

BORSA DI STUDIO SIF PER ATTIVITA' DI RICERCA ALL'ESTERO
RELAZIONE FINALE

Socio giovane: Nicola Consolini

"IL LATO OSCURO DI NRF2"

Studio pilota di metabolomica *in vivo*, circa il ruolo di Nrf2 nella glicolisi delle cellule neoplastiche, in un modello murino di cancro polmonare non a piccole cellule (NSCLC) Kras^{G12D} indotto

Consolini N.¹, Singh A.², Lane A.³, Higashi R.³, Fan T.³, Biswal S.², Hrelia P.¹

¹Dep. Pharmacy and Biotechnology, FaBit, Alma Mater University of Bologna, Italy; ²Dep. Environmental Health Sciences, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD, USA; ³Dept. of Toxicology & Cancer Biology/Markey Cancer Center, Univ. of Kentucky, Lexington, KY, USA.

ROS, STRESS OSSIDATIVO E CANCRO POLMONARE

Nel corso della nostra vita, siamo costantemente esposti ad una miscellanea di insulti fisici e chimici, che comprendono inquinanti ambientali, additivi alimentari, alcalodi vegetali, radiazioni ionizzanti ed ultraviolette. A questi insulti esterni, si aggiungono inoltre, molte sostanze tossiche intrinseche, prodotte dal nostro organismo fisiologicamente durante processi metabolici e durante processi patologici, comprendenti le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e citochine pro-infiammatorie. Tutti gli organismi aerobi sono fondamentalmente dipendenti dall' ossigeno, che consente (un'efficiente) produzione di energia, ma allo stesso tempo, provoca danno ossidativo alle componenti cellulari.

Nel corso degli ultimi decenni, e' divenuto sempre piu' evidente che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) esercitano una moltitudine di effetti biologici, coprendo un ampio spettro che va da funzioni fisiologiche regolatorie (difesa immunitaria, azione antibatterica, il tono vascolare e trasduzione del segnale) ad alterazioni dannose partecipanti alla patogenesi di numerose malattie.

Gli organismi viventi si sforzano di mantenere queste molecole altamente reattive sotto stretto controllo, con l'aiuto di un intricato sistema di antiossidanti. In condizioni fisiologiche, la produzione e la detossificazione di ROS sono più o meno in equilibrio, al fine di mantenere uno stato di omeostasi (omeostasi redox), ma quando l'equilibrio ossidanti / antiossidanti e' sbilanciato a favore delle specie ossidanti (eccesso di ossidanti o deplezione di antiossidanti), cio' che ne consegue e' lo stress ossidativo.

Lo stress ossidativo è una condizione patologica caratterizzata da un eccesso di ROS che, attraverso danno ossidativo alle proteine, lipidi, acidi nucleici, provoca effetti tossici cellulari, portando a lesioni dei tessuti e infiammazione, che a loro volta contribuiscono al processo di invecchiamento e all'insorgenza di malattie (cardiovascolari, polmonari, autoimmuni , disturbi neurali e cancro).

Lo stress ossidativo svolge un ruolo importante nella carcinogenesi (Valko et al., 2007). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono infatti coinvolte sia nell'insorgenza sia nella progressione del cancro e sono generate

dalle cellule tumorali attraverso l'aumento dell'attività mitocondriale e il metabolismo accelerato, necessari per la proliferazione cellulare e la crescita del tumore (Hanahan e Weinberg, 2011; Valko et al., 2007).

Il polmone, come organo preposto allo scambio gassoso, è il punto seminale di esposizione all'ossigeno e agli agenti tossici ambientali, quindi, una grande quantità di ossidanti contribuiscono ad incrementare lo stress ossidativo, innescando l'inizio e la progressione di malattie come BPCO, asma, fibrosi cistica, fibrosi polmonare idiopatica e cancro polmonare.

NRF2

Negli ultimi dieci anni la nostra visione dello stress ossidativo si è notevolmente ampliata, ed ora questo fenomeno è spesso descritto come uno squilibrio che ha le sue origini nei nostri geni, e nel modo in cui l'espressione genica è regolata.

Al centro di questo argomentazione si trova il fattore di trascrizione redox-sensibile Nrf2, nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2.

Nrf2 è un fattore di trascrizione nucleare, il "principale regolatore" degli antiossidanti e delle risposte allo stress cellulare, che mantiene l'omeostasi redox cellulare e protegge le cellule dagli insulti ossidativi, modulando l'espressione di geni codificanti: antiossidanti (SOD, ferritina, Txnrd1, Prdx1, HO-1), enzimi coinvolti nella sintesi e rigenerazione del glutathione (GCLC, GCLM, GSS, GSR), enzimi detossificanti di fase II (GST, UGT), pompe di efflusso per composti xenobiotici (MRPs), enzimi metabolici (G6PD, ME1, PGD).

Nrf2 è ubiquitariamente espresso, ma più abbondantemente lo si trova in organi coinvolti nella detossificazione di xenobiotici e cancerogeni, come il fegato, i reni e l'intestino, e negli organi continuamente esposti all'ambiente esterno, come la pelle, i polmoni e l'apparato digerente.

In condizioni normali o prive di stress, Nrf2 è legato a Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), proteina che ancora Nrf2 nel citosol, e che avvia il processo di ubiquitinazione e successiva degradazione proteasomica.

In conseguenza a condizioni di stress, il complesso Nrf2-Keap1 si dissocia e Nrf2 trasloca nel nucleo. Questa attivazione comporta la modificazione del complesso Nrf2-Keap1 attraverso la formazione di legami covalenti tra le molecole induttrici e i residui cisteinici di Keap1, o la fosforilazione di Nrf2. Nrf2 eterodimerizza con piccole proteine Maf (avian musculoaponeurotic fibrosarcoma) nel nucleo e si lega ad elementi di risposta antiossidante (AREs), all'interno delle regioni del promotore di geni citoprotettivi.

L'attivazione del pathway di Nrf2, con dosi sub-tossiche di composti naturali o sostanze chimiche sintetiche (fitochimici e derivati come sulforafano, CDDO o terapeutici come oltipraz, auranoftin), conferisce protezione in caso di successiva esposizione a tossici/cancerogeni. Pertanto, l'uso di composti alimentari o prodotti chimici sintetici volti ad aumentare la risposta adattativa Nrf2-dipendente per contrastare insulti tossici ambientali è emerso essere una strategia promettente per la prevenzione del cancro.

NRF2 E CANCRO

È interessante notare che, recenti dati hanno rivelato un ruolo diverso di NRF2 nel cancro, "il lato oscuro di Nrf2".

Crescente attenzione è stata rivolta al ruolo di Nrf2 in cellule tumorali, perché la stabilizzazione costitutiva di NRF2 è stata osservata in molti tumori umani che hanno prognosi infausta.

Nel 2006 e' stato pubblicato per la prima volta che, in alcuni campioni di pazienti con cancro ai polmoni e in alcune linee cellulari di cancro polmonare, Nrf2 è costitutivamente localizzato nel nucleo in seguito a mutazioni missense in KEAP1 (Padmanabhan et al., 2006; Singh et al., 2006). In seguito, sono stati pubblicati diversi lavori che descrivono elevata attività di Nrf2 in tumori del pancreas, cistifellea, e prostata, e inoltre sono stati scoperti nuovi meccanismi responsabili dell'iperattività del pathway Keap1-Nrf2, oltre alle mutazioni di Keap1 (Lister et al, 2011.; Shibata, Kokubu, et al., 2008; Zhang et al., 2010).

Il ruolo di NRF2 nella neoplasia polmonare, malattia per la quale esistono pochi biomarcatori, è complicato e sembra dipendere da diversi fattori principali, tra cui l'esistenza di mutazioni attivanti in NRF2 e/o mutazioni con perdita di funzione in KEAP1, che portano all' iperattività di Nrf2.

In genere, durante lo sviluppo del cancro, le cellule tumorali acquisiscono nuove caratteristiche tra cui: la rapida, continua ed incontrollata proliferazione, la capacità di eludere segnali anticrescita e di morte cellulare (apoptosi), la capacità di indurre angiogenesi, la riprogrammazione del metabolismo energetico, la capacità di invadere altri tessuti e di metastatizzare (Hanahan e Weinberg, 2011). L' iperattiva Nrf2 ha dimostrato di contribuire alla progressione di alcune di queste caratteristiche tumorali.

Nei tumori in cui Nrf2 e' sovraespresso, l'aumentata espressione di geni citoprotettivi conferisce alle cellule tumorali vantaggi per la crescita e la sopravvivenza (Shibata, Kokubu, et al., 2008; Singh et al 2008; Singh, Bodas, Wakabayashi, Bunz, e Biswal, 2010; Wang, Sun, Villeneuve, et al., 2008). Tumori con elevata attività di Nrf2 sono più resistenti alla chemio- e radioterapia [Singh et al 2008], inoltre, queste cellule tumorali sono in grado di eludere apoptosi e presentano alti tassi di proliferazione, anche se non è chiaro perché si verifichi quest'ultima.

La proliferazione cellulare è richiesta in embriogenesi, così come nella crescita e per la corretta attività (funzionalità) di diversi tessuti adulti, mentre la proliferazione cellulare aberrante è caratteristica del cancro (Hanahan e Weinberg, 2011). In cellule proliferanti, aumenta la necessità di energia e di molecole (essenziali), come aminoacidi, acidi grassi e monosaccaridi, per la generazione di macromolecole.

In condizioni aerobie, la maggior parte del glucosio assorbito dalle cellule quiescenti viene convertito in piruvato nella glicolisi, e il ciclo TCA, insieme con la fosforilazione ossidativa, è la principale via di formazione di ATP. Al contrario, in condizioni anaerobie, la glicolisi è favorita e la maggioranza del piruvato risultante viene convertito in lattato, e solo una piccola quantità di piruvato entra nel ciclo TCA.

Già nel 1920 Otto Warburg osservava come le cellule tumorali tendono a riprogrammare il loro metabolismo, e quindi a consumare maggiori quantità di glucosio rispetto alle cellule quiescenti. Inoltre, nelle cellule tumorali, anche in presenza di ossigeno, la maggior parte del glucosio viene convertito in lattato nella glicolisi aerobica invece di essere ossidato completamente nella fosforilazione ossidativa. Questo fenomeno è noto anche come "effetto Warburg" (Hanahan e Weinberg, 2011; Vander Heiden, Cantley, e Thompson, 2009; Ward e Thompson, 2012).

In alternativa alla glicolisi, il glucosio può essere metabolizzato attraverso la via del pentoso fosfato (PPP), in cui vengono generati: ribosio 5-fosfato, essenziale per la sintesi di purine (nelle cellule proliferanti), eritrosio 4-fosfato, essenziale nella sintesi degli amminoacidi aromatici, e NADPH, un importante cofattore enzimatico dell'anabolismo (cioè, la biosintesi di macromolecole cellulari) (Buchakjian & Kornbluth, 2010; Kruger & von Schaewen 2003).

E' stato recentemente osservato che diversi oncogeni attivati e geni oncosoppressori mutati, come K-Ras, Myc, e p53, sono in grado di promuovere direttamente il metabolismo e l'assorbimento dei nutrienti, con conseguenti caratteristiche simili alle cellule proliferanti [Ward & Thompson, 2012]. Oncogeni sono in grado di aumentare l'espressione basale di Nrf2, attivano la risposta antiossidante Nrf2-mediata, e abbassano i livelli cellulari di ROS in cellule murine primarie (DeNicola et al., 2011). Inoltre, cellule Nrf2-/ sono molto meno proliferative. Pertanto, si specula che Nrf2 contribuisca a promuovere la carcinogenesi e la proliferazione oncogene-iniziata (DeNicola et al., 2011).

Dato che le cellule tumorali sono soggette a riprogrammazione metabolica per sostenere la rapida sintesi di macromolecole (Ward e Thompson, 2012), è anche possibile che Nrf2 promuova la proliferazione delle cellule tumorali influenzando il metabolismo intermedio.

E' stato dimostrato in seguito che nelle cellule tumorali, Nrf2 promuove la generazione di molecole essenziali per la sintesi delle macromolecole e la proliferazione delle cellule tumorali, regolando sia direttamente che indirettamente i geni coinvolti nella biosintesi e il riciclaggio del glutathione (GSH), la produzione di NADPH, e l'attivazione della via del pentoso fosfato (PPP) (Mitsuishi et al., 2012 ; Singh et al., 2013).

La linea cellulare umana di carcinoma polmonare A549 sovraesprime costitutivamente Nrf2, perché presenta Keap1 mutante (Singh et al., 2006). A seguito di knockout di Nrf2 in cellule A549, Mitsuishi et al. (2012) hanno scoperto, utilizzando l'analisi microarray, che Nrf2 regola l'espressione di tutti e quattro gli enzimi responsabili della sintesi di NADPH (G6PD, PGD, ME1, e IDH1), in linea con l'idea che l'attività Nrf2 supporta la sintesi di macromolecole. E' interessante che, G6PD e PGD catalizzano le reazioni nel braccio ossidativo del PPP, e l'affermazione Mitsuishi et al. (2012) che Nrf2 regola anche TKT e TALDO1, che catalizzano le reazioni nel braccio non ossidativo del PPP, suggerisce il fattore di trascrizione rappresenta un controllore dominante del flusso metabolico attraverso il PPP.

In un altro studio, gli autori hanno effettuato ricerche su miRNA e hanno scoperto che Nrf2 è in grado di attenuare miR-1 e miR-206, che a sua volta porta ad una maggiore espressione dei geni PPP (Singh et al., 2013). Pertanto, è stato proposto che l'effetto di Nrf2 sul metabolismo del glucosio e', almeno parzialmente, mediata da miR-1 e miR-206, entrambi i quali sono stati precedentemente associati con il cancro (Hudson et al., 2012.; Nasser et al., 2008; Singh et al, 2013.; Wang, Ling, Bai, e Zhao, 2011).

OBIETTIVO

Le cellule tumorali consumano grandi quantità di nutrienti e mantengono alti livelli di anabolismo. Vari pathways attivati da oncogeni sono coinvolti nella modulazione del metabolismo. Nrf2 ha dimostrato di contribuire al fenotipo maligno di diversi tipi di cancro, inclusa la proliferazione aggressiva. Tuttavia, i meccanismi con i quali Nrf2 accelera la proliferazione non sono pienamente compresi.

Al fine di comprendere il ruolo di NRF2 nel metabolismo del cancro polmonare, abbiamo analizzato come, in un modello murino di tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) Kras^{G12D} indotto, il metabolismo del glucosio cambia in risposta all'iperattività di NRF2 indotta da carenza di KEAP1, sfruttando la tecnologia dello Stable Isotope Resolve Metabolomics (SIRM), che consiste nell'uso combinato di traccianti isotopici stabili e analisi di metabolomica (es. NMR, MS).

La domanda che ci siamo posti è:

NRF2 è in grado di accelerare la proliferazione delle cellule tumorali riprogrammando il metabolismo del glucosio, al fine di alimentare la via del pentoso fosfato?

METODI

NRF2 è in grado di accelerare la proliferazione delle cellule tumorali riprogrammando il metabolismo del glucosio, al fine di alimentare la via del pentoso fosfato?

Per rispondere a questa domanda, al fine di comprendere il ruolo di Nrf2 nel metabolismo del glucosio delle cellule tumorali di cancro polmonare, abbiamo usato modelli murini di cancro polmonare non a piccole cellule (NSCLC) Kras^{G12D} indotto (in particolare LSL-Kras^{G12D} /LSL-Kras^{G12D+LKB1-/-} indotto), con iperattivazione di Nrf2, indotta attraverso il knockdown di Keap1 (modelli di topo geneticamente modificati, con l'attivazione Adeno-Cre).

L'analisi è stata effettuata applicando la tecnologia dello Stable Isotope Resolve Metabolomics (SIRM), e confrontando i profili metabolici dei diversi gruppi di topi.

I topi sono stati divisi in sei genotipi differenti:

- Wild Type
- LSL-Kras^{G12D}
- NRF2 transgenic : LSL-Kras^{G12D}
- KEAP1-/- : LSL-Kras^{G12D}
- LKB1-/- : LSL-Kras^{G12D}
- KEAP1-/- : LKB1-/- : LSL-Kras^{G12D}

In seguito alla formazione dei tumori polmonari, ai topi sono stati iniettati 100 uL (20 mg) di Uniformly labeled U-¹³C₆-Glucose tracer, 3 volte ad intervalli di 15 minuti, mediante iniezione nella vena della coda. Un'ora dopo la prima iniezione i topi sono stati sacrificati e abbiamo collezionato polmoni e plasma.

I campioni di tessuto e di plasma sono stati immediatamente congelati in azoto liquido (liq N₂). Dopo aver polverizzato i polmoni in azoto liquido, abbiamo estratto la fase polare e non polare (Acetonitrile/Acqua/Cloroformio, 2:1,5:1 v/v/v), ed infine abbiamo usato la fase polare per le analisi NMR e GC-MS.

Stable Isotope Resolved Metabolomics (SIRM)

Negli ultimi dieci anni, il laboratorio della Dr.ssa T. Fan, Dr. A. Lane e Dr. R. Higashi ha sviluppato la tecnologia dello Stable Isotope Resolved Metabolomics (SIRM) per la ricerca traslazionale, da cellule attraverso modelli murini fino a pazienti umani. Il metodo SIRM permette di analizzare, su larga scala, i network metabolici alterati, in diversi sistemi modello e in soggetti umani in vivo.

Questo metodo combina l'uso di traccianti isotopici stabili con analisi di metabolomica basate su Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e Spettrometria di Massa (MS), cosicche' i modelli di etichettatura (isotopomeri di posizione da analisi NMR e isotopologhi di massa da analisi MS) dei vari metaboliti possano essere mappati per una ricostruzione solida e su larga scala dei network metabolici. Isotopomeri di posizione e isotopologhi di massa si riferiscono rispettivamente ad un determinato metabolita con diverse posizioni atomiche etichettate (ad es $^{13}\text{C}_1$ -1-Ala contro $^{13}\text{C}_1$ -2-Ala) e un diverso numero di atomi etichettati (ad esempio $^{13}\text{C}_1$ -Ala contro $^{13}\text{C}_3$ -Ala). Le informazioni sulle dinamiche delle vie metaboliche e sulla loro compartimentazione deve essere acquisita per decifrare la riprogrammazione metabolica in risposta alla patogenesi della malattia, ma e' anche utile per la scoperta di biomarcatori diagnostici, cosi' come per la scoperta di bersagli chemopreventivi e terapeutici.

RESULTATI

NMR HSQC [Fig.1]:

- elevati livelli di **13C-3-Lactate** e **13C-3-Alanine** nei gruppi LKB1-/-:LSL-Kras^{G12D}, KEAP1-/-:LKB1-/-:LSL-Kras^{G12D} rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;
- elevati livelli di **13C-4-GSH+GSSG** nei gruppi KEAP1-/-:LSL-Kras^{G12D} e KEAP1-/-:LKB1-/-:LSL-Kras^{G12D} rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;
- elevati livelli di **13C-1-βGlc+G6P** e **13C-1-αGlc+G6P** nel gruppo KEAP1-/-:LSL-Kras^{G12D} rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;

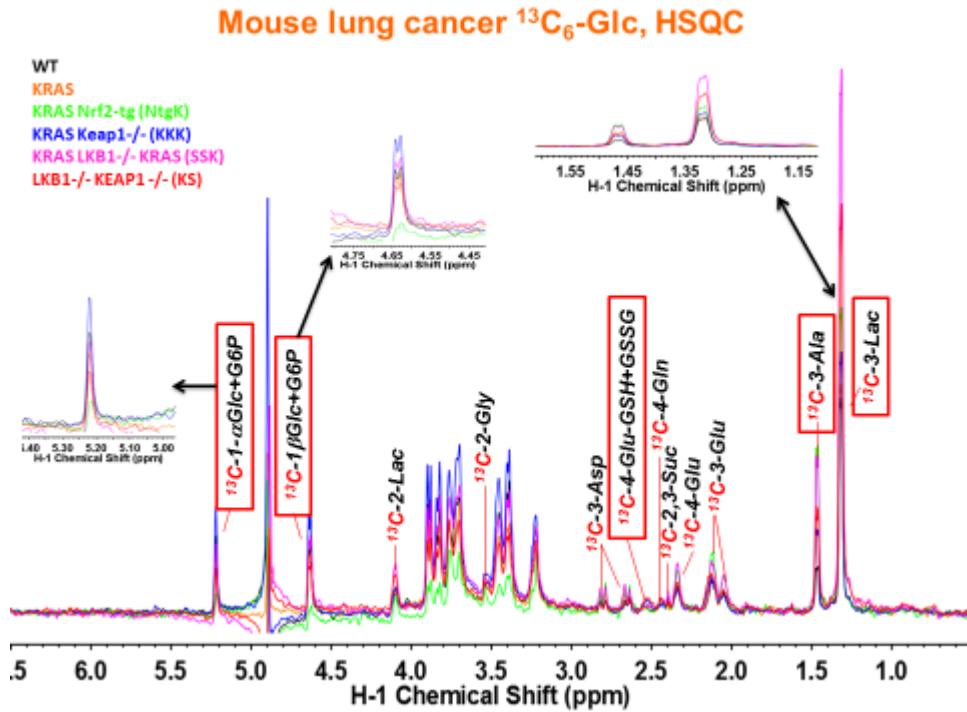


Fig. 1

NMR ^1H [Fig.2-3-4]:

- elevati livelli di **$^{12}\text{C-3-Lactate}$** e **$^{12}\text{C-3-Alanine}$** nei gruppi NRF2 tg:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$, LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$, KEAP1 $^{-/-}$:LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;
- elevati livelli di **$^{12}\text{C-4-GSH+GSSG}$** nei gruppi KEAP1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ e KEAP1 $^{-/-}$:LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;
- elevati livelli di **$^{12}\text{C-1-}\alpha\text{Glc}$** nel gruppo KEAP1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;
- elevati livelli di **$^{12}\text{C-G1-Glycogen}$** nei gruppi KEAP1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ e NRF2 tg:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;
- elevati livelli di **NAD^+** e **NADP^+** nei gruppi KEAP1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ e KEAP1 $^{-/-}$:LKB1 KD:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;
- drastica diminuzione di **AXP** (adenosine phosphate pool) nei gruppi KEAP1 $^{-/-}$:LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ e LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G12D}}$ rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;

Mouse lung cancer KD $^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$, ^1H NMR

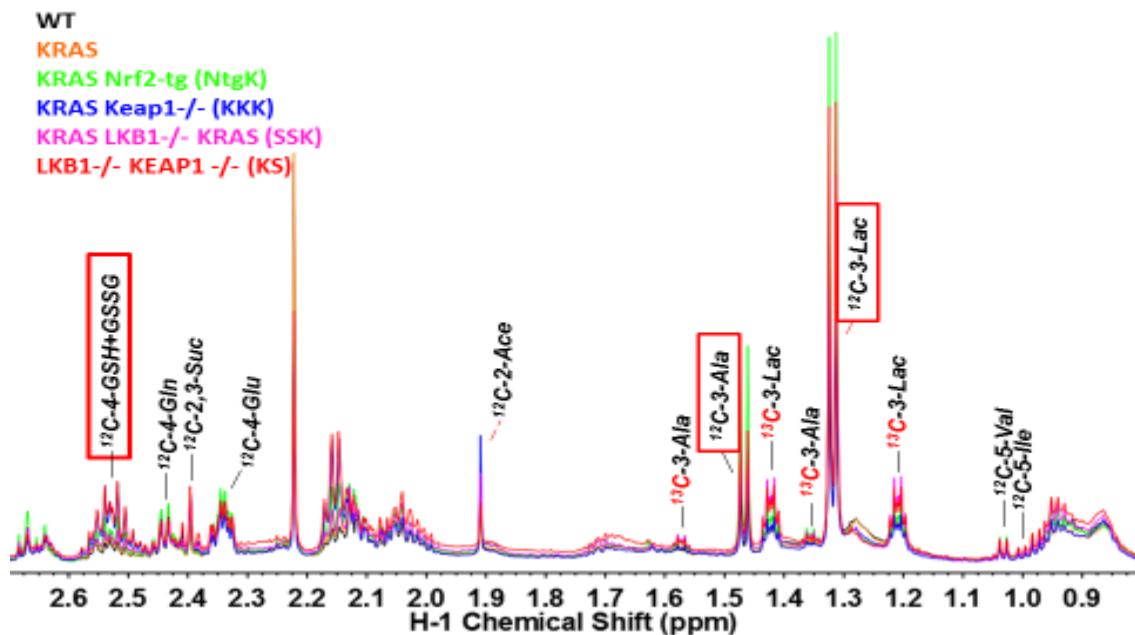


Fig.2

Mouse lung cancer KD $^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$, ^1H NMR

WT
 KRAS
 KRAS Nrf2-tg (NtgK)
 KRAS Keap1 $^{-/-}$ (KKK)
 KRAS LKB1 $^{-/-}$ KRAS (SSK)
 LKB1 $^{-/-}$ KEAP1 $^{-/-}$ (KS)

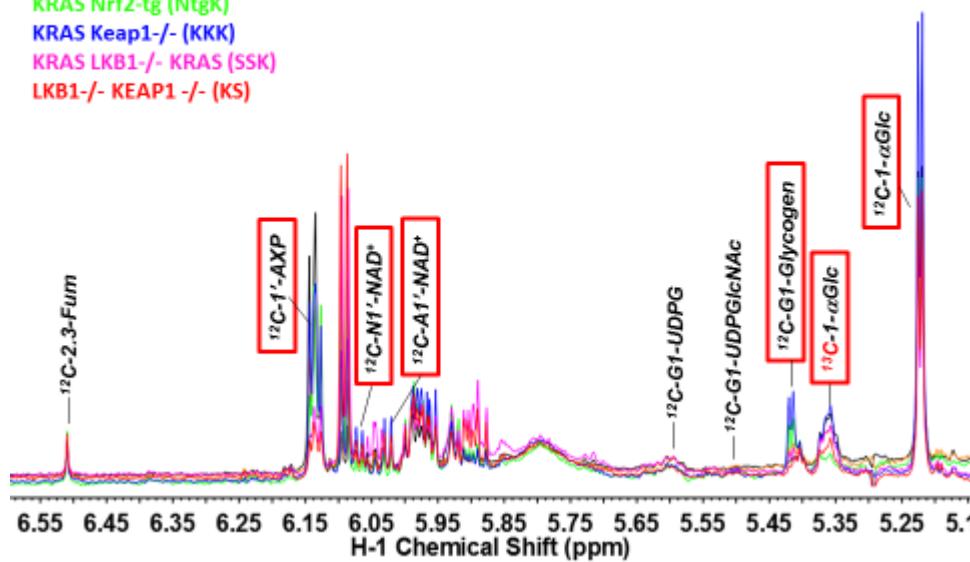


Fig.3

Mouse lung cancer KD $^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$, ^1H NMR

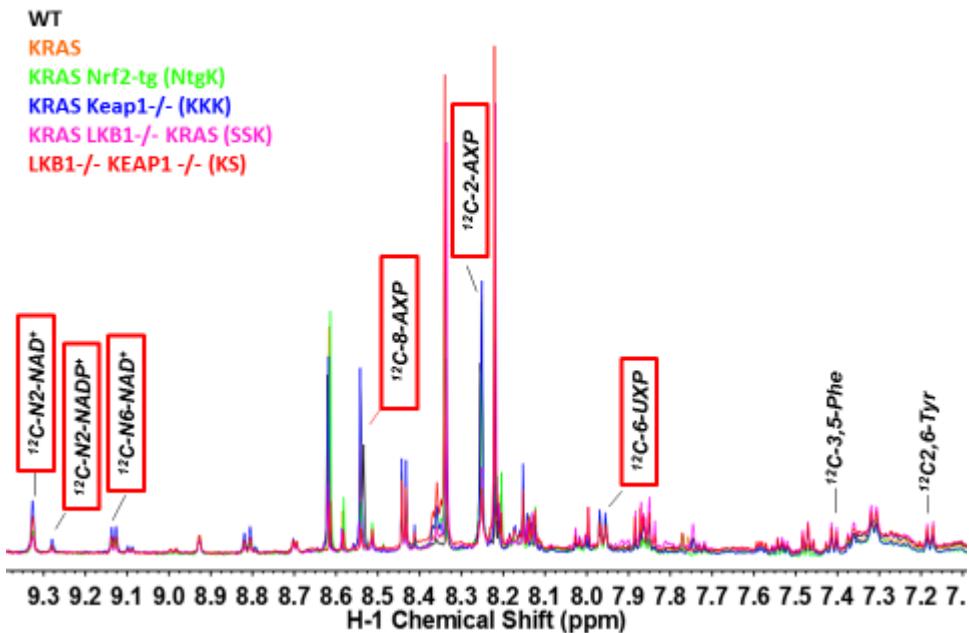


Fig.4

GC-MS data [Fig.5-6]:

Considerando la percentuale di arricchimento frazionale (analisi di flusso metabolico):

- I gruppi LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ e KEAP1 $^{-/-}$:LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostrano un aumentato arricchimento del Lactate e Alanine, isotopologo m+3, rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi; I gruppi NRF2 tg:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ e KEAP1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostrano invece un diminuito arricchimento rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;
- I gruppi LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$, LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ e KEAP1 $^{-/-}$:LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostrano un aumentato arricchimento del Glycerol-3P, isotopologo m+3, rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi, mentre i gruppi LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ e LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostrano un arricchimento simile; NRF2 tg:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ e KEAP1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostrano un diminuito arricchimento rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;
- il gruppo KEAP1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostra un diminuito arricchimento della Serine, isotopologo m+3, rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi; I gruppi LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$, LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ e NRF2 tg:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostrano un aumentato arricchimento rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi; il gruppo KEAP1 $^{-/-}$:LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostra un arricchimento simile al gruppo WT;
- I gruppi LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ e KEAP1 $^{-/-}$:LKB1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostrano un aumentato arricchimento della Glycine, isotopologo m+2, ripetto al gruppo WT e agli altri gruppi; il gruppo KEAP1 $^{-/-}$:LSL-Kras $^{\text{G}12\text{D}}$ mostra un diminuito arricchimento rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi;

Mouse Lung Cancer GCMS, $^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$

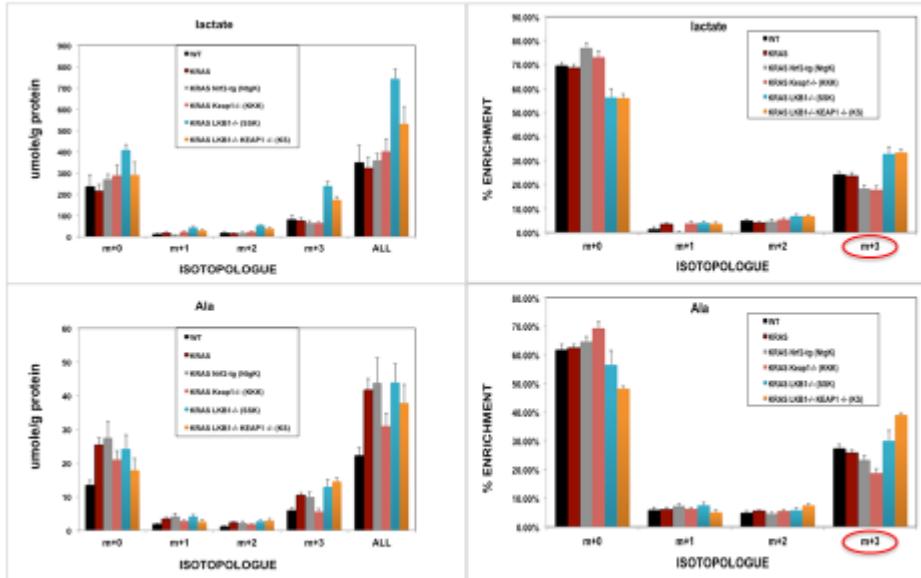


Fig.5

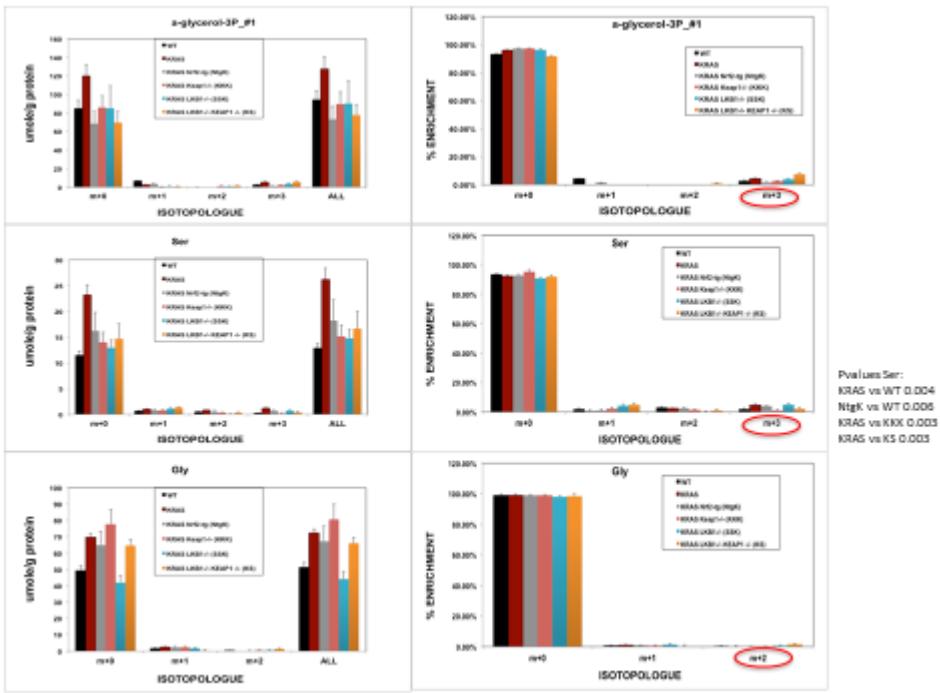
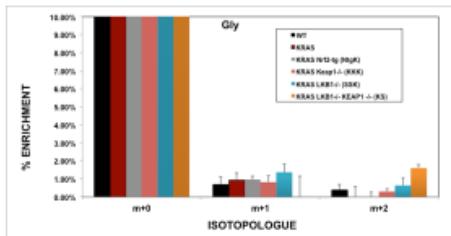


Fig.6



CONCLUSIONI

In questo studio pilota, non abbiamo evidenziato nessun dato statisticamente significativo, perciò possiamo solo limitarci a formulare alcune ipotesi in merito.

Dall'analisi degli spettri NMR emerge che entrambi i gruppi di topi con KEAP1 -/- hanno il più alto livello di NAD⁺, GSH+GSSG, e NADP⁺, suggerendo un potenziale ruolo per NRF2, come responsabile nell'aumentare: la glicolisi, l'espressione di geni coinvolti nella biosintesi/riciclaggio di GSH, la produzione di NADPH, e l'attivazione del PPP.

Analizzando i dati GC-MS, l'analisi del flusso metabolico (arricchimento frazionale dei metaboliti) ci mostra situazioni diverse ed opposte per i gruppi con iperattività di NRF2, infatti: il gruppo KEAP1-/-:LKB1-/-:LSL-Kras^{G12D} ha un'aumentato flusso glicolitico rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi, come dimostra l'elevato arricchimento di Lattato, Alanina, Glicerolo-3P e Glicina, (vedi anche dati NMR), mentre KEAP1-/-:LSL-Kras^{G12D} e NRF2tg:LSL-Kras^{G12D} mostrano un diminuito flusso glicolitico rispetto al gruppo WT e agli altri gruppi, come dimostrato dal diminuito arricchimento di Lattato, Alanina, Glicerolo-3P e Glycine (vedi anche dati NMR). Queste osservazioni suggeriscono diverse ipotesi:

- nei gruppi KEAP1-/-:LSL-Kras^{G12D} e NRF2tg:LSL-Kras^{G12D} la maggior parte del glucosio che entra nelle cellule è metabolizzato attraverso la via del pentoso fosfato (PPP), e utilizzato per la sintesi di nucleotidi, acidi nucleici, amminoacidi aromatici e la generazione di NADPH;
- nei gruppi KEAP1-/-:LSL-Kras^{G12D} e NRF2tg:LSL-Kras^{G12D}, la glicolisi non dipende dal glucosio bensì da un'altra risorsa, che potrebbe essere il glicogeno; gli spettri NMR indicano che entrambi i gruppi hanno un alto livello di glucosio e glicogeno, questo potrebbe indicare che la maggior parte del glucosio che entra nella cellula viene convertito in glicogeno, e viceversa; il glucosio è “più diluito”, quindi la percentuale di ¹³C₆-Glc che entra nella via glicolitica è inferiore rispetto agli altri gruppi;
- LKB1-/- influenza il metabolismo del glucosio.

Osservazione interessante, i

gruppi KEAP1-/-:LKB1-/-:LSL-Kras^{G12D} e LKB1-/-:LSL-Kras^{G12D} mostrano una drastica diminuzione di

AXP (adenosine phosphate pool), che puo' essere interpretata come una conseguenza dell'interruzione del pathway LKB1-AMPK.

STUDI IN CORSO E FUTURI

NRF2 e' in grado di accelerare la proliferazione delle cellule tumorali riprogrammando il metabolismo del glucosio, al fine di alimentare la via del pentoso fosfato?

Cercare di migliorare la procedura di iniezione del tracciante, ridurre al massimo lo stress del topo durante le operazioni di iniezione del tracciante al fine di ridurre la variabilità del segnale negli spettri NMR e GC-MS, raccogliere i tessuti dopo più di 1h, così che le cellule del tessuto in esame possano essere maggiormente perfuse dal tracciante.

Effettuare analisi FTMS per determinare i livelli di NADP⁺, acidi nucleici e zuccheri (ribosio-5P, Erytrose-4P) al fine di capire meglio gli effetti di NRF2 sulla via del pentoso fosfato (PPP), e quindi sulla capacità di NRF2 di contribuire al processo di iperproliferazione cellulare;

Effettuare esperimenti in vitro, usando gli stessi genotipi usati per lo studio in vivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J; Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease; *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. Epub 2006 Aug 4.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation; *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
3. Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, Nakamura Y, Scharlock M, et al. (2006) Structural basis for defects of keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer; *Mol Cell* 21: 689–700.
4. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylin SB, Sidransky D, Gabrielson E, Brock MV, Biswal S. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer; *PLoS Med.* 2006 Oct.
5. Lister, A., Nedjadi, T., Kitteringham, N. R., Campbell, F., Costello, E., Lloyd, B., et al. (2011); Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: Implications for cell proliferation and therapy; *Molecular Cancer*, 10, 37.
6. Shibata, T., Kokubu, A., Gotoh, M., Ojima, H., Ohta, T., Yamamoto, M., et al. (2008); Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer; *Gastroenterology*, 135(4), 1358–1368.
7. Zhang, P., Singh, A., Yegnasubramanian, S., Esopi, D., Kombairaju, P., Bodas, M., et al. (2010); Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth; *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(2), 336–346.
8. Singh, A., Bodas, M., Wakabayashi, N., Bunz, F., & Biswal, S. (2010); Gain of Nrf2 function in non-small cell lung cancer cells confers radioresistance; *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11), 1627–1637.
9. Wang, X.-J., Sun, Z., Villeneuve, N. F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., et al. (2008); Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2; *Carcinogenesis*, 29(6), 1235–1243.
10. Singh, A., Boldin-Adamsky, S., Thimmulappa, R. K., Rath, S. K., Ashush, H., Coulter, J., et al. (2008); RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy; *Cancer Research*, 68(19), 7975–7984.
11. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB; Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation; *Science.* 2009 May 22;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809.
12. Ward PS, Thompson CB; Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate; *Cancer Cell.* 2012 Mar 20;21(3):297-308. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.014.
13. Buchakjian MR1, Kornbluth S; The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death; *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Oct;11(10):715-27. doi: 10.1038/nrm2972.

14. Kruger NJ1, von Schaewen; The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation; *Curr Opin Plant Biol.* 2003 Jun;6(3):236-46.
15. DeNicola, G. M., Karreth, F. A., Humpton, T. J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., et al. (2011); Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis; *Nature*, 475(7354), 106–109.
16. Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., et al. (2012); Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming; *Cancer Cell*, 22(1), 66–79.
17. Singh, A., Happel, C., Manna, S. K., Acquaah-Mensah, G., Carrerero, J., Kumar, S., et al. (2013); Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis; *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 2921–2934.
18. Hudson, R. S., Yi, M., Esposito, D., Watkins, S. K., Hurwitz, A. A., Yfantis, H. G., et al. (2012); MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer; *Nucleic Acids Research*, 40(8), 3689–3703.
19. Nasser, M. W., Datta, J., Nuovo, G., Kutay, H., Motiwala, T., Majumder, S., et al. (2008); Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1; *The Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33394–33405.
20. Wang, X., Ling, C., Bai, Y., & Zhao, J. (2011); MicroRNA-206 is associated with invasion and metastasis of lung cancer; *Anatomical Record (Hoboken, NJ: 2007)*, 294(1), 88–92.
21. Lu, S. C. (2009); Regulation of glutathione synthesis; *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 42–59.