

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Ιατρικής

**Ο ογκοκατασταλτικός ρόλος του πυρηνικού υποδοχέα
NR5A2/LRH1 σε καρκινικές σειρές του Νευρικού
Συστήματος**

Δημήτριος Γκίκας

Μεταπτυχιακός Φοιτητής

Υπεύθυνος ερευνητής

Παναγιώτης Πολίτης

Αθήνα, 2015

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Ιατρικής

Ο ογκοκατασταλτικός ρόλος του πυρηνικού υποδοχέα NR5A2/LRH1 σε καρκινικές σειρές του Νευρικού Συστήματος

Δημήτριος Γκίκας, Βιολόγος

Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας στα πλαίσια μεταπτυχιακού προγράμματος

Τριμελής επιτροπή:

Γεώργιος Βασιλόπουλος : Αναπληρωτής καθηγητής, στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παναγιώτης Πολίτης : Ερευνητής Γ, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Αριστείδης Χαρώνης : Ερευνητής Α, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Όλα τα πειράματα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν εξ' ολοκλήρου στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον υπεύθύνό μου, Δρ. Παναγιώτη Πολίτη για την δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και να αποκτήσω πολύτιμη εμπειρία. Κυρίως όμως θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ενθάρρυνση, την καθοδήγηση και την αμέριστη υποστήριξη του από την αρχή έως το τέλος αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τα δύο μέλη της επιτροπής, τον Δρ. Αριστείδη Χαρόνη για την προθυμία του να βοηθήσει και να υποστηρίξει την δουλειά μου και τον Δρ. Γεώργιο Βασιλόπουλο που με τίμησε ιδιαίτερα με την παρουσία του στην τριμελή επιτροπή για την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Δημήτριο Στέλλα για τιμή που μου έκανε να συνεργαστεί μαζί μου στα *in vivo* πειράματα και για τις συμβουλές που μου παρείχε. Ευχαριστώ ακόμα, τον Αθανάσιο Στεργιόπουλο, την Δάφνη Αντωνίου και την Ματίνα Τσαμπούλα για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου μας, το φιλικό περιβάλλον μου καθώς και την οικογένειά μου για την έμμεση ή άμεση υποστήριξη.

Περιεχόμενα

Περίληψη	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
Νευρικά βλαστικά κύτταρα: δημιουργία διαφοροποίηση και αναγέννηση.....	9
Νευροβλάστωμα	11
Κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του Νευροβλαστώματος.....	11
Κατηγοριοποίηση Νευροβλαστώματος και Παράγοντες Πρόγνωσης	13
Στάδιο και Ηλικία	13
Το ογκογονίδιο MYCN.....	14
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	14
Άλλοι προγνωστικοί παράγοντες.....	15
Prox1 και νευροβλάστωμα.....	15
Πολύμορφο Γλιοβλάστωμα (ΠΓΒ).....	16
Κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του ΠΓΒ	16
Διάγνωση και κατηγοριοποίηση του ΠΓΒ.....	17
Προγνωστικοί Παράγοντες ΠΓΒ	19
Ισοκιτρική αφυδρογονάση 1 και 2 (IDH1/2).....	19
Ο υποδοχέας EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	20
Άλλοι προγνωστικοί παράγοντες.....	20
Ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας NR5A2 και οι λειτουργίες του.....	21
Ο ρόλος του NR5A2 σε διάφορες μορφές καρκίνου	24
Καρκίνος του παχέος εντέρου.....	24
Καρκίνος του μαστού	25
Καρκίνος του παγκρέατος.....	26
Σκοπός εργασίας και πειραματική πορεία	27
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	28
Καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων (νευρόσφαιρες) και κυτταρικών σειρών	29
Διαμόλυνση με CaCl ₂ κυτταρικών σειρών	31
Διαμόλυνση με Lipofectamine,κυτταρικών σειρών	32
Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA	33

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription PCR/RT-PCR) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR).....	34
Ανοσοφθορισμός σε πρωτογενής και καρκινικές κυτταρικές σειρές	35
Ενδοπεριτοναϊκή ένεση καρκινικών κυττάρων σε NOD/SCID ποντίκια.....	37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
Υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 σε διάφορες κυτταρικές σειρές	39
Υπερέκφραση NR5A2/LRH1 στα κύτταρα HEK-293A	39
Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Neuro2A.....	42
Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων SH-SY5Y	44
Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων GL261	46
Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων U87-MG	48
Η υπερέκφραση NR5A2 επάγει αναστολές του πολλαπλασιασμού.....	50
Κύτταρα Neuro2A	50
Κύτταρα SH-SY5Y.....	51
Κύτταρα U87-MG.....	52
Χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 στα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα και σε διάφορες κυτταρικές σειρές	54
Χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 στα Νευρικά βλαστικά κύτταρα.....	54
Μελέτη των δεικτών BrdU και PH3	54
Μελέτη των δεικτών Nestin και procaspase 3	56
Μελέτη των δεικτών Tuj1 και GFAP.....	59
Χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 σε κυτταρικές σειρές καρκίνων του Νευρικού συστήματος	61
Οι αγωνιστές του NR5A2/LRH1 δεν μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των Neuro2a κυττάρων	61
Η χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 δεν μειώνει τον πολλαπλασιασμό των SH-SY5Y κυττάρων	63

Η χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 δεν μειώνει τον πολλαπλασιασμό των GL261 κυττάρων	65
Οι αγωνιστές του NR5A2/LRH1 μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των U87-MG κυττάρων.....	67
Η χρήση του αγωνιστή του NR5A2, DLPC, επάγει αναστολές του πολλαπλασιασμού στα U87-MG	69
Χenografts σε NOD/SCID ποντίκια των U87-MG κυττάρων.....	71
Συζήτηση.....	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

Περίληψη

Το Νευροβλάστωμα και τον Γλοιοβλάστωμα αποτελούν κακοήθειες του Νευρικού Συστήματος, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ταχύτατη ανάπτυξη και χαμηλά ποσοστά επιβίωσης. Αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν την ανάγκη για καινοτόμες ιδέες που αφορούν τους μηχανισμούς που διέπουν την ανάπτυξη και την καταστολή των κακοηθειών. 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 στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη. Έτσι ο NR5A2, θέτει υποψηφιότητα ως καταστολέας των κακοηθειών του Νευρικού Συστήματος. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την ικανότητα του NR5A2 και των φαρμακολογικών αγωνιστών του να καταστείλουν την ανάπτυξη καρκινικών σειρών Νευροβλαστώματος και Γλοιοβλαστώματος. Πράγματι η υπερέκφραση του NR5A2 οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων με την επαγωγή της δράσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ακόμη ο αγωνιστής του, DLPC, μείωσε την πολλαπλασιαστική ικανότητα των νευρικών βλαστικών κυττάρων, ενώ αύξησε την νευρογένεση έναντι της γλοιογένεσης. Ακόμη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου Γλοιοβλαστώματος. Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν τον NR5A2 ως έναν φαρμακολογικό στόχο για την αντιμετώπιση των νεοπλασιών του Νευρικού Συστήματος.

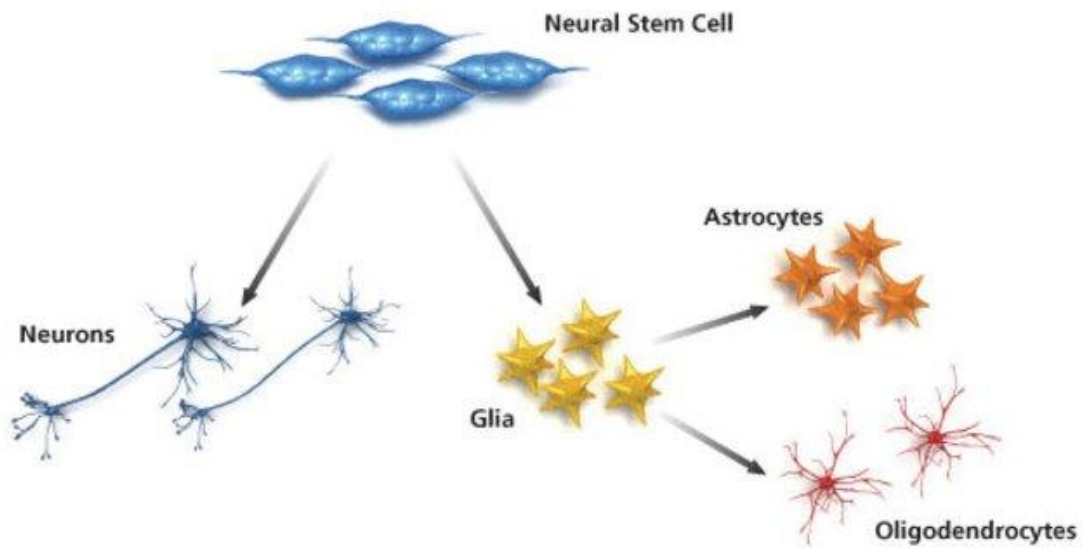
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Νευρικά βλαστικά κύτταρα: δημιουργία διαφοροποίηση και αναγέννηση

Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) των σπονδυλωτών αναπτύσσεται από ένα μικρό αριθμό Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων (NBK) [neural stem cells - (NSCs)]. Τα NBK είναι κύτταρα που αρχικά πολλαπλασιάζονται έντονα και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σταδιακά στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, δίνοντας πρώτα τα διαφορετικά είδη νευρώνων και αργότερα ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα [1]. Για να επιτευχθεί αυτή η σταδιακή διαδικασία διαφοροποίησης, τα NBK του νευρικού σωλήνα δέχονται πολύ νωρίς κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη την επίδραση πολλών εξωκυττάρων σημάτων από ουσίες οι οποίες καλούνται μορφογόνα (morphogens). Με τη σειρά τους, τα μορφογόνα ενεργοποιούν την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων με τρόπο χωρο-χρονικό και κυτταρο-ειδικό [2]. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες καθορίζουν την ταυτότητα και την οργάνωση των NBK και ενεργούν στο σχηματισμό του αρχιτεκτονικού σχεδίου του νευρικού σωλήνα [3, 4].

Σε αντίθεση με τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, τα οποία μπορούν να πολλαπλασιάζονται εκτενώς σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση και μπορούν να αποτελέσουν μία απεριόριστη πηγή πολλών κυτταρικών τύπων, τα NBK που προέρχονται από τον εμβρυϊκό ή τον ενήλικο εγκέφαλο είναι πολυδύναμα προγονικά κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιούνται σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων [5-7]. Αφού ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος μετά τη γέννηση η κυτταρική διαίρεση είναι σημαντικά επιβραδυνόμενη για το σχηματισμό νέων νευρώνων. Ωστόσο παρόλο που ο εγκέφαλος θεωρείται ένα όργανο τρωτό σε τραυματισμούς και ασθένειες λόγω της μειωμένης ικανότητάς του για αναγέννηση, τα τελευταία χρόνια μετά από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε ποντίκια, αρουραίους αλλά και σε ανθρώπους, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει μιτωτική δραστηριότητα και νευρογένεση σε συγκεκριμένες περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα των ενηλίκων βρίσκονται στην α) υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone, SVZ) ανάμεσα στο πλευρικό τοίχωμα της πλάγιας κοιλίας, στην υποκοκκιάδη ζώνη (subgranular zone, SGZ), β) στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου, στην υπομεσολόβια ζώνη (subcallosal zone, SCZ), γ) μεταξύ του ιππόκαμπου και μεσολόβιου σωματίου και τέλος δ) στην

παρεγκεφαλίδα στο όριο μεταξύ του εσωτερικού κοκκιώδους στρώματος και της λευκής ουσίας. Αυτά τα NBK δρουν μόνο στις συγκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, γεγονός όμως που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον ως μηχανισμός νευρωνικής επιδιόρθωσης εάν αυτά τα κύτταρα μπορούσαν να επιστρατευθούν έτσι ώστε να δημιουργήσουν νέους λειτουργικούς νευρώνες σε περιπτώσεις βλαβών του νευρικού συστήματος. Εξαιτίας του περιορισμένου δυναμικού τους σε σύγκριση με τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, τα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα δεν δίνουν γένεση σε καρκινώματα. Γι' αυτούς τους λόγους, τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει εστιάσει στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών και των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των NBK έτσι ώστε στο μέλλον να είναι εφικτή η χρήση τους σε θεραπευτικές προσεγγίσεις νευρικών παθήσεων [8, 9].



Εικόνα 1 Νευρικά βλαστικά κύτταρα και μορφογένεση νευρικού συστήματος

Νευροβλάστωμα

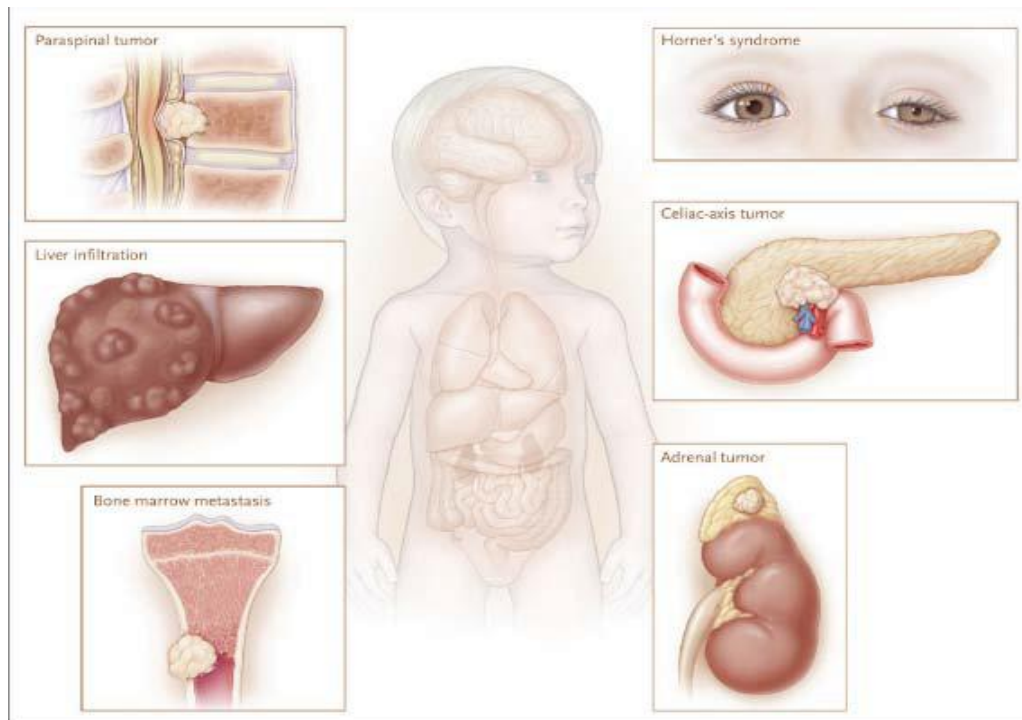
Κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του Νευροβλαστώματος

Το Νευροβλάστωμα είναι κακοήθης όγκος που εμφανίζεται κατά την πρώιμη παιδική ηλικία και προκύπτει από ανωμαλίες σε κύτταρα του αναπτυσσόμενου αυτόνομου Νευρικού Συστήματος [10]. Είναι από τους συχνότερα εμφανιζόμενους εξωκρανιακούς όγκους και εκτιμάται πως αποτελεί το 7-10% των παιδιατρικών καρκίνων και εμφανίζεται ως αιτία θανάτου από καρκίνο στο 15% των ασθενών κάτω από 15 ετών [10-12]. Ιδιαίτερα στον πρώτο χρόνο ζωής, το Νευροβλάστωμα αποτελεί το 50% των όγκων που μπορεί να εμφανιστούν, ενώ είναι η δεύτερη πιο κοινή αιτία παιδικής θνησιμότητας πίσω από τα ατυχήματα [13]. Το Νευροβλάστωμα είναι μια ετερογενής ασθένεια τόσο από βιολογικής, όσο και από κλινικής άποψης [11, 14]. Πιο συγκεκριμένα, κάποιοι όγκοι εμφανίζουν διαρκώς αυξανόμενη επιθετικότητα και οδηγούν σε μεταστάσεις με μειωμένα ποσοστά επιβίωσης (περίπου 40% επιβιώνει παρά την έντονη και πολυπαραγοντική θεραπεία), ενώ άλλοι υποχωρούν αυθόρμητα σε τόσο μεγάλο βαθμό που υπολογίζεται στις 10 με 100 φορές μεγαλύτερος από άλλα είδη καρκίνων [13, 15, 16].

Ο όγκος του Νευροβλαστώματος θεωρείται ότι προέρχεται από πρόδρομα κύτταρα του περιφερειακού (συμπαθητικού) συστήματος [17, 18]. Οι όγκοι μπορούν να εμφανιστούν οπουδήποτε στην συμπαθητική αλυσίδα, συνήθως στον μυελό των επινεφριδίων και στα παρασπονδυλικά γάγγλια. Έτσι οι όγκοι μπορούν να εμφανιστούν ως πληγές στο λαιμό, το θώρακα, την κοιλιακή χώρα ή την λεκάνη [19, 20].

Το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με Νευροβλάστωμα έχει αυξηθεί από 52% την περίοδο 1975-1977 σε 74% την περίοδο 1999-2005 σύμφωνα με την βάση

δεδομένων Αποτελεσμάτων Επιτήρησης, Επιδημιολογίας και Τέλους. (www.seer.cancer.gov). Παρ' όλα αυτά η βελτίωση αυτή αναλογεί στους ασθενείς που πάσχουν από ευνοϊκή μορφή του Νευροβλαστώματος. Η βελτίωση σε άτομα με μορφή υψηλού κινδύνου είναι μέτρια παρ' όλη την αυξημένη κλιμάκωση της έντασης των θεραπειών που παρέχονται [19, 21]. Ακόμη και μετά από πολύπλοκη και επιθετική αντιμετώπιση του όγκου υψηλού κινδύνου, το ποσοστό επιβίωσης είναι μόνο 30% περίπου και ενώ οι περισσότεροι ασθενείς ανταποκρίνονται στην αρχή της θεραπείας, αργότερα εμφανίζουν υποτροπή [15, 19, 22, 23]. Παρ' όλα αυτά, η ανάπτυξη φαρμάκων και μεθόδων για αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση είναι καθ' οδόν. Ερευνητικές ομάδες έχουν προσπαθήσει να σχεδιάσουν θεραπείες που θα εκμεταλλευτούν τα κύρια ογκογονικά χαρακτηριστικά του καρκινικού κυττάρου, του μικροπεριβάλλοντος του όγκου ή και τα δύο μαζί [19]. Επιπλέον η αποσαφήνιση των μοριακών μονοπατιών του νευροβλαστώματος θα δώσει την δυνατότητα στους ερευνητικές και τους κλινικούς να βρουν τρόπο να σταματήσουν την υποτροπή και την πρόοδο του όγκου [13]. Ελπιδοφόρο επίσης είναι το γεγονός πως η ανάπτυξη βιολογικά βασισμένων θεραπειών θα αποδειχθεί αποτελεσματική και θα οδηγήσει στη βελτίωση του ποσοστού επιβίωσης στους ασθενείς με νευροβλάστωμα επιθετικής μορφής [24].



Εικόνα 2 Ιστοί όπου μπορεί να εμφανιστεί το Νευροβλάστωμα

Κατηγοριοποίηση Νευροβλαστώματος και Παράγοντες Πρόγνωσης

Στάδιο και Ηλικία

Όπως στις περισσότερες κακοήθεις μορφές έτσι και στο νευροβλάστωμα το στάδιο στο οποίο βρίσκεται είναι ο πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας [25]. Το νευροβλάστωμα διακρίνεται από πέντε διαφορετικά στάδια (1-4 και 4S) σύμβολα με το Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης Νευροβλαστώματος (INSS) [10-12, 26]. Το νευροβλάστωμα πρώιμου σταδίου (στάδια 1 και 2) δεν εμφανίζει μετάσταση στα οστά ή στον μυελό των οστών και μπορεί να αντιμετωπιστεί χημειοθεραπεία και ακτινοβολία [27]. Το νευροβλάστωμα προχωρημένου σταδίου ωστόσο (στάδια 3 και 4) εμφανίζει υψηλή μετάσταση και είναι ανθεκτικό τόσο στην χημειοθεραπεία όσο και στην ακτινοβολία παρ' όλο που στην αρχή υπάρχει θετική απόκριση. Το πέμπτο στάδιο (4S) χαρακτηρίζεται από την αυθόρμητη υποχώρηση του όγκου με ελάχιστη ή

και καθόλου θεραπεία [27]. Για όλα τα στάδια του νευροβλαστώματος, τα βρέφη ηλικίας μικρότερη του ενός έτους παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης από μεγαλύτερα παιδιά που βρίσκονται στο ίδιο στάδιο [14, 28].

Το ογκογονίδιο MYCN

Το νευροβλάστωμα επίσης χωρίζεται σε τρεις ομάδες με κριτήριο τον το πόσο επικίνδυνο είναι (χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου) ανάλογα με την ηλικία, την κατάσταση του MYCN, και την ιστολογία. Ενίσχυση του MYCN εμφανίζεται στο 20% περίπου των πρωτογενών όγκων νευροβλαστώματος και έχει σχετιστεί με υψηλή μετάσταση και μειωμένη προγνωστική ικανότητα [29]. Παρ' όλο που ολόκληρος ο ρόλος του MYCN δεν είναι γνωστός, η ενίσχυση του MYCN συνοδεύεται και από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης N-myc [27]. Τα επίπεδα της έκφρασης του MYCN έχουν συσχετιστεί με την προοπτική αύξησης των κυττάρων του νευροβλαστώματος τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [30-32]. Όμως, αν και η ενίσχυση του MYCN καθορίζει ξεκάθαρα ένα υποσύνολο νευροβλαστωμάτων με υψηλή κακοήθη συμπεριφορά, η κλινική σηματικότητα μεγαλύτερης έκφρασης του MYCN σε παιδιά με νευροβλάστωμα παραμένει αμφιλεγόμενη [33, 34]. Έχει αναφερθεί ακόμα πως όγκοι υψηλού σταδίου με επιπτώσεις στην γονιδιακή λειτουργία της νευριτογένεσης ή της καθοδήγησης του αυξητικού κώνου έχουν φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων του MYCN [35]. Έτσι, ο ακριβής ρόλος, αν υπάρχει, που παίζει το MYCN στους μη ενισχυμένους όγκους παραμένει άγνωστος.

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Τόσο η αύξηση όσο και η απώλεια γενετικού υλικού παρατηρείται στις κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος όσο και σε πρωτεύοντες όγκους. Η πιο κοινή ανωμαλία στα πρωτεύοντα νευροβλαστώματα είναι η αύξηση του 17q γενετικού υλικού. Η ανωμαλία αυτή, σχετίζεται με χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου και δυσμενή έκβαση για τον ασθενή [22, 36]. Συνήθεις περιοχές χρωμοσωμικής απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH-Loss of Heterozygosity), περιλαμβάνουν τις χρωμοσωμικές μπάντες 1p35, 11q23 και 14q23-qter. Η απώλεια του μικρού βραχίονα του

χρωμοσώματος 1 εμφανίζεται στο 25-35% , περίπου, των νευροβλαστωμάτων. Η απώλεια αυτή σχετίζεται με την ενίσχυση του MYCN ογκογονιδίου και με δυσοίωση κατάληξη [37-39].

Άλλοι προγνωστικοί παράγοντες

Πέρα από του προαναφερθέντες παράγοντες πρόγνωσης, υπάρχουν και άλλοι βιοδείκτες που σχετίζονται με το νευροβλάστωμα. Ο δείκτης DNA των κυττάρων του όγκου (ploidy) [40], οι νευροτροφίνες και οι υποδοχείς τους [41], ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος [42] και επιπλέον γενετικές βλάβες, παίζουν σημαντικό ρόλο στην εν λόγω ασθένεια. Όσο αφορά τις γενετικές αιτίες, πέρα από την ενίσχυση του MYCN, επιπρόσθετες γονιδιακές μεταβολές που παίζουν ρόλο στο νευροβλάστωμα έχουν χαρακτηριστεί. Τέτοιες μεταβολές, είναι οι μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο της αναπλαστικής κινάσης του λεμφόματος (ALK) [43], μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο PHOX2B, ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω του Notch1 [44] και μεταλλάξεις στο μεταγραφικό παράγοντα Prox1 [35].

Prox1 και νευροβλάστωμα

Το Prox1, είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής που εκφράζεται στους συμπαθητικούς νευρώνες κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του περιφερικού νευρικού συστήματος στο κοτόπουλο, στο ποντίκι και στον άνθρωπο, και τα επίπεδα έκφρασης είναι μειωμένα στα υψηλώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του ανθρώπινου νευροβλαστώματος [45, 46]. Πολύ σημαντικό γεγονός, είναι το ότι βρέθηκε μετάλλαξη του γονιδίου του Prox1 (R165H) σε ασθενή με νευροβλάστωμα [45]. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν πως το Prox1 έχει ογκοκατασταλτική δράση στο νευροβλάστωμα. Επομένως, έχει αναφερθεί πως το Prox1 ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη [47]. Ειδικά, μια ανασταλτική αλληλεπίδραση μεταξύ του Prox1 και του Notch1 εμπλέκεται στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των πρόδρομων νευρικών κυττάρων [47]. Όπως έχει συζητηθεί πιο πάνω κάποιες παρατηρήσεις δείχνουν το μονοπάτι του Notch ως ένα μονοπάτι που εμπλέκεται στην

παθογένεση του νευροβλαστώματος. Επομένως, το Prox1 μπορεί να εμπλέκεται στην κακοήγη μετατροπή, πρόοδο και/ή υποχώρηση του νευροβλαστώματος μέσω ρύθμισης της σηματοδότησης του Notch και/ή άλλων γονιδίων και μονοπατιών. Πρόσφατα δημοσιευμένα δεδομένα από το εργαστήριό μας κατέδειξαν έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο του Prox1 στο Νευροβλάστωμα μέσω της επαγωγής των πρωτεϊνών p27-kip1 και Cdc25A [48].

Πολύμορφο Γλιοβλάστωμα (ΠΓΒ)

Κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του ΠΓΒ

Το Πολύμορφο Γλιοβλάστωμα (Glioblastoma Multiforme-GBM) είναι μια πρωτογενής νεοπλασία του εγκεφάλου που απαρτίζεται από γενετικά και φαινοτυπικά ετερογενείς ομάδα όγκων [49, 50]. Το 90% των περιπτώσεων ΠΓΒ αναπτύσσονται *de novo* από φυσιολογικά γλοιακά κύτταρα μέσω πολυβηματικής ογκογένεσης. Το υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων αφορούν δευτερογενείς νεοπλασίες, που αναπτύσσονται μέσω της προόδου χαμηλόβαθμων όγκων [51, 52], η οποία διαδικασία διαρκεί 4 έως 5 χρόνια. Στο δευτερογενές Γλοίωμα η διάγνωση γίνεται σε άτομα με μέσο όρο ηλικία τα 39 έτη, αναπτύσσεται αργά και έχει καλύτερη πρόγνωση. Το ΠΓΒ όμως που αναπτύσσεται *de novo* μεγαλώνει μέσα σε 3 μήνες. Παρ' όλο που η γενετική βάση και κατά συνέπεια τα μοριακά μονοπάτια που υποφώσκουν στην ανάπτυξη τόσο των πρωτογενών όσο και των δευτερογενών γλοιομάτων είναι διαφορετικά [49], μορφολογικά δεν παρουσιάζεται καμία διαφορά [53].

Το ΠΓΒ αναπτύσσεται κυρίως στον εγκέφαλο. Πιο συγκεκριμένα η νεοπλασία αυτή εντοπίζεται στα ημισφαίρια [54] ή στο εγκεφαλικό στέλεχος [55] και την

παρεγκεφαλίδα [56]. Χαρακτηρίζεται από διθητική ανάπτυξη και έτσι δεν είναι εύκολα διακριτός από τον φυσιολογικό ιστό [49, 57]. Ακόμη ο αναπτυσσόμενος όγκος προκαλεί αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης και μερικές φορές οδηγεί σε υδροκεφαλία [58, 59].

Μεταστάσεις της νεοπλασίας αυτής μέσω του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του αίματος [60, 61] είναι σπάνιες και συνήθως στοχεύουν τον σπλήνα, τα πλευρά, τους πνεύμονες, τους λεμφικούς κόμβους, το συκώτι, τα οστά το πάγκρεας και το λεπτό έντερο [62-67]. Θεωρείται πως η μικρή πιθανότητα μετάστασης του ΠΓΒ οφείλεται στον αιματεγκεφαλικό φραγμό, αλλά είναι και λόγος της ταχύτατης ανάπτυξης του όγκου και κατά συνέπεια της σύντομης πορείας της ασθένειας [68]. Ακόμη ένας λόγος χαμηλής μεταστατικότητας είναι το γεγονός πως ο εγκέφαλος στερείται λεμφικών αγγείων [62]. Επίσης λίγες βιβλιογραφικές αναφορές μιλούν για μετάσταση του ΠΓΒ στο δέρμα. Οι μεταστάσεις αυτές εντοπίζονταν κυρίως στα ράμματα στις μετεγχειρητικές περιοχές, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα της εμφύτευσης καρκινικών κυττάρων του ΠΓΒ κατά την χειρουργική αφαίρεση του όγκου [69].

Επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν πως ο καταγεγραμμένος αριθμός περιπτώσεων ΠΓΒ στην Ευρώπη και στην Βόρεια Αμερική αντιστοιχεί σε 2-3 περιπτώσεις σε 100.000 ενήλικα άτομα [70]. Όσο αφορά το φύλο η αναλογία ανδρών και γυναικών κυμαίνεται στο 1,26:1 [71]. Περιπτώσεις ΠΓΒ σε παιδιά και νεογνά έχουν επίσης αναφερθεί. Εκτιμάται πως τα περιστατικά αφορούν 1,1-3,6 περιπτώσεις σε 100.000 περιστατικά [72], με την αναλογία αρσενικών θηλυκών να είναι 3,3:1. Δεν υπάρχουν μορφολογικές διαφορές στο ΠΓΒ παιδιών και ενηλίκων. Η μόνη αξιοσημείωτη διαφορά είναι πως οι δείκτες πολλαπλασιασμού είναι μεγαλύτεροι στα παιδιά [71]. Όσο αναφορά την διαφοροποίηση ανάμεσα στις φυλές των ανθρώπων, τα περιστατικά ΠΓΒ είναι περισσότερα στους Καυκάσιους και ιδιαίτερα σε αυτούς που ζουν σε βιομηχανικές περιοχές [73].

Διάγνωση και κατηγοριοποίηση του ΠΓΒ

Η κατηγοριοποίηση των όγκων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα γίνεται με κριτήρια που έχει θέσει ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (ΠΟΥ). Τα κριτήρια αυτά

αφορούν εκτίμηση της μορφολογίας του, του επιπέδου κακοήθειας (επίπεδο I-IV), δείκτες πολλαπλασιασμού, απόκριση στη θεραπεία και 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 του πιο κακοήθεις όγκους με μέσο χρόνο επιβίωσης τους 6-12 μήνες. Το ΠΓΒ αποτελεί το επίπεδο IV [74].

Η μαγνητική απεικόνιση είναι το κύριο διαγνωστικό εργαλείο για το ΠΓΒ. Η διάμετρος του όγκου στην διάγνωση είναι περίπου 4cm [75]. Παρ' όλα αυτά δεδομένα από ασθενείς δείχνουν πως η διάμετρος του όγκου μπορεί να είναι και 5-10cm και σε αρκετά μικρότερο ποσοστό μεγαλύτερη από 10cm [76]. Πιο ακριβής μέθοδος είναι η ιστοπαθολογική εξέτασή του όγκου που αφαιρέθηκε ή τμήματος, χρησιμοποιώντας ιστολογικές, κυτταρολογικές και ιστοχημικές μεθόδους [77].

Ο κυριότερος διαγνωστικός δείκτης που εξετάζεται από τις ανοσοϊστοχημικές μεθόδους είναι η GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), μια πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων βάρους 50kD και αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό των ώριμων αστροκυττάρων [78-80]. Η πρωτεΐνη αυτή πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των αστροκυττάρων και αποτελεί δείκτη και παθολογικής κατάστασης, αφού η GFAP μειώνεται όσο αυξάνεται η κακοήθεια των όγκων αστροκυτταρικής προέλευσης [81]. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στο ΠΓΒ όπου τα κύτταρα τα οποία στερούνται GFAP, πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα σε σύγκριση με αυτά που εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή. Η απώλεια του GFAP χαρακτηρίζει τα αδιαφοροποίητα ογκοκύτταρα αλλά δεν αποτελεί ενδεικτικό στοιχείο για την πρόοδο και την ανάπτυξη του όγκου [78]. Άλλος ένας πρωτεϊνικός δείκτης για τους όγκους στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα είναι η όξινη πρωτεΐνη S100 που εκφράζεται στα γλοιακά κύτταρα [82].

Προγνωστικοί Παράγοντες ΠΓΒ

Ισοκιτρική αφυδρογονάση 1 και 2 (IDH1/2)

Μεταλλάξεις στην ισοκιτρική αφυδρογονάση θεωρείται ότι εμφανίζονται στα πρώιμα στάδια της γλοιοματογένεσης και προθούν την ανάπτυξη του καρκίνου [83]. Παρ'όλο που ανιχνεύονται στο 70-80% των γλοιομάτων σταδίου II και III και στο δευτερογενές ΠΓΒ, εναλλαγές στην ισοκιτρική αφυδρογονάση I σπάνια εμφανίζονται στο πρωτογενές ΠΓΒ [84]. Η επικρατής μετάλλαξη που προκύπτει έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση μιας σερίνης από μία ιστιδίνη στο κωδικόνιο 132 (R132H). Οι μεταλλάξεις της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης σχετίζονται ισχυρά με μεταλλάξεις της p53 πρωτεΐνης [83, 85, 86]. Ενώ η φυσιολογική ισοκιτρική αφυδρογονάση καταλύει την μετατροπή του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη οδηγεί σε υπερπαραγωγή του 2-υδροξυγλουταρικού [87]. Η ουσία αυτή έχει δειχθεί ότι επάγει βλάβες στο DNA, καταστέλει την διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων και προάγει την καρκινογένεση. Επίσης, αυξάνει και σταθεροποιεί την υπομονάδα της HIF-1 (HIF-1α) που προάγει την ανάπτυξη του όγκου [88-91]. Ακόμη μεταλλάξεις στην ισοκιτρική αφυδρογονάση 1 οδηγούν σε υπεμεθυλίωση του DNA, που έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή της απομεθυλίωσης και της κυτταρικής διαφοροποίησης [92-95]. Βέβαια αξίζει να σημειωθεί πως ασθενείς με όγκο στους οποίους εντοπίζονται μεταλλάξεις της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης 1 έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης και καλής πρόγνωσης [96].

Ο υποδοχέας EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

Ενίσχυση του γονιδίου του EGFR έχει παρατηρηθεί στο 40% των περιπτώσεων του ΠΓΒ. Από αυτές, το 20-30% εκφράζουν ένα μετάγραφο που προέρχεται από την διαγραφή των εξωνίων 2-7, τον EGFRvIII, έναν συνεχώς ενεργό υποδοχέα στον οποίον δεν μπορεί να προσδέσει κάποιος συνδέτης, με αποτέλεσμα την συνεχιζόμενη ενεργοποίηση μονοπατιών της κυτταρικής αύξησης και αντιαποπτωτικών μονοπατιών [97]. Ενεργοποίηση του EGFR στα γλοιώματα μπορεί ακόμη να προκύψει και από μεταλλάξεις που προκαλούν αύξηση της λειτουργίας του [98]. Υπάρχουν ακόμα, δεδομένα που καταδεικνύουν την εξάρτηση του γλοιώματος από την ενεργοποίηση του EGFR μονοπατιού, και απενεργοποίηση αυτού θα οδηγούσε σε μια βραχυπρόθεσμη αναστολή της αύξησης του γλοιώματος [99, 100]. Έχουν ακόμα περιγραφεί μετατοπίσεις του EGFR και συμπτώξεις εντός πεδίου ανάγνωσης είτε στην septin 14 είτε στην φωσφατάση της φωσφοσερίνης στο 7% των περιπτώσεων ΠΓΒ [101]. Σε ένα 3% των περιπτώσεων ΠΓΒ, ο FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) φαίνεται να έχει αναστραφεί και να έχει συμπτυχτεί με την κωδική περιοχή του TACC1 (Transformic acidic-coiled coil), με αποτέλεσμα την δημιουργία μια συνεχώς ενεργής πρωτεΐνης, της FGFR-TACC [102].

Άλλοι προγνωστικοί παράγοντες

ATRX: Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της έκφρασης του ATRX γονιδίου, έχουν περιγραφεί στην πλειονότητα των σταδίου II και III αστροκυτωμάτων και στα δευτερογενή ΠΓΒ ενώ είναι σπάνια στα πρωτογενή ΠΓΒ. Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με φαινότυπο επιμήκυνσης των τελομερών [103, 104].

TERT: Μεταλλάξεις στον υποκινητή της τελομεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (TERT) όπου οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης της τελομεράσης, έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους. Έχουν βρεθεί στην πλειονότητα των πρωτογενών ΠΓΒ ενώ είναι πιο σπάνιες σε γλοιώματα κατώτερου επιπέδου και δευτερογενή ΠΓΒ [105, 106].

Ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας NR5A2 και οι λειτουργίες του

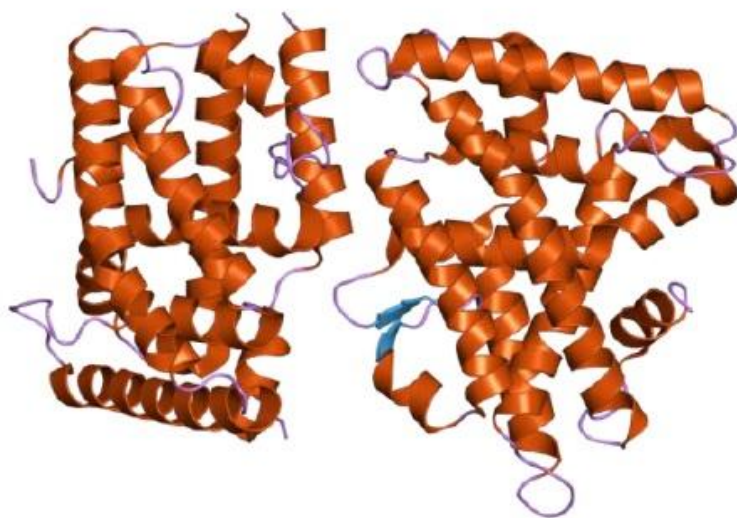
Ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας NR5A2 (nuclear receptor 5A2) ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων 5A, η οποία περιλαμβάνει 4 αναγνωρισμένα μέλη (NR5A1-NR5A4). Το γονίδιο του NR5A2 κλωνοποιήθηκε αρχικά στο ποντίκι λόγω της ομολογίας του με το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα fushi tarazu 1 (ftz-f1) στη *Drosophila melanogaster*. Το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί τον NR5A2 περιέχει οκτώ εξώνια καλύπτοντας περισσότερες από 150 κιλοβάσεις (kb) του χρωμοσώματος 1 στον γενετικό τόπο 1q32.11. Τουλάχιστον τρεις ισόμορφες έχουν αναγνωριστεί. Στον ποντικό, ο NR5A2 εδράζεται στην περιοχή E4 του χρωμοσώματος 1. Τρεις θέσεις πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες GATA και ένα μοτίβο που αναγνωρίζει τις homeodomain (ομοιοπεριοχή πρωτεϊνών) πρωτεΐνες Nkx είναι συντηρημένα στον υποκινητή του NR5A2 από το ποντίκι μέχρι τον άνθρωπο [107]. Ομόλογα του NR5A2 προσδιορίστηκαν μετέπειτα σε διάφορα είδη, όπως στον επίμυ, στο κοτόπουλο, στο άλογο, στο zebrafish, στο βάτραχο και στον άνθρωπο. Το κοντινότερο 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 [108]. Ο NR5A2 είναι επίσης γνωστός στην βιβλιογραφία και ως LRH-1 (liver receptor homologue 1), CPF, FTF, FTZ-F1, hB1F. Ο NR5A2 προσδένει στο DNA ως μονομερές στην αλληλουχία YCAAGG YCR (όπου Y οποιαδήποτε πυριμιδίνη και όπου R οποιαδήποτε πουρίνη), το γενικό μοτίβο αναγνώρισης των πυρηνικών υποδοχέων της υποοικογένειας NR5A [107, 109-111]. Η περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (Ligand Binding Domain-LBD) των περισσότερων πυρηνικών υποδοχέων αποτελείται από δώδεκα περιοχές α-έλικας (H1-H12) αναδιπλωμένες σε ένα τρι-επίπεδο ελικοειδές «σάντουιτς» με μια συντηρημένη

β-στροφή μεταξύ της H5 και H6 [107]. Το LBD του ακόμη περιλαμβάνει μια θήκη στην οποία προσδένει κάποιος συνδέτης προκαλώντας κάποια αναστρέψιμη διαμορφωτική αλλαγή [107, 111]. Στου ορφανούς υποδοχείς όμως, το κλειδί για κάποια συστατική ενεργοποίηση μπορεί να κρύβεται στον N-τελικό άκρο του LBD. Αυτό είναι ισχυρά συντηρημένο στου ορφανούς υποδοχείς ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο και σε άλλους πυρηνικούς υποδοχείς [107].

Ο NR5A2 μέχρι σήμερα έχει εντοπιστεί σε ιστούς που προέρχονται από το ενδόδερμα, όπως το ήπαρ, το πάγκρεας και το έντερο, δικαιολογώντας έτσι την λειτουργική ταξινόμησή του ως έναν εντερο-ηπατικό πυρηνικό υποδοχέα. Εντοπίζεται επίσης στις ωοθήκες, στα προλιποκύτταρα και σε χαμηλότερα επίπεδα στον πλακούντα και είναι απαραίτητος για την εγκυμοσύνη. Έκφραση του mRNA του NR5A2 έχει επίσης εντοπιστεί στο ΚΝΣ των ενήλικων θηλαστικών [112] και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού [113]. Είναι απαραίτητος στην εμβρυογένεση, καθώς ποντικοί ομόζυγοι για μία γαμετική μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί το NR5A2 πεθαίνουν πριν την E 6.5 - E 7.5 εμβρυϊκή ημέρα με μορφολογικά χαρακτηριστικά τυπικά ανεπιτυχούς γαστριδίωσης και δυσλειτουργίας του ενδοδέρματος. Κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, καθώς μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο NR5A2 μπορεί να αντικαταστήσει τον Oct4 στον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων ποντικού σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (τεχνητά πολυδύναμα βλαστοκύτταρα - iPS cells) [114]. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμικότητας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων στο στάδιο του επιβλάστη [115], όπου συνεντοπίζεται με τους ρυθμιστές Nanog και Sox2 [116].

Ο NR5A2 έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει επίσης βασικό ρόλο 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 (reverse cholesterol transport) [107]. Το πρώτο, και καθοριστικό για τα επόμενα, βήμα της απομάκρυνσης της χοληστερόλης από το σώμα μέσω της αποικοδόμησης σε χολικά οξέα λαμβάνει χώρα αποκλειστικά 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. Σε

συμφωνία με τα παραπάνω, ο NR5A2 έχει δειχθεί ότι αποτελεί έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστή-κλειδί της έκφρασης διαφόρων λειτουργικών γονιδίων των ηπατοκυττάρων, όπως του CYP7A1 γονιδίου και του κυτοχρώματος P450 [117, 118]. Αλληλεπιδρά ακόμη με τον άτυπο ορφανό πυρηνικό υποδοχέα small heterodimer partner1 (Shp-1), ο οποίος στερείται της επικράτειας πρόσδεσης του DNA και καταστέλλει την ενεργοποίηση πυρηνικών υποδοχέων όπως του NR5A2 στο ήπαρ [119]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως χρήση ειδικών μορίων που δρουν ως αγωνιστές του NR5A2, μειώνει τα τριγλυκερίδια και την γλυκόζη του ορού του αίματος, ενώ βελτιώνει 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) [120]. Ο Prox1 φαίνεται επίσης να καταστέλλει την επαγόμενη από τον NR5A2 μεταγραφική ενεργοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου CYP7A1 στο ήπαρ [118]. Επιπλέον, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ηπατικά βλαστικά κύτταρα ποντικών, έδειξαν ότι η υπερέκφραση του NR5A2 εμποδίζει τον σχηματισμό της αποικίας των πρώιμων ηπατοκυττάρων, ενώ η υπερέκφραση του Prox1 επάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των πρώιμων ηπατικών κυττάρων. Επίσης, ο Prox1 φαίνεται να επάγει την έκφραση των κυκλινών D2, E1, E2 ενώ καταστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης p16ink4a και του καταστολέα των κυκλινών. Αυτά τα αποτελέσματα δηλώνουν ότι ο NR5A2 και ο Prox1 συντονίζονται για να ρυθμίζουν την ανάπτυξη των πρώιμων ηπατοκυττάρων [121].



Εικόνα 3 Απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής του NR5A2

Ο ρόλος του NR5A2 σε διάφορες μορφές καρκίνου

Παραπάνω είδαμε πως ο NR5A2 έχει αρκετές λειτουργίες και μια από αυτές είναι η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Στα πλαίσια αυτής της δραστηριότητας ο NR5A2 έχειδειχθεί να έχει ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνων του παχέος εντέρου, του μαστού και του παγκρέατος.

Καρκίνος του παχέος εντέρου

Πρόσφατα στοιχεία καταδεικνύουν τον ρόλο του NR5A2 στον καρκίνο του παχέος εντέρου τόσο στη ανάπτυξη όσο και στην εξάπλωσή του. Ο NR5A2 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στις εντερικές λάχνες όπου και προάγει τον πολλαπλασιασμό και την ανανέωση των κυττάρων. Από τον Bottrugno έχειδειχθεί πως ο NR5A2 προάγει τον πολλαπλασιασμό τροποποιώντας την έκφραση των κυκλινών της G1 φάσης, cyclin D1 και cyclin E1. Πιο συγκεκριμένα ο NR5A2 ενεργοποιεί το σύμπλοκο β-catenin/Tcf4 το οποίο επάγει την έκφραση της cyclin D1 και του c-Myc ενώ προσδένει κατευθείαν στον υποκινητή της cyclin E1 [122]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω έρχεται, το γεγονός πως δυσλειτουργία του NR5A2 προστατεύει από την ανάπτυξη όγκων τόσο σε γενετικά όσο και σε χημικά μοντέλα επαγωγής καρκίνου του εντέρου. Αλλαγές τόσο στην έκφραση όσο και στη χωροταξία του NR5A2 έχουν παρατηρηθεί σε καρκίνους του παχέος εντέρου στον άνθρωπο, όπου αυξημένη έκφραση του NR5A2 παρατηρείται στα επιθηλιακά κύτταρα της επιφάνειας όπου φυσιολογικά ούτε τον εκφράζουν και ούτε πολλαπλασιάζονται [123]. Παρ' όλα αυτά, η έλλειψη φαινοτύπου πολλαπλασιασμού σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία στερούνται του NR5A2 γεννά ερωτήματα σχετικά με τον ρόλο του NR5A2 [124].

Καρκίνος του μαστού

Στον λιπώδη ιστό του ανθρώπινου μαστού, ο NR5A2 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και εντοπίζεται συγκεκριμένα στο στρωματικό τμήμα [125]. Στον καρκίνο του μαστού όμως, ο NR5A2 έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης και εντοπίζεται τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα του όγκου όσο και κύτταρα του εσωτερικού στρώματος του όγκου [126, 127]. Υψηλή έκφραση επίσης, παρατηρείται σε επιθετικές μορφές καρκινώματος και στο μορφές πορώδους καρκινώματος [127].

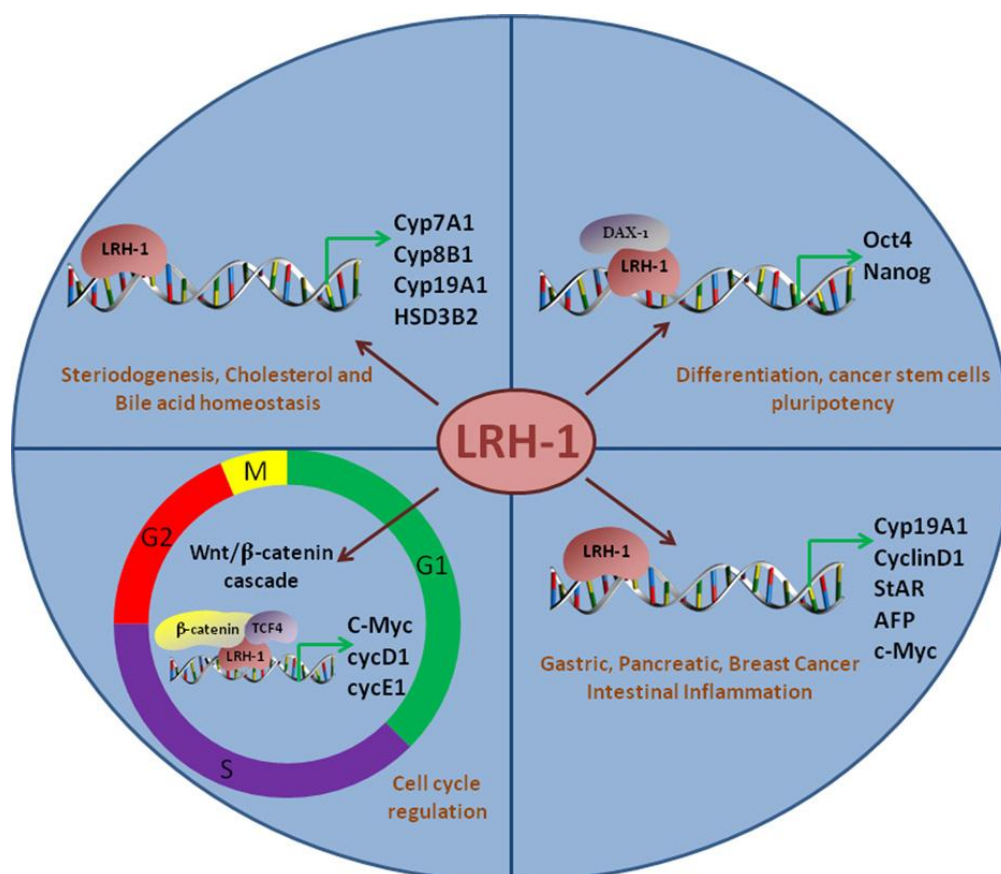
Επιπλέον στοιχεία καταδεικνύουν πως ο NR5A2 ρυθμίζει την έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων ERα στον καρκίνο του μαστού. Καταστολή του NR5A2 σε κύτταρα MCF-7 (καρκινική σειρά του μαστού) αναστέλλει την έκφραση του ERα και των γονιδίων «στόχων» του όπως το pS2, ενώ η υπερέκφραση του NR5A2 σε αυτά τα κύτταρα έχει το αντίθετο αποτέλεσμα. Το αποτέλεσμα αυτό διαμεσολαμβάνεται από απ' ευθείας πρόσδεση του NR5A2 στον υποκινητή του ERα [128]. Στοιχεία ακόμα καταδεικνύουν πως και ο ERα ρυθμίζει με θετικό τρόπο την έκφραση του NR5A2.

Παρ' όλο που τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν πως ο NR5A2 επάγει τον πολλαπλασιασμό μέσω της ρύθμισης της σηματοδότησης των οιστρογόνων, έχει δειχθεί πως έχει και δράση ανεξάρτητη από τα οιστρογόνα στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Αναστολή του NR5A2 μείωσε τον πολλαπλασιασμό τόσο σε κύτταρα παρουσία οιστρογόνων όσο και απουσία αυτών. Αντίθετα η υπερέκφραση του NR5A2 προκάλεσε τον αντίθετο φαινότυπο και στις δύο ομάδες [129].

Ακόμη υπερέκφραση του NR5A2 σε κύτταρα του καρκίνου του μαστού προκαλεί τμήση της E-Cadherin στην ανενεργή μορφή της, πιθανότητα μέσω της δράσης των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) [129], αφού είναι γνωστό πως ο NR5A2 ρυθμίζει την έκφραση της MMP9 στις ωοθήκες [130]. Επίσης ο NR5A2 παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδόμηση της ακτίνης στα καρκινικά κύτταρα του μαστού [129]. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν μια ανάμιξη του μετάβαση από την επιθηλιακή στην μεσεγχυματική κατάσταση (EMT) [115, 131-133].

Καρκίνος του παγκρέατος

Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι μεταλλάξεις του NR5A2 και τον περιοχών ανοδικά του υποκινητή του σχετίζονται με τον καρκίνο του παγκρέατος [134]. Επιπλέον, αυξημένη έκφραση του NR5A2 έχει βρεθεί σε ανθρώπινα πορώδη αδενοκαρκινώματα [135]. Σε καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα, ο NR5A2 επίσης επάγει τον πολλαπλασιασμό μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των cyclin D1, cyclin E1 και του c-myc. Αντίθετα, καταστολή του NR5A2 οδήγησε σε καταστολή του κυτταρικού κύκλου χωρίς να προκαλέσει απόπτωση στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα. Η μελέτες αυτές φανερώνουν έναν σημαντικό ρόλο του NR5A2 στον καρκίνο του παγκρέατος και τον καθιστούν ως έναν σημαντικό θεραπευτικό στόχο [135]. Βέβαια πιο πρόσφατα δεδομένα από γενετικά μοντέλα καταδεικνύουν πως ολική απώλεια του NR5A2 [136] ή απώλεια του ενός αλληλίου [137] του NR5A2 οδηγεί σε ανάπτυξη.



Εικόνα 4 Φυσιολογικές δράσεις του NR5A2/LRH1

Σκοπός εργασίας και πειραματική πορεία

Όπως είδαμε παραπάνω ο NR5A2 είναι ένας πολυπράγμων παράγοντας με ποικίλες λειτουργίες. Μια εξ' αυτών αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπου μέσα από μελέτες ο NR5A2 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως ογκογονίδιο σε μερικές μορφές καρκίνου. Παρ' όλα αυτά λίγα είναι γνωστά για την δράση του NR5A2 στις νεοπλασίες του Νευρικού Συστήματος. Πρόσφατα δημοσιευτα δεδομένα του εργαστηρίου μας καταδεικνύουν έναν διαφορετικό ρόλο του NR5A2 στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα. Στα νευρικά βλαστικά κύτταρα η υπερέκφραση του NR5A2 οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και επαγωγή της νευρογένεσης και καταστολή της γλοιογένεσης. Αντίθετα καταστολή του NR5A2 οδήγησε σε αύξηση του πολλαπλασιασμού και την κυτταρική αυτό-ανανέωση των Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα εγείρουν την πιθανότητα ο NR5A2 να δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο νευρικό σύστημα, σε αντίθεση με άλλους ιστούς. Βασιζόμενοι αυτήν την υπόθεση εργασίας, μελετήσαμε την δράση του NR5A2 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του Νευρικού Συστήματος. Χρησιμοποιήσαμε σειρές από Νευροβλάστωμα ποντικού και ανθρώπου ενώ το ίδιο πράξαμε και για μια άλλη μορφή καρκίνου του Νευρικού Συστήματος, το γλοιοβλάστωμα. Χρησιμοποιήθηκαν αγωνιστές του NR5A2 στα νευρικά βλαστικά κύτταρα και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ μια εξ αυτών των σειρών χρησιμοποιήθηκε για αλλομεταμόσχευση (xenografts) για την *in vivo* μελέτη της δράσης των αγωνιστών του NR5A2.

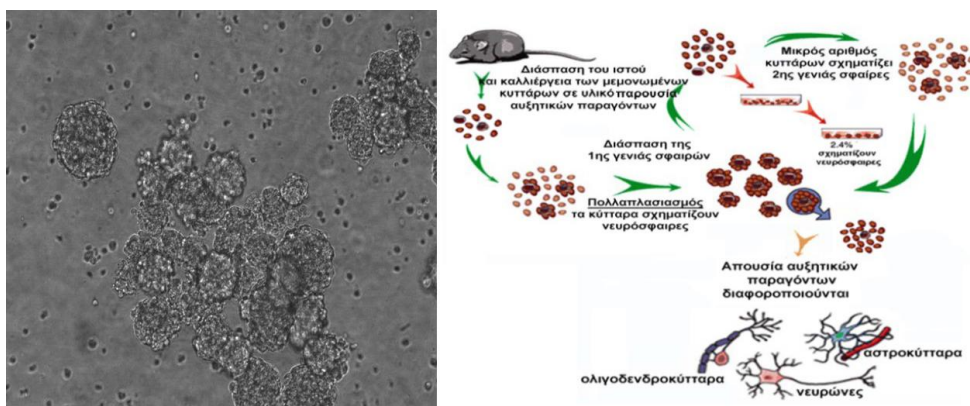
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων (νευρόσφαιρες) και κυτταρικών σειρών

Οι θηλυκές μητέρες-ποντίκια στελέχους Wistar γεννήθηκαν και ανατράφηκαν στο ΠΒΕΑΑ, υπό σταθερές συνθήκες διαβίωσης: η θερμοκρασία περιβάλλοντος διατηρούνταν συνεχώς στους 23-25°C, ενώ εξασφαλιζόνταν σταθεροί κύκλοι φωτισμού 12 ωρών (8:00-20:00 σε φως και 20:00-8:00 σε σκοτάδι). Έπιναν νερό βρύσης και έτρωγαν τροφή σε κύβους κατά βούληση. Στις μελέτες μας αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα ποντικού.

Στην καλλιέργεια, ένα μονό νευρικό βλαστικό κύτταρο μπορεί να διαιρεθεί και να φτιάξει περισσότερα κύτταρα τα οποία όλα μαζί σχηματίζουν μια στρογγυλή, κοίλη δομή, γνωστή ως «νευρόσφαιρα». Οι νευρόσφαιρες (νευροσφαιρίδια) συνεχίζουν να μεγαλώνουν στην καλλιέργεια, και όταν μεγαλώσουν αρκετά, διαχωρίζονται σε μονά κύτταρα. Τα NBK προέρχονταν από τον τελεγκέφαλο ή από τον νωτιαίο μυελό εμβρύου ποντικού ηλικίας E14.5 και διατηρούνταν σαν καλλιέργειες νευρόσφαιρων σε ένα θρεπτικό μέσο χωρίς ορό [μείγμα 1:1 DMEM και F-12 με πενικιλίνη (100 units/ml, Invitrogen) και στρεπτομυκίνη (100 mg/ml, Invitrogen)], που περιείχε το συμπλήρωμα B-27 [B-27 supplement (1 ml/50 ml θρεπτικού μέσου, Invitrogen)], ινσουλίνη (20 mg/ml; Sigma), τον ανασυνδυσασμένο ανθρώπινο βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (bFGF 20 ng/ml; R&D Systems) και τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF 20 ng/ml; R&D Systems). Ύστερα από 5 έως 7 μέρες στην καλλιέργεια, οι επιπλέοντες νευρόσφαιρες διαχωρίζονταν μεταξύ τους με θρυψινοποίηση και τα μονήρη κύτταρα αφήνονταν έως ότου να ξανασχηματίσουν σφαίρες τουλάχιστον τρεις φορές πριν την περαιτέρω χρησιμοποίησή τους. Οι μελέτες πολλαπλασιασμού των NBK πραγματοποιούνταν μετά από διάσπαση σε μονήρη κύτταρα, επίστρωση αυτών των κυττάρων σε καλυπτρίδες (coverslips) επικαλυμμένες με poly-L-lysine (πυκνότητα κυττάρων 6×10^4) σε πιάτα καλλιέργειας των 24 θέσεων (24-well plates), και περαιτέρω καλλιέργεια για δύο μέρες παρουσία EGF/bFGF. Για τη διαφοροποίηση των NBK, οι

διαχωρισμένες νευρόσφαιρες τοποθετούνταν σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με poly-L-lysine (πυκνότητα κυττάρων 7×10^4) και διατηρούνταν σε καλλιέργεια για δύο ή τρεις μέρες απουσία αυξητικών παραγόντων. Από το σύστημα αυτό μετά από τρεις ημέρες διαφοροποίησης προέκυπταν 10% νευρώνες, 1-5% ολιγοδενδροκύτταρα, 60% αστροκύτταρα, ενώ τουπόλοιπο 25% των κυττάρων παράμεναν πολυδύναμα NBK.

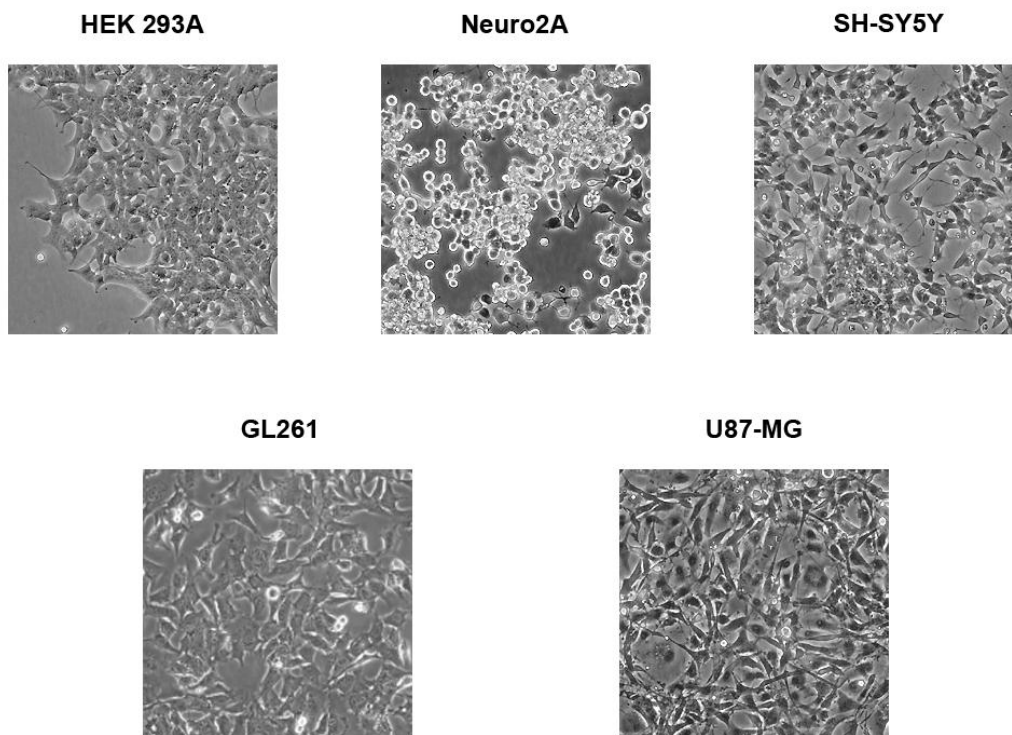


Εικόνα 5 Απεικόνιση νευρικών βλαστικών κυττάρων στη μορφή των νευρόσφαιρων καθώς και τρόπος απομόνωσης από έμβρυα ποντικού 14 ημερών (E14)

Πέρα από την καλλιέργεια των Νευρικών Βλαστικών κυττάρων, τα οποία χρίζουν σημαντικής προσοχής, κύριες πειραματικές διεργασίες πραγματοποιήθηκαν και σε άλλες κυτταρικές σειρές οι οποίες παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 1 Λίστα με τις κυτταρικές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα και του καλλιεργητικού τους μέσου

Κυτταρικές σειρές	Θρεπτικό μέσο
HEK 293A	DMEM (4.5 g/l D-Glucose) 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 100 mg/mL pen/strep (Invitrogen)
Neuro2A Νευροβλάστωμα ποντικού	DMEM (1.0 g/l D-Glucose) 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 100 mg/mL pen/strep (Invitrogen)
SH-SY5Y Νευροβλάστωμα ανθρώπου	DMEM (1.0 g/l D-Glucose)/F-12 (1:1) 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 100 mg/mL pen/strep (Invitrogen)
GL261 Γλοιοβλάστωμα ποντικού	DMEM (4.5 g/l D-Glucose) 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 100 mg/mL pen/strep (Invitrogen)
U87-MG Γλοιοβλάστωμα ανθρώπου	RPMI 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 100 mg/mL pen/strep (Invitrogen)



Εικόνα 6 Απεικόνιση της μορφολογίας των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήσαμε

Διαμόλυνση με CaCl_2 κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μια έως τρεις μέρες έως ότου καλύψουν το 70%-80% της επιφάνειας του πιάτου στο οποίο αναπτύχθηκαν (24-well ή 6-well). Για τη διαδικασία της διαμόλυνσης ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα: α) το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αντικαταστάθηκε με φρέσκο υλικό 2,5 ώρες πριν τη διαμόλυνση β) για κάθε well, το προς διαμόλυνση πλασμιδιακό DNA, το οποίο απομονώθηκε σε μεγάλη κλίμακα (Plasmid Midi kit-QIAGEN) ύστερα από μετασχηματισμό (transformation) χημικά δεκτικών κυττάρων *E.coli* (στελέχη DH5a), αναμείχτηκε με διαλύμα 2M

CaCl₂ και dH₂O. Η συγκέντρωση του CaCl₂ στο συνολικό μίγμα διαμόλυνσης είναι 25mMγ) το μείγμα του DNA προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα σε διαλύμα 2xHBS pH 7.1 [50mM HEPES pH 7.1 (Sigma), 280mM NaCl (Carlo Erba), 1.5mM Na₂HPO₄ (Riedel-de Haen)] και επώαστηκε 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου δ) ακολούθως, το μείγμα διαμόλυνσης προστέθηκε σταδιακά σε ολόκληρη την επιφάνεια κάθε well και τα κύτταρα επώαστηκαν overnight στις συνθήκες ανάπτυξής τους, ώστε να προσλάβουν το διαμολυσμένο DNA. Η τελική συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA είναι περίπου 2ng/μL ε) την επόμενη ημέρα, το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με φρέσκο υλικό λόγω της τοξικότητας του HBS, και τα κύτταρα επώαστηκαν για ακόμα 24 ώρες πριν υποβληθούν στη δοκιμασία του ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο ορθότητας του πλασμιδιακού DNA.

Διαμόλυνση με Lipofectamine, κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μια έως τρεις μέρες έως ότου καλύψουν το 70%-80% της επιφάνειας του πιάτου στο οποίο αναπτύχθηκαν (24-well ή 6-well). Για τη διαδικασία της διαμόλυνσης ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα: α) το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αντικαταστάθηκε με OPTI-MEM με σκοπό τα προκληθεί μερική ασιτία των κυττάρων, μισή ώρα πριν τη διαμόλυνση β) για κάθε well, το προς διαμόλυνση πλασμιδιακό DNA, το οποίο απομονώθηκε σε μεγάλη κλίμακα (Plasmid Midi kit-Macherey Nagel) ύστερα από μετασχηματισμό (transformation) χημικά δεκτικών κυττάρων *E.coli* (στελέχη DH5a), διαλύθηκε σε OPTI-MEM, γ) το μείγμα του DNA προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα σε διαλύμα Lipofectamine 2000 (Invitrogen) και επώαστηκε 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου δ) ακολούθως, το μείγμα διαμόλυνσης προστέθηκε σταδιακά σε ολόκληρη την επιφάνεια κάθε well και τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ώρες σε OPTI-MEM ώστε να προσλάβουν το διαμολυσμένο DNA. Η τελική συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA είναι περίπου 2ng/μL ε) μετά το πέρας των έξι ωρών, το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με φρέσκο υλικό λόγω της τοξικότητας της Lipofectamine και τα κύτταρα επώαστηκαν

για ακόμα 42 ώρες πριν υποβληθούν στη δοκιμασία του ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο ορθότητας του πλασμιδιακού DNA.

Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA

Για την μελέτη των μοριακών μηχανισμών δράσης του NR5A2 στα κακρινικά κύτταρα είναι απαραίτητη η απομόνωση RNA από τα κύτταρα στα οποία υπερεκφράσθηκε ο NR5A2. 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 EDTApH 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 αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription PCR/RT-PCR) και 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.

Πίνακας 2: Κατάλογος με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

ΓΟΝΙΔΙΑ	κατευθυνση Primer	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
human NR5A2	forward	AGCACCTTTGGGCTTATGTG
	reverse	GCAGCTTCATTTGGTCATCA
human β -Actin	forward	CTCTTCCAGCCTTCCTCCT
	reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
human CyclinD1	forward	CCCTCGGTGTCCTACTTCAA
	reverse	AGGAAGCGGTCCAGGTAGTT
human CyclinE1	forward	ATCCTCCAAAGTTGCACCAG
	reverse	AGGGGACTTAAACGCCACTT
human p21	forward	GGAAGACCATGTGGACCTGT
	reverse	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA
human p27	forward	AGAGTTAACCCGGGACTTGG
	reverse	GCCCTCTAGGGGTTTGTGAT
mouse p21	forward	GCAGACCAGCCTGACAGATT
	reverse	CCTGACCCACAGCAGAAGAG
mouse p27	forward	TCAGCGCAAGTGGAATTT
	reverse	GGGCCTGTAGTAGAACTCG
mouse cyclin E1	forward	AAGCCCTCTGACCATTGTGTCC
	reverse	CTAAGCAGCCAACATCCAGGAC
mouse β -actin	forward	CCCAGGCATTGCTGACAG
	reverse	TGGAAGGTGGACAGTGAGGC
mouse cyclin D1	forward	TAGGCCCTCAGCCTCACTC
	reverse	CCACCCCTGGATAAAGCA
mouse LRH1	forward	TGAGTGGGCCAGGAGTAGTA
	reverse	ATCAAGAGCTCACTCCAGCA

Ανοσοφθορισμός σε πρωτογενής και καρκινικές κυτταρικές σειρές

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού εφαρμόστηκε σεκαρκινικά και νευρικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από το ΚΝΣ (τελεγκέφαλο ή νωτιαίο μυελό)

εμβρύου ποντικού με σκοπό τη μελέτη του φαινοτύπου κατά την υπερέκφραση του NR5A2 και την χρήση αγωνιστών για την εν λόγω πρωτεΐνη.

Η διαδικασία του ανοσοφθορισμού αρχίζει με την επίστρωση των κυττάρων σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με poly-L-lysine (πυκνότητα κυττάρων 6×10^4) σε πιάτα καλλιέργειας των 24 θέσεων (24-well plates), επώαση στους 37°C σε συνθήκες $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ για δύο ώρες, και περαιτέρω καλλιέργεια για δύο μέρες (48 ώρες) παρουσία του ανάλογου θρεπτικού μέσου. Στα πειράματα ανοσοφθορισμού για τη διαφοροποίηση των NBK, οι διαχωρισμένες νευρόσφαιρες τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με poly-L-lysine (πυκνότητα κυττάρων 7×10^4), επώαστηκαν στους 37°C για δύο ώρες σε συνθήκες $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$, και διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια για τρεις μέρες (72 ώρες) απουσία αυξητικών παραγόντων. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού: τα coverslips μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια λαβίδας σε τρυβλίο Petri πάνω σε parafilm, ξεπλύθηκαν με 1x PBS, τοποθετήθηκαν για 20min σε 4% PFA για να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα, ξεπλύθηκαν ξανά τρεις φορές με 1x PBS, τοποθετήθηκαν στο blocking buffer (5% ορός, 0,1% Triton X-100, 1x PBS) για 1 ώρα, στη συνέχεια επώαστηκαν overnight στους 4°C , παρουσία ειδικών πρωτογενών αντισωμάτων τα οποία είναι αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα (1% ορός, 0,1% Triton X-100, 1x PBS), πλύθηκαν με 1x PBS επί τρεις φορές, τοποθετήθηκαν στο ίδιο διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος για 1.30 ώρα στο σκοτάδι, επώαστηκαν για 10min με DAPI, πλύθηκαν με επί τρεις φορές 1x PBS, μία φορά με H_2O και τέλος μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα χρησιμοποιώντας DAKO ή Mowiol, με την επιφάνεια των κυττάρων να εφάπτεται στην πλάκα. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με εστίαση x20 φορές. Τα πρωτογενή και τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν γενικά στα πειράματα ανοσοφθορισμού φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοφθορισμό. Τα δευτερογενή έχουν όλα την ίδια λειτουργική αραίωση 1:400 και δίπλα από το όνομά τους αναφέρεται και το μήκος κύματος απορρόφησής τους

Πρωτογενή αντισώματα (λειτουργική αραίωση)	Δευτερογενή αντισώματα
chicken anti-GFP (1:2000)	donkey anti-chicken 488nm
rat anti-BrdU (1:400)	donkey anti-rabbit 488nm
rabbit anti-PH3 (1:600)	donkey anti-rat 555nm
mouse anti-Nestin (1:400)	donkey anti-mouse 568
rabbit anti-procaspase3 (1:1000)	donkey anti-rabbit 647nm
mouse anti-βIII Tubulin (Tuj1) (1:1000)	
chicken anti-GFAP (1:1500)	

Ενδοπεριτοναϊκή ένεση καρκινικών κυττάρων σε NOD/SCID ποντίκια

Καλλιεργούμε τα κύτταρα μας σε φλάσκες ανάλογου μεγέθους με τον αριθμό των κυττάρων που θέλουμε να συλλέξουμε (προτιμότερες είναι οι T75 φλάσκες ή τα 100mmplates). Την ημέρα των ενέσεων συλλέγουμε τα κύτταρα από το θρεπτικό μέσο και τα φυγοκεντρούμε. Το ίζημα από κάθε σωλήνα επαναιωρείται με αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1X και συλλέγουμε το αναιώρημα των κυττάρων από κάθε σωλήνα σε έναν. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 1500rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα που προκύπτει ξεπλένεται με αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1X και στην συνέχεια φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στα 1500rpm για 5 λεπτά. Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία. Το τελικό ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο PBS 1X και ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Ανάλογα με τον πληθυσμό των κυττάρων κάνουμε τις κατάλληλες αραιώσεις με σκοπό να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση ανά ποντίκι, έχοντας υπόψιν μας πως σε κάθε ποντίκι ενίονται 100μL από εναιώρημα κυττάρων σε PBS 1X. Ακολουθούν οι ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις και τα κύτταρα αφήνονται να σχηματίσουν όγκους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 σε διάφορες κυτταρικές σειρές

Δεδομένα από το εργαστήριό μας καταδείκνυαν τον NR5A2 ως έναν αναστολέα του πολλαπλασιασμού των Νευρικών Βλαστικών κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις παρατηρήσεις, πραγματοποιήσαμε πειράματα υπερέκφρασης του NR5A σε διάφορες κυτταρικές σειρές που αφορούν καρκίνους του Νευρικού Συστήματος. Τα πειράματα της υπερέκφρασης πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο της επιμόλυνσης είτε με CaCl₂ είτε με Lipofectamine. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα υπερέκφρασης του NR5A2 είναι το pEYFP-LRH1. Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή, περιέχει ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του ανθρώπινου NR5A2 το οποίο με αντίδραση λιγάσης προστέθηκε στον φορέα pEYFP-C1. Στο pEYFP-LRH1, ο NR5A2 έχει κλωνοποιηθεί στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του YFP (Yellow Fluorescent Protein) και το πρωτεϊνικό προϊόν είναι μια χμαιρική πρωτεΐνη, που περιλαμβάνει τον NR5A2 συζευγμένο με το YFP. Το YFP είναι μια φθορίζουσα πρωτεΐνη παρόμοια με το GFP (Green Fluorescent Protein) που δίνει ένα φθορίζον αποτέλεσμα όταν από αυτήν διέλθει κατάλληλου μήκους κύματος ακτινοβολία. Ως πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCAGGS-GFP το οποίο υπερεκφράζει σταθερά την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP.

Υπερέκφραση NR5A2/LRH1 στα κύτταρα HEK-293A

Για να ελέγξουμε την ικανότητα διαμόλυνσης των πλασμιδιακών κατασκευών μας, χρησιμοποιούμε κύτταρα της κυτταρικής σειράς HEK-293A (Human Embryonic Kidney). Μια μέρα πριν την διαμόλυνση καλλιεργήσαμε τα κύτταρα σε 24-well πιάτο, ενώ σε κάθε φρεάτιο το πιάτου είχε προηγηθεί προσθήκη καλυπτρίδας η οποία είχε επωαστεί με πολύ-L-λυσίνη. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο του CaCl₂ διαμολύναμε κάποια κύτταρα με το pEYFP-LRH1 και κάποια άλλα με το pCAGGS-GFP. Αφήσαμε τα κύτταρα να αναπτυχθούν 48 ώρες μετά την διαμόλυνση. Δυο ώρες

πριν την μονιμοποίηση (fixation) των κυττάρων προσθέσαμε σε κάθε φρεάτιο που αναπτύσσονταν την ουσία BrdU (Bromo-deoxy-Uridine) (SIGMA), που αποτελεί υποκατάστατο της θυμίνης, μιας εκ των τεσσάρων βάσεων του DNA. Το BrdU προσλαμβάνεται από τα κύτταρα κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου και η ανίχνευσή και πρόσληψή του αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων.

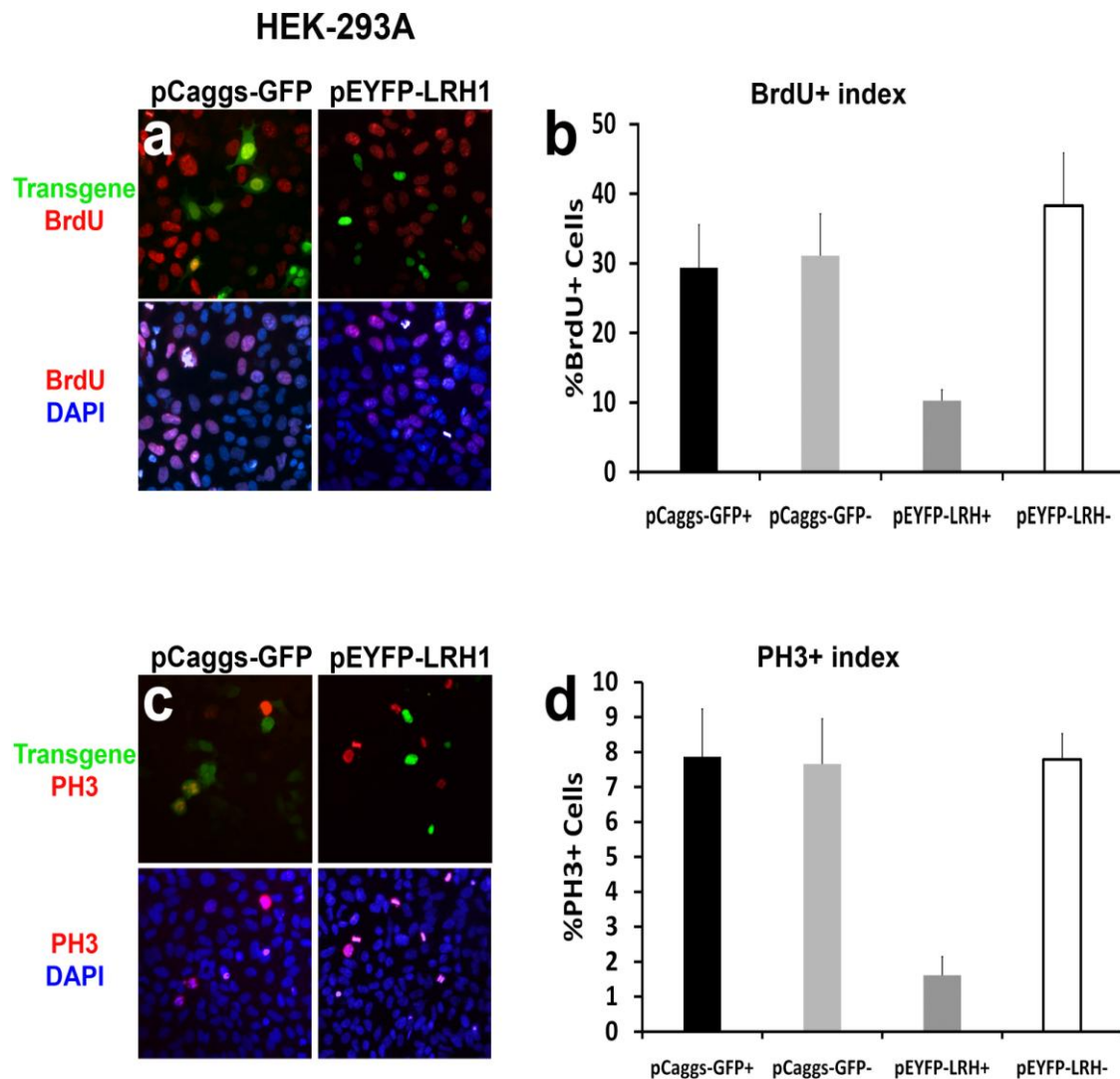
Μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων, ακολούθησαν μέθοδοι ανοσοκυτταροφθορισμού με σκοπό να εντοπιστούν η χμιαϊκή λειτουργική πρωτεΐνη YFP-LRH1 στα πειραματικά δείγματα, η πρωτεΐνη GFP στα δείγματα ελέγχου, το BrdU και η φωσφορυλιωμένη ιστόνη 3 (Phospho-Histone 3 ή PH3) και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Η τελευταία είναι ένας δείκτης για να εντοπιστούν εκείνα τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην φάση M του κυτταρικού κύκλου και αποτελεί επίσης έναν δείκτη πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων. Τα στερεωμένα κύτταρα, πριν την μονιμοποίησή τους, επώαστηκαν με DAPI. Τα πειράματα αυτά έδειξαν πως η χμιαϊκή πρωτεΐνη YFP-LRH1 εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων, εκεί που εντοπίζεται και φυσικά ο NR5A2/LRH1, σε αντίθεση με την GFP, η οποία εντοπίζεται σε όλο το κυτταρόπλασμα. Μετά τις μελέτες ανοσοφθορισμού, ακολούθησαν μετρήσεις των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια και αυτών που δεν διαμολύνθηκαν, ως προς τους δείκτες πολλαπλασιασμού. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι το ποσοστό πρόσληψης του BrdU από τα θετικά για την πρωτεΐνη YFP-LRH1 κύτταρα ανήλθε στο ποσοστό του 10% ενώ το ποσοστό των θετικών για την GFP κυττάρων αλλά και των κυττάρων που δεν μολύνθηκαν ήταν περίπου 32%. Παρόμοιες μετρήσεις έγιναν και για την PH3. Τα θετικά για την YFP-LRH1 κύτταρα ήταν επίσης θετικά για την PH3 σε ποσοστό 1,6% ενώ στις υπόλοιπες ομάδες θετικό σε ποσοστό 7,7%.

Συμπερασματικά έχουμε:

- I. Οι πλασμιαϊκοί φορείς λειτουργούν επιτυχώς. Πιο συγκεκριμένα η χμιαϊκή πρωτεΐνη YFP-LRH1 εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα ενώ η GFP εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα
- II. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HEK-293A στην S φάση όπως προκύπτει από τις μετρήσεις

πρόσληψης BrdU που δείχνουν περίπου 3 φορές μικρότερη πρόσληψη του από τα θετικά για YFP-LRH1 κύτταρα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα

- III. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 εμποδίζει τα κύτταρα HEK-293A να εισέλθουν στην φάση της Μίτωσης (M φάση). Η διαπίστωση αυτή προκύπτει από το γεγονός πως το ποσοστό των θετικών για PH3 κυττάρων τα οποία υπερεκφράζουν LRH1 είναι υποπενταπλάσιο σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα.

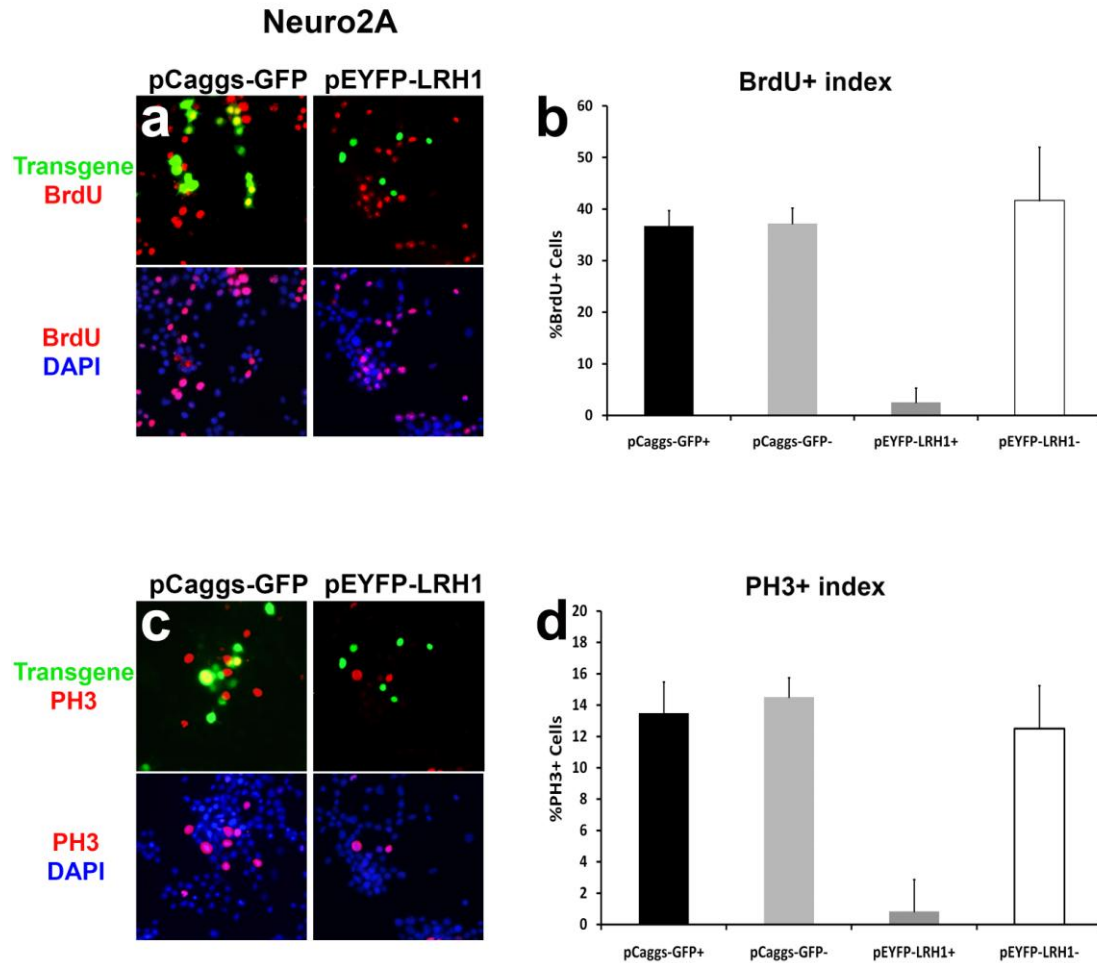


Εικόνα 7: Η πρωτεΐνη YFP-LRH1 εντοπίζεται αποκλειστικά όπως παρατηρούμε τα κύτταρα που φθορίζουν στο πράσινο στις παραπάνω σε αντίθεση με την GFP που εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο.

Με κόκκινο χρώμα εντοπίζονται τόσο το BrdU όσο και η PH3. Στο κυανό χρώμα εκπέμπουν οι πυρήνