω του TCA, χρησιμοποιείται για την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση του NR5A2 στην έκφραση γονιδίων-στόχων του HIF-1α που συμμετέχουν στην αναερόβια γλυκόλυση. Διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα του mRNA των GLUT1, HK2, PFKFB3, PGK1, PKM και LDHA μειώνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2, ενώ τα επίπεδα του mRNA των GLUT1, PFKFB3, PGK1 και LDHA αυξάνονται στα κύτταρα U87 που έχουν υποστεί αποσιώπηση του NR5A2.

Σύμφωνα με μελέτες, η καταστολή των γλυκολυτικών ενζύμων αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη του γλοιοβλαστώματος [216] Πιο συγκεκριμένα, η αναστολή των GLUT αποτελεί μια θεραπευτική προσέγγιση για τύπους καρκίνου στους οποίους υπερεκφράζονται οι μεταφορείς [140-142], όπως το GBM, όπου και προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Η *in vitro* αναστολή της HK2 εμποδίζει την αερόβια γλυκόλυση, αυξάνει την φυσιολογική οξειδωτική αναπνοή και επάγει την απόπτωση ενισχύοντας την επιβίωση σε GB μοντέλα ξενομοσχευμάτων. [103, 144] Όσον αφορά, το ισοένζυμο 3 (PFKFB3), αποδείχτηκε πρόσφατα ότι προωθεί τον πολλαπλασιασμό. [145, 146] και αντίστοιχα η αναστολή της εμποδίζει την ανάπτυξη του όγκου [217] και την αγγειογένεση [218]. Ομοίως, η γονιδιακή καταστολή της PGK1 δυσχεραίνει την ανάπτυξη του όγκου, ενώ παράλληλα καταστέλλει τη μετανάστευση και την εισβολή των κυττάρων του γλοιώματος. Τέλος, η LDHA, η οποία είναι απαραίτητος μοριακός μεσολαβητής του φαινομένου Warburg και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του γλυκολυτικού φαινοτύπου του καρκίνου, [168] αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο καθώς η καταστολή της LDHA καθιστά τα κύτταρα περισσότερο οξειδωτικά και επιβραδύνει τον πολλαπλασιασμό. [167]

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι ο NR5A2 μειώνει σημαντικά την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την πρόσληψη της γλυκόζης και για την αερόβια γλυκόλυση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην επακόλουθη αναστολή της αερόβιας γλυκόλυσης και τελικά στην καταστολή της ανάπτυξης του γλοιοβλαστώματος.

Επίδραση NR5A2 στον μεταβολισμό των λιπιδίων

Ένα μέρος του πυροσταφυλικού από τη γλυκόλυση που μετατρέπεται εντός του μιτοχονδρίου σε κιτρικό οξύ, δεν ακολουθεί την πορεία του στον κύκλο του κιτρικού οξέος αλλά εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, όπου μετατρέπεται πάλι σε ακετυλοσυνένζυμο Α για να συμμετάσχει στη de novo σύνθεση των λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται με αυτόν τον τρόπο είτε που εισάγονται απευθείας στο κυτταρόπλασμα μπορούν να αποθηκευτούν σε λιποσταγόνες (LDs). Στο γλοιοβλάστωμα παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση λιπαρών οξέων και λιποσταγόνων, με τον HIF-1α, μάλιστα, να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν ευρέως στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Μελετώντας, την επίδραση του NR5A2 στην έκφραση γονιδίων-στόχων του HIF-1α που συμμετέχουν στη διαδικασία σύνθεσης, αποθήκευσης και αποικοδόμησης λιπιδίων είδαμε ότι τα επίπεδα του mRNA του FABP3 αυξάνονται, ενώ τα επίπεδα του mRNA των FABP7, PLIN2, CPT1A, ACLY, ACACA και FASN φαίνεται να μειώνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2. Αντίθετα, τα επίπεδα του mRNA των FABP3, FABP7 και ACACA μειώνονται στα κύτταρα shNR5A2, ενώ αυτά των PLIN2, ACLY και FASN φαίνεται να αυξάνονται.

Έρευνες έχουν δείξει ότι διάφοροι αναστολείς του λιπογενετικού μονοπατιού εμφανίζουν αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα, η παρεμπόδιση της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA (ACACA) και της ATP κιτρικής λυάσης (ACL) έχει οδηγήσει σε σημαντική μείωση της ανάπτυξης και επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων, ενώ η παρεμπόδιση της συνθάσης των λιπαρών οξέων (FASN) προκαλεί επιπλέον αύξηση της απόπτωσης [108, 111, 112, 219, 220]. Άλλες μελέτες, εστιάζουν στη σημασία της β-οξειδωσης στον καρκίνο [221] και αποδεικνύουν ότι η αναστολή την CPT1A, απαραίτητο ένζυμο για τη β-οξειδωση, εμποδίζει αντίστοιχα την αναπνοή (respiration) και ανάπτυξη των κυττάρων του γλοιώματος μέσω της επιβράδυνσης της καταβολικής δραστηριότητας.[222]. Πολλά υποσχόμενα είναι και τα αποτελέσματα ερευνών, που δείχνουν ότι η αναστολή των πρωτεϊνών FABP3/7 και PLIN2 οδηγεί σε μείωση των συνολικών επιπέδων των LDs και σε επακόλουθη μείωση της ανάπτυξης του όγκου. [88]

Συμπερασματικά, ο NR5A2 μειώνει σημαντικά την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την πρόσληψη λιπαρών οξέων, τον σχηματισμό των λιποσταγόνων και την de novo σύνθεση λιπαρών οξέων. Αυτή η αναστολή του μεταβολισμού των λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει στην καταστολή της ανάπτυξης του γλοιοβλαστώματος.

Επίδραση NR5A2 στην γλουταμινόλυση

Ο μη-ολοκληρωμένος κύκλος κιτρικού οξέος που προκύπτει, σύμφωνα με τα παραπάνω, αναπληρώνεται μέσω της γλουταμινόλυσης, κατά την οποία παρατηρείται αυξημένη πρόσληψη γλουταμίνης, που μετατρέπεται σε γλουταμικό οξύ και στη συνέχεια σε α-κετογλουταρικό. Στο γλοιοβλάστωμα εντοπίζεται αυξημένη έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την γλουταμινάση GLS, η έκφραση μάλιστα του οποίου ενισχύεται από τον HIF-1α. Συγκεκριμένα, διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα του mRNA της GLS μειώνονται στα κύτταρα U87-MG που υπερεκφράζουν τον NR5A2 αλλά και σε αυτά που έχουν υποστεί αποσιώπηση του υποδοχέα.

Σύμφωνα με μελέτες, η αναστολή της GLS σχετίζεται με αντίστοιχη αναστολή της ανάπτυξης του γλοιοβλαστώματος[223] αλλά και με επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων.[224]

Συμπερασματικά, ο NR5A2 μειώνοντας την έκφραση της γλουταμινάσης μπορεί να οδηγήσει σε αντίστοιχη μείωση της ανάπτυξης του όγκου.

Κλινικές ενδείξεις καθιστούν τον NR5A2 πιθανό θεραπευτικό στόχο με αντικαρκινική δράση

Κλινικά δεδομένα που αντλήσαμε από τη βάση δεδομένων TCGA δείχνουν ότι τα επίπεδα των mRNA των HK2, PFKFB3, PGK1, LDHA, FABP7, PLIN2, ACLY, GLS αλλά και του HIF-1α εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική αύξηση στα δείγματα ασθενών με γλοιοβλάστωμα συγκριτικά με δείγματα υγείων ατόμων. Τα ευρήματα αυτά είναι σημαντικά καθώς αναδεικνύουν ένα πιθανό ρόλο των γονιδίων αυτών ως βιοδείκτες του γλοιοβλαστώματος.

Κλινικά δεδομένα που αντλήσαμε, επίσης, από τη βάση δεδομένων TCGA δείχνουν ότι η μειωμένη έκφραση των γονιδίων LDHA, PLIN2 και FABP7 σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα φαίνεται να σχετίζεται με αύξηση του ποσοστού επιβίωσής τους. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν τα συγκεκριμένα γονίδια πιθανούς θεραπευτικούς στόχους. Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι NR5A2 αναστέλλει την έκφραση αυτών γονιδίων και μπορεί πιθανώς με αυτόν τον τρόπο να αυξάνει το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με γλοιοβλάστωμα.

Μελλοντικοί στόχοι

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η υπερέκφραση του NR5A2 φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα του HIF-1α τόσο σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 όσο και σε κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y. Προκειμένου, όμως, να επιβεβαιωθεί η χρήση του NR5A2 ως ένας φαρμακολογικός στόχος για την αντιμετώπιση των νεοπλασιών του Νευρικού Συστήματος είναι σημαντικό να μελετήσουμε και άλλες κυτταρικές σειρές του εγκεφάλου.

Θα ήταν ενδιαφέρον να επαναληφθεί η συγκεκριμένη ανάλυση κατόπιν επαγωγής του HIF-1α. Αυτό είναι δυνατό να γίνει με καλλιέργεια των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες. Έτσι, θα μπορέσουμε να δούμε αν η επαγωγή του HIF-1α λειτουργεί ανασταλτικά στο αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του NR5A2 στην έκφραση των διαφόρων μεταβολικών γονιδίων και να διαπιστώσουμε αν αυτό το αποτέλεσμα τελικά εξαρτάται από τον HIF-1α.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η χρήση μικρών συνθετικών μορίων που δρουν ως αγωνιστές του NR5A2, μειώνει τα τριγλυκερίδια και την γλυκόζη του ορού του αίματος, ενώ βελτιώνει την ομοιοστάση των χολικών οξέων. Συνεπώς θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετήσουμε *in vivo* και την επίδραση των φαρμακευτικών αγωνιστών και ανταγωνιστών του NR5A2 στην έκφραση των μεταβολικών γονιδίων που επιλέξαμε. Συγκεκριμένα, ο αγωνιστής του NR5A2, DLPC, φαίνεται να μειώνει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των νευρικών βλαστικών κυττάρων, ενώ αυξάνει την νευρογένεση έναντι της γλοιογένεσης. Θα ήταν σημαντικό άρα να επαναλάβουμε το ίδιο πείραμα σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος υπερεκφράζοντας και αποσιωπώντας κάθε φορά των NR5A2, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και στην υποξία, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά και τον αγωνιστή DLPC.

Τέλος, θα ήταν επίσης σημαντικό να γίνει υπερέκφραση του NR5A2, ώστε να πραγματοποιηθεί CHIP-Seq και RNA-Seq (CHIP και RNA αλληλούχιση) για να βρεθούν τα γονίδια στόχοι που εμπλέκονται στη μεταβολική δράση του NR5A2. Πιο συγκεκριμένα, με το RNA seq θα μπορέσουμε να βρούμε επιπρόσθετα γονίδια που αλλάζουν (υποψήφιους στόχους) και με το CHIP-seq θα δούμε με ποια γονίδια ο NR5A2, ως μεταγραφικός παράγοντας, αλληλεπιδρά άμεσα, ώστε να ανακαλύψουμε τον υποκείμενο μηχανισμό. Με αυτόν τον τρόπο προσπαθούμε διευκρινίσουμε πως μεσολαβείται η αντικαρκινική δράση και αν αυτή γίνεται μέσω του HIF-1α ή υπάρχουν και ενδιάμεσοι στόχοι.

Αυτές οι πειραματικές προσεγγίσεις πιστεύουμε ότι θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ο NR5A2 επηρεάζει τον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων του Νευρικού Συστήματος.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly aggressive brain tumor with an exceptionally poor patient outcome. A defining hallmark of glioblastoma is altered tumor metabolism. As a support for rapid proliferation, cancer cells utilize glycolysis even in the presence of oxygen (Warburg effect) to fuel macromolecules for the synthesis of nucleotides, fatty acids, and amino acids rather than fuel the tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is a master regulator of this metabolic reprogramming and its high expression indicate a poor prognosis in glioblastoma. Thus, an understanding of the relationship between HIF-1 α and its downstream transcribed genes in GBM pathogenesis could provide future treatment options. Recent data of our lab show that NR5A2/LRH1 (Nuclear Receptor Subfamily 5 group A Member 2 or Liver Receptor Homologue 1) presents an antiproliferative and antigliogenic action and plays a protective role against GBM. In the present we investigate a correlation between the expression of NR5A2 and the levels of HIF-1 α . Additionally, we look into the effect of NR5A2 on the expression of metabolic genes-targets of HIF-1 α that are involve in glucose uptake, aerobic glycolysis, lipid metabolism (fatty acid uptake, storage, de novo biosynthesis) β -oxidation, TCA cycle and glutaminolysis. Interestingly, the overexpression of NR5A2 is correlated with downregulation of HIF-1 and alters the expression pattern of multiple metabolic genes. These results establish NR5A2 as a potential pharmacological target for the treatment of Nervous System neoplasms.

Key Words: Glioblastoma, U87 glioblastoma cell line, metabolic reprogramming, HIF-1 α , NR5A2

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM) είναι ένας πολύ επιθετικός όγκος του εγκεφάλου με εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά επιβίωσης των ασθενών. Βασικό χαρακτηριστικό του γλοιοβλαστώματος αποτελεί ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός. Προκειμένου να υποστηρίξουν τον ραγδαίο πολλαπλασιασμό τα καρκινικά κύτταρα ευνοούν τη γλυκόλυση ακόμα και παρουσία οξυγόνου (Warburg effect), ώστε να εξασφαλίσουν τα απαραίτητα μακρομόρια για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων, λιπαρών οξέων και αμινοξέων, αντί να τροφοδοτήσουν τον κύκλο κιτρικού οξέος και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ο επαγόμενος από υποξία παράγοντας-1α (HIF-1α) είναι ο κύριος ρυθμιστής αυτής της μεταβολικής προσαρμογής και η υψηλή έκφρασή του υποδεικνύει κακή πρόγνωση στο γλοιοβλάστωμα. Η κατανόηση, λοιπόν, της επίδρασης του HIF-1α στην έκφραση μεταβολικών γονιδίων στο GBM θα μπορούσε να προσφέρει μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους. Πρόσφατα δεδομένα του εργαστηρίου μας δείχνουν πως ο NR5A2/LRH1 (Nuclear Receptor Subfamily 5 group A Member 2 or Liver Receptor Homologue 1) παρουσιάζει μια αντιπολλαπλασιαστική και αντιγλοιογενετική δράση και κατέχει έναν προστατευτικό ρόλο απέναντι στο GBM. Στην παρούσα μελέτη, διερευνούμε μία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του NR5A2 με τα επίπεδα του HIF-1α. Εξετάζουμε, επιπλέον, την επίδραση του NR5A2 στην έκφραση μεταβολικών γονιδίων-στόχων του HIF-1α που εμπλέκονται στην πρόσληψη γλυκόζης, στην αερόβια γλυκόλυση, στον μεταβολισμό των λιπιδίων (πρόσληψη λιπαρών οξέων, αποθήκευση, de novo βιοσύνθεση), στη β-οξείδωση, στον κύκλο TCA και στη γλουταμινόλυση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η υπερέκφραση του NR5A2 σχετίζεται με την μείωση του HIF-1, το σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης, και μεταβάλλει το πρότυπο έκφρασης σημαντικών μεταβολικών γονιδίων. Τέτοιες ενδείξεις, καθιστούν τον NR5A2 ως πιθανό φαρμακολογικό στόχο για τη θεραπεία των νεοπλασμιών του Νευρικού Συστήματος.

Λέξεις Κλειδιά: Γλοιοβλάστωμα, κυτταρική σειρά U87, μεταβολικός επαναπρογραμματισμός, HIF-1α, NR5A2

Βιβλιογραφία

1. von Bartheld, C.S., J. Bahney, and S. Herculano-Houzel, *The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting*. J Comp Neurol, 2016. **524**(18): p. 3865-3895.
2. Barres, B.A., *The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease*. Neuron, 2008. **60**(3): p. 430-40.
3. Zuchero, J.B. and B.A. Barres, *Glia in mammalian development and disease*. Development, 2015. **142**(22): p. 3805-9.
4. Fields, R.D., D.H. Woo, and P.J. Basser, *Glial Regulation of the Neuronal Connectome through Local and Long-Distant Communication*. Neuron, 2015. **86**(2): p. 374-86.
5. Casano, A.M. and F. Peri, *Microglia: multitasking specialists of the brain*. Dev Cell, 2015. **32**(4): p. 469-77.
6. Bercury, K.K. and W.B. Macklin, *Dynamics and mechanisms of CNS myelination*. Dev Cell, 2015. **32**(4): p. 447-58.
7. Rey, S., B. Zalc, and C. Klambt, *Evolution of glial wrapping: A new hypothesis*. Dev Neurobiol, 2020.
8. Traiffort, E., et al., *Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions*. Front Cell Neurosci, 2020. **14**: p. 79.
9. Allen, N.J. and D.A. Lyons, *Glia as architects of central nervous system formation and function*. Science, 2018. **362**(6411): p. 181-185.
10. Chung, W.S., et al., *Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease?* Nat Neurosci, 2015. **18**(11): p. 1539-1545.
11. Phatnani, H. and T. Maniatis, *Astrocytes in neurodegenerative disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(6).
12. Griffiths, B.B., A. Bhutani, and C.M. Stary, *Adult neurogenesis from reprogrammed astrocytes*. Neural Regen Res, 2020. **15**(6): p. 973-979.
13. Tran, M.D. and J.T. Neary, *Purinergic signaling induces thrombospondin-1 expression in astrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9321-6.
14. Lovatt, D., et al., *The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex*. J Neurosci, 2007. **27**(45): p. 12255-66.
15. Cahoy, J.D., et al., *A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function*. J Neurosci, 2008. **28**(1): p. 264-78.
16. Jessen, K.R., *Glial cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1861-7.
17. Allen, N.J., *Astrocyte Regulation of Synaptic Behavior*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2014. **30**(1): p. 439-463.
18. Pellerin, L., et al., *Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update*. Glia, 2007. **55**(12): p. 1251-62.
19. Janzer, R.C. and M.C. Raff, *Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells*. Nature, 1987. **325**(6101): p. 253-7.
20. Yang, H., et al., *De-differentiation response of cultured astrocytes to injury induced by scratch or conditioned culture medium of scratch-insulted astrocytes*. Cell Mol Neurobiol, 2009. **29**(4): p. 455-73.
21. Rakic, P., *Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective*. Glia, 2003. **43**(1): p. 19-32.
22. Roy, P.S. and B.J. Saikia, *Cancer and cure: A critical analysis*. Indian J Cancer, 2016. **53**(3): p. 441-442.
23. Graham, T.A. and A. Sottoriva, *Measuring cancer evolution from the genome*. J Pathol, 2017. **241**(2): p. 183-191.
24. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
25. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
26. Kleihues, P., et al., *The WHO classification of tumors of the nervous system*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(3): p. 215-25; discussion 226-9.

27. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
28. Karcher, S., et al., *Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2182-9.
29. Moore, M.P., et al., *Intracranial tumors*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1996. **26**(4): p. 759-77.
30. Jawhari, S., M.H. Ratinaud, and M. Verdier, *Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone 'menage-a-trois'*. Cell Death Dis, 2016. **7**(10): p. e2434.
31. Kabat, G.C., A.M. Etgen, and T.E. Rohan, *Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(10): p. 2421-7.
32. Tso, C.L., et al., *Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 159-67.
33. Kleihues, P. and H. Ohgaki, *Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis*. Neuro Oncol, 1999. **1**(1): p. 44-51.
34. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
35. Krex, D., et al., *Long-term survival with glioblastoma multiforme*. Brain, 2007. **130**(Pt 10): p. 2596-606.
36. Lakhan, S.E. and L. Harle, *Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: a case report and review of the literature*. J Med Case Rep, 2009. **3**: p. 87.
37. Hur, H., et al., *Cerebellar glioblastoma multiforme in an adult*. J Korean Neurosurg Soc, 2008. **43**(4): p. 194-7.
38. Zhen, L., et al., *Multiple extracranial metastases from secondary glioblastoma multiforme: a case report and review of the literature*. J Neurooncol, 2010. **97**(3): p. 451-7.
39. Birbilis, T.A., et al., *Spinal metastasis of glioblastoma multiforme: an uncommon suspect?* Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(7): p. E264-9.
40. Lun, M., et al., *The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme*. J Neurooncol, 2011. **105**(2): p. 261-73.
41. Robert, M. and M. Wastie, *Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases*. Biomed Imaging Interv J, 2008. **4**(1): p. e3.
42. Mujic, A., et al., *Extracranial metastases of a glioblastoma multiforme to the pleura, small bowel and pancreas*. J Clin Neurosci, 2006. **13**(6): p. 677-81.
43. Widjaja, A., et al., *Uncommon metastasis of a glioblastoma multiforme in liver and spleen*. Digestion, 2000. **61**(3): p. 219-22.
44. al-Rikabi, A.C., et al., *Metastatic deposits of a high-grade malignant glioma in cervical lymph nodes diagnosed by fine needle aspiration (FNA) cytology--case report and literature review*. Cytopathology, 1997. **8**(6): p. 421-7.
45. Jamjoom, A.B., et al., *Cervical lymph node metastasis from a glioblastoma multiforme in a child: Report of a case and a review of the literature*. Ann Saudi Med, 1997. **17**(3): p. 340-3.
46. Wallace, C.J., P.A. Forsyth, and D.R. Edwards, *Lymph node metastases from glioblastoma multiforme*. AJNR Am J Neuroradiol, 1996. **17**(10): p. 1929-31.
47. Tysnes, B.B. and R. Mahesparan, *Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets*. J Neurooncol, 2001. **53**(2): p. 129-47.
48. Huse, J.T. and E.C. Holland, *Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(5): p. 319-31.
49. Diskin, C. and E.M. Palsson-McDermott, *Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 270.
50. Bonora, M., et al., *ATP synthesis and storage*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 343-57.
51. Abd Algfoor, Z., et al., *Identification of metabolic pathways using pathfinding approaches: a systematic review*. Brief Funct Genomics, 2017. **16**(2): p. 87-98.
52. Mergenthaler, P., et al., *Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function*. Trends Neurosci, 2013. **36**(10): p. 587-97.

53. Nehlig, A., *Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004. **70**(3): p. 265-75.
54. Flamholz, A., et al., *Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(24): p. 10039-44.
55. Mueckler, M. and B. Thorens, *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 121-38.
56. Marie, S.K. and S.M. Shinjo, *Metabolism and brain cancer*. Clinics (Sao Paulo), 2011. **66 Suppl 1**: p. 33-43.
57. Jin, L. and Y. Zhou, *Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors*. Oncol Lett, 2019. **17**(5): p. 4213-4221.
58. Stincone, A., et al., *The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2015. **90**(3): p. 927-63.
59. Kathagen-Buhmann, A., et al., *Glycolysis and the pentose phosphate pathway are differentially associated with the dichotomous regulation of glioblastoma cell migration versus proliferation*. Neuro Oncol, 2016. **18**(9): p. 1219-29.
60. Chung, S.T., et al., *Measurements of Gluconeogenesis and Glycogenolysis: A Methodological Review*. Diabetes, 2015. **64**(12): p. 3996-4010.
61. Santos, A.L. and G. Preta, *Lipids in the cell: organisation regulates function*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(11): p. 1909-1927.
62. Jo, Y., et al., *Regulation of Lipid Metabolism and Beyond*. Int J Endocrinol, 2016. **2016**: p. 5415767.
63. Stremmel, W., et al., *A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 981-9.
64. Bennett, M.J., et al., *Novel mutations in CPT 1A define molecular heterogeneity of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency*. Mol Genet Metab, 2004. **82**(1): p. 59-63.
65. Akkaoui, M., et al., *Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids*. Biochem J, 2009. **420**(3): p. 429-38.
66. Adeva-Andany, M.M., et al., *Mitochondrial beta-oxidation of saturated fatty acids in humans*. Mitochondrion, 2019. **46**: p. 73-90.
67. Maher, M., et al., *Epigenetic-Transcriptional Regulation of Fatty Acid Metabolism and Its Alterations in Leukaemia*. Front Genet, 2018. **9**: p. 405.
68. Kastaniotis, A.J., et al., *Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017. **1862**(1): p. 39-48.
69. Deberardinis, R.J., et al., *Brick by brick: metabolism and tumor cell growth*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 54-61.
70. Ducharme, N.A. and P.E. Bickel, *Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 942-9.
71. Farese, R.V., Jr. and T.C. Walther, *Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T*. Cell, 2009. **139**(5): p. 855-60.
72. Martin, S. and R.G. Parton, *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 373-8.
73. Beckman, M., *Great Balls of Fat*. Science, 2006. **311**(5765): p. 1232-1234.
74. Xu, S., X. Zhang, and P. Liu, *Lipid droplet proteins and metabolic diseases*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018. **1864**(5 Pt B): p. 1968-1983.
75. Welte, M.A., *Expanding roles for lipid droplets*. Curr Biol, 2015. **25**(11): p. R470-81.
76. Bender, T. and J.C. Martinou, *The mitochondrial pyruvate carrier in health and disease: To carry or not to carry?* Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(10): p. 2436-42.
77. Hui, S., et al., *Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate*. Nature, 2017. **551**(7678): p. 115-118.
78. Williams, N.C. and L.A.J. O'Neill, *A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 141.
79. Zhao, S., et al., *ATP-Citrate Lyase Controls a Glucose-to-Acetate Metabolic Switch*. Cell Rep, 2016. **17**(4): p. 1037-1052.

80. Gill, A.J., *Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient neoplasia*. *Histopathology*, 2018. **72**(1): p. 106-116.
81. Yang, C., et al., *Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport*. *Mol Cell*, 2014. **56**(3): p. 414-24.
82. Barros, L.F., *Metabolic signaling by lactate in the brain*. *Trends Neurosci*, 2013. **36**(7): p. 396-404.
83. Herrero-Mendez, A., et al., *The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(6): p. 747-52.
84. Halim, N.D., et al., *Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons*. *Glia*, 2010. **58**(10): p. 1168-76.
85. Camandola, S. and M.P. Mattson, *Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration*. *EMBO J*, 2017. **36**(11): p. 1474-1492.
86. Belanger, M., I. Allaman, and P.J. Magistretti, *Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation*. *Cell Metab*, 2011. **14**(6): p. 724-38.
87. Venneti, S. and C.B. Thompson, *Metabolic Reprogramming in Brain Tumors*. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2017. **12**(1): p. 515-545.
88. Agnihotri, S. and G. Zadeh, *Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions*. *Neuro Oncol*, 2016. **18**(2): p. 160-72.
89. Phan, L.M., S.C. Yeung, and M.H. Lee, *Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies*. *Cancer Biol Med*, 2014. **11**(1): p. 1-19.
90. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *The Metabolism of Tumors in the Body*. *J Gen Physiol*, 1927. **8**(6): p. 519-30.
91. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
92. Ward, P.S. and C.B. Thompson, *Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(3): p. 297-308.
93. Wellen, K.E. and C.B. Thompson, *Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess*. *Mol Cell*, 2010. **40**(2): p. 323-32.
94. Lunt, S.Y. and M.G. Vander Heiden, *Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 441-64.
95. Vander Heiden, M.G., et al., *Metabolic pathway alterations that support cell proliferation*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011. **76**: p. 325-34.
96. Coelho, R.G., R.S. Fortunato, and D.P. Carvalho, *Metabolic Reprogramming in Thyroid Carcinoma*. *Front Oncol*, 2018. **8**: p. 82.
97. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
98. Brennan, C.W., et al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. *Cell*, 2013. **155**(2): p. 462-77.
99. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. *Nature*, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
100. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. *Science*, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
101. Oudard, S., et al., *High glycolysis in gliomas despite low hexokinase transcription and activity correlated to chromosome 10 loss*. *Br J Cancer*, 1996. **74**(6): p. 839-45.
102. Cairns, R.A., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Regulation of cancer cell metabolism*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(2): p. 85-95.
103. Wolf, A., et al., *Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme*. *J Exp Med*, 2011. **208**(2): p. 313-26.
104. Zhao, Y., E.B. Butler, and M. Tan, *Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e532.
105. Draoui, N. and O. Feron, *Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments*. *Dis Model Mech*, 2011. **4**(6): p. 727-32.
106. Mullen, A.R., et al., *Oxidation of alpha-ketoglutarate is required for reductive carboxylation in cancer cells with mitochondrial defects*. *Cell Rep*, 2014. **7**(5): p. 1679-1690.

107. Berwick, D.C., et al., *The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 33895-900.
108. Beckner, M.E., et al., *Identification of ATP citrate lyase as a positive regulator of glycolytic function in glioblastomas*. Int J Cancer, 2010. **126**(10): p. 2282-95.
109. Wang, H.Q., et al., *Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells*. Oncogene, 2005. **24**(22): p. 3574-82.
110. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 763-77.
111. Yang, C.S., et al., *Fatty acid synthase inhibition engages a novel caspase-2 regulatory mechanism to induce ovarian cancer cell death*. Oncogene, 2015. **34**(25): p. 3264-72.
112. Yan, C., et al., *The mTOR inhibitor rapamycin synergizes with a fatty acid synthase inhibitor to induce cytotoxicity in ER/HER2-positive breast cancer cells*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97697.
113. Petovari, G., et al., *Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells*. Pathol Oncol Res, 2020. **26**(1): p. 23-33.
114. Benjamin, D.I., B.F. Cravatt, and D.K. Nomura, *Global profiling strategies for mapping dysregulated metabolic pathways in cancer*. Cell Metab, 2012. **16**(5): p. 565-77.
115. Chinopoulos, C. and T.N. Seyfried, *Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis*. ASN Neuro, 2018. **10**: p. 1759091418818261.
116. Panosyan, E.H., et al., *Clinical aggressiveness of malignant gliomas is linked to augmented metabolism of amino acids*. J Neurooncol, 2016. **128**(1): p. 57-66.
117. Koch, K., et al., *A comparative pharmaco-metabolomic study of glutaminase inhibitors in glioma stem-like cells confirms biological effectiveness but reveals differences in target-specificity*. Cell Death Discov, 2020. **6**: p. 20.
118. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
119. Dang, C.V., *Glutaminolysis: supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells?* Cell Cycle, 2010. **9**(19): p. 3884-6.
120. Dang, C.V., A. Le, and P. Gao, *MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(21): p. 6479-83.
121. Hensley, C.T., A.T. Wasti, and R.J. DeBerardinis, *Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities*. J Clin Invest, 2013. **123**(9): p. 3678-84.
122. Dang, C.V., et al., *Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis*. J Bioenerg Biomembr, 1997. **29**(4): p. 345-54.
123. Dang, C.V., et al., *Therapeutic targeting of cancer cell metabolism*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(3): p. 205-12.
124. Sondergaard, K.L., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in tumours of patients with glioblastoma*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2002. **28**(3): p. 210-7.
125. Jewell, U.R., et al., *Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1312-4.
126. Huang, L.E., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7987-92.
127. Salceda, S. and J. Caro, *Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22642-7.
128. Majmundar, A.J., W.J. Wong, and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 294-309.
129. Papandreou, I., et al., *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 187-97.
130. Rankin, E.B. and A.J. Giaccia, *The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 678-85.
131. Zundel, W., et al., *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 391-6.

132. Wang, G., et al., *Advances in the targeting of HIF-1alpha and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme (Review)*. *Oncol Rep*, 2017. **37**(2): p. 657-670.
133. Miranda-Goncalves, V., et al., *Hypoxia-mediated upregulation of MCT1 expression supports the glycolytic phenotype of glioblastomas*. *Oncotarget*, 2016. **7**(29): p. 46335-46353.
134. Kaluz, S., M. Kaluzova, and E.J. Stanbridge, *Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element*. *Clin Chim Acta*, 2008. **395**(1-2): p. 6-13.
135. Yeung, S.J., J. Pan, and M.H. Lee, *Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(24): p. 3981-99.
136. Kaelin, W.G., Jr., *The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(11): p. 865-73.
137. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(10): p. 721-32.
138. Boroughs, L.K. and R.J. DeBerardinis, *Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(4): p. 351-9.
139. Christofk, H.R., et al., *The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth*. *Nature*, 2008. **452**(7184): p. 230-3.
140. Womeldorff, M., D. Gillespie, and R.L. Jensen, *Hypoxia-inducible factor-1 and associated upstream and downstream proteins in the pathophysiology and management of glioblastoma*. *Neurosurg Focus*, 2014. **37**(6): p. E8.
141. Labak, C.M., et al., *Glucose transport: meeting the metabolic demands of cancer, and applications in glioblastoma treatment*. *Am J Cancer Res*, 2016. **6**(8): p. 1599-608.
142. Libby, C.J., et al., *Identification of Compounds That Decrease Glioblastoma Growth and Glucose Uptake in Vitro*. *ACS Chem Biol*, 2018. **13**(8): p. 2048-2057.
143. Stubbs, M. and J.R. Griffiths, *The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect*. *Adv Enzyme Regul*, 2010. **50**(1): p. 44-55.
144. Wolf, A., et al., *Developmental profile and regulation of the glycolytic enzyme hexokinase 2 in normal brain and glioblastoma multiforme*. *Neurobiol Dis*, 2011. **44**(1): p. 84-91.
145. Deprez, J., et al., *Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(28): p. 17269-75.
146. Clem, B., et al., *Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(1): p. 110-20.
147. Daskalaki, I., I. Gkikas, and N. Tavernarakis, *Hypoxia and Selective Autophagy in Cancer Development and Therapy*. *Front Cell Dev Biol*, 2018. **6**: p. 104.
148. Masoud, G.N. and W. Li, *HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy*. *Acta Pharm Sin B*, 2015. **5**(5): p. 378-89.
149. Gui, D.Y., C.A. Lewis, and M.G. Vander Heiden, *Allosteric regulation of PKM2 allows cellular adaptation to different physiological states*. *Sci Signal*, 2013. **6**(263): p. pe7.
150. Yang, W. and Z. Lu, *Regulation and function of pyruvate kinase M2 in cancer*. *Cancer Lett*, 2013. **339**(2): p. 153-8.
151. Kefas, B., et al., *Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(11): p. 1102-12.
152. Yang, W., et al., *Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation*. *Nature*, 2011. **480**(7375): p. 118-22.
153. Desai, S., et al., *Tissue-specific isoform switch and DNA hypomethylation of the pyruvate kinase PKM gene in human cancers*. *Oncotarget*, 2014. **5**(18): p. 8202-10.
154. Soeda, A., et al., *The evidence of glioblastoma heterogeneity*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 7979.
155. de Wit, R.H., et al., *Human cytomegalovirus encoded chemokine receptor US28 activates the HIF-1alpha/PKM2 axis in glioblastoma cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(42): p. 67966-67985.
156. Dietl, K., et al., *Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes*. *J Immunol*, 2010. **184**(3): p. 1200-9.
157. Gottfried, E., et al., *Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression*. *Blood*, 2006. **107**(5): p. 2013-21.

158. Fischer, K., et al., *Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3812-9.
159. Sonveaux, P., et al., *Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33418.
160. Vegran, F., et al., *Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis*. Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2550-60.
161. Doherty, J.R. and J.L. Cleveland, *Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics*. J Clin Invest, 2013. **123**(9): p. 3685-92.
162. Kim, J.W., et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 177-85.
163. Illsley, N.P., I. Caniggia, and S. Zamudio, *Placental metabolic reprogramming: do changes in the mix of energy-generating substrates modulate fetal growth?* Int J Dev Biol, 2010. **54**(2-3): p. 409-19.
164. Semenza, G.L., *Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1*. Biochem J, 2007. **405**(1): p. 1-9.
165. Denko, N.C., *Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(9): p. 705-13.
166. Thomas, L.W. and M. Ashcroft, *Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(9): p. 1759-1777.
167. Fantin, V.R., J. St-Pierre, and P. Leder, *Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance*. Cancer Cell, 2006. **9**(6): p. 425-34.
168. Daniele, S., et al., *Lactate dehydrogenase-A inhibition induces human glioblastoma multiforme stem cell differentiation and death*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 15556.
169. Zoula, S., et al., *Pimonidazole binding in C6 rat brain glioma: relation with lipid droplet detection*. Br J Cancer, 2003. **88**(9): p. 1439-44.
170. Laurenti, G., et al., *Hypoxia induces peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and lipid metabolism peroxisomal enzymes in human glioblastoma cells*. J Cell Biochem, 2011. **112**(12): p. 3891-901.
171. Mylonis, I., et al., *Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 14): p. 3485-93.
172. Shen, G.M., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes LDL and VLDL uptake through inducing VLDLR under hypoxia*. Biochem J, 2012. **441**(2): p. 675-83.
173. Bozza, P.T. and J.P. Viola, *Lipid droplets in inflammation and cancer*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 243-50.
174. Bensaad, K., et al., *Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1alpha contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation*. Cell Rep, 2014. **9**(1): p. 349-365.
175. Koundouros, N. and G. Poulogiannis, *Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer*. Br J Cancer, 2020. **122**(1): p. 4-22.
176. Lewis, C.A., et al., *SREBP maintains lipid biosynthesis and viability of cancer cells under lipid- and oxygen-deprived conditions and defines a gene signature associated with poor survival in glioblastoma multiforme*. Oncogene, 2015. **34**(40): p. 5128-40.
177. Furuta, E., et al., *Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 1003-11.
178. Ni, T., et al., *Oroxylin A suppresses the development and growth of colorectal cancer through reprogram of HIF1alpha-modulated fatty acid metabolism*. Cell Death Dis, 2017. **8**(6): p. e2865.
179. Stegen, S., et al., *Adequate hypoxia inducible factor 1alpha signaling is indispensable for bone regeneration*. Bone, 2016. **87**: p. 176-86.
180. Mates, J.M., et al., *Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer*. Semin Cell Dev Biol, 2020. **98**: p. 34-43.
181. Metallo, C.M., et al., *Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia*. Nature, 2011. **481**(7381): p. 380-4.
182. Anastasiou, D., *Tumour microenvironment factors shaping the cancer metabolism landscape*. Br J Cancer, 2017. **116**(3): p. 277-286.

183. Mazaira, G.I., et al., *The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges*. Nucl Receptor Res, 2018. **5**.
184. Enmark, E. and J.A. Gustafsson, *Oestrogen receptors - an overview*. J Intern Med, 1999. **246**(2): p. 133-8.
185. Kliewer, S.A., J.M. Lehmann, and T.M. Willson, *Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse*. Science, 1999. **284**(5415): p. 757-60.
186. Fayard, E., J. Auwerx, and K. Schoonjans, *LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(5): p. 250-60.
187. Krylova, I.N., et al., *Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1*. Cell, 2005. **120**(3): p. 343-55.
188. Ueda, H., et al., *A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5667-72.
189. Lee, Y.K. and D.D. Moore, *Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2463-7.
190. Solomon, I.H., et al., *Crystal structure of the human LRH-1 DBD-DNA complex reveals Ftz-F1 domain positioning is required for receptor activity*. J Mol Biol, 2005. **354**(5): p. 1091-102.
191. Grgurevic, N., S. Tobet, and G. Majdic, *Widespread expression of liver receptor homolog 1 in mouse brain*. Neuro Endocrinol Lett, 2005. **26**(5): p. 541-7.
192. Galarneau, L., et al., *The alpha1-fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the Drosophila FTZ-F1 family*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3853-65.
193. Heng, J.C., et al., *The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(2): p. 167-74.
194. Gu, P., et al., *Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(9): p. 3492-505.
195. Sun, G. and Y. Shi, *Nuclear receptors in stem cells and their therapeutic potential*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(13): p. 1299-306.
196. Nitta, M., et al., *CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6660-5.
197. Qin, J., et al., *Prospero-related homeobox (Prox1) is a corepressor of human liver receptor homolog-1 and suppresses the transcription of the cholesterol 7-alpha-hydroxylase gene*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(10): p. 2424-39.
198. Steffensen, K.R., et al., *Functional conservation of interactions between a homeodomain cofactor and a mammalian FTZ-F1 homologue*. EMBO Rep, 2004. **5**(6): p. 613-9.
199. Kamiya, A., et al., *Prospero-related homeobox 1 and liver receptor homolog 1 coordinately regulate long-term proliferation of murine fetal hepatoblasts*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 252-64.
200. Schoonjans, K., et al., *Liver receptor homolog 1 contributes to intestinal tumor formation through effects on cell cycle and inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 2058-62.
201. Chand, A.L., et al., *The orphan nuclear receptor LRH-1 promotes breast cancer motility and invasion*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(4): p. 965-75.
202. Benod, C., et al., *Nuclear receptor liver receptor homologue 1 (LRH-1) regulates pancreatic cancer cell growth and proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(41): p. 16927-31.
203. Bayrer, J.R., et al., *Silencing LRH-1 in colon cancer cell lines impairs proliferation and alters gene expression programs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(8): p. 2467-72.
204. Bianco, S., et al., *LRH-1 controls proliferation in breast tumor cells by regulating CDKN1A gene expression*. Oncogene, 2015. **34**(34): p. 4509-18.
205. Lin, Q., et al., *LRH1 promotes pancreatic cancer metastasis*. Cancer Lett, 2014. **350**(1-2): p. 15-24.
206. Petersen, G.M., et al., *A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33*. Nat Genet, 2010. **42**(3): p. 224-8.
207. Zhang, X., et al., *Associations of NR5A2 gene polymorphisms with the clinicopathological characteristics and survival of gastric cancer*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(12): p. 22902-17.

208. Botrugno, O.A., et al., *Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 499-509.
209. Hegi, M.E., et al., *Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(6): p. 1871-4.
210. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
211. Huang, D., C. Li, and H. Zhang, *Hypoxia and cancer cell metabolism*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(3): p. 214-9.
212. Fujiwara, S., et al., *Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas*. Int J Oncol, 2007. **30**(4): p. 793-802.
213. Chen, Z., et al., *In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells*. J Neurooncol, 2009. **92**(2): p. 121-8.
214. Helbig, L., et al., *BAY 87-2243, a novel inhibitor of hypoxia-induced gene activation, improves local tumor control after fractionated irradiation in a schedule-dependent manner in head and neck human xenografts*. Radiat Oncol, 2014. **9**: p. 207.
215. Kessler, J., et al., *HIF-1alpha inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 605.
216. Sanzey, M., et al., *Comprehensive analysis of glycolytic enzymes as therapeutic targets in the treatment of glioblastoma*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0123544.
217. Lu, L., Y. Chen, and Y. Zhu, *The molecular basis of targeting PFKFB3 as a therapeutic strategy against cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(37): p. 62793-62802.
218. Xu, Y., et al., *Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(6): p. 1231-9.
219. Flavin, R., et al., *Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer*. Future Oncol, 2010. **6**(4): p. 551-62.
220. Wang, C., et al., *Acetyl-CoA carboxylase- α as a novel target for cancer therapy*. Front Biosci (Schol Ed), 2010. **2**: p. 515-26.
221. Khasawneh, J., et al., *Inflammation and mitochondrial fatty acid beta-oxidation link obesity to early tumor promotion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3354-9.
222. Lin, H., et al., *Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells*. Neuro Oncol, 2017. **19**(1): p. 43-54.
223. Liu, Z., et al., *MicroRNA-153 regulates glutamine metabolism in glioblastoma through targeting glutaminase*. Tumour Biol, 2017. **39**(2): p. 1010428317691429.
224. Zhang, J., et al., *Inhibition of GLS suppresses proliferation and promotes apoptosis in prostate cancer*. Biosci Rep, 2019. **39**(6).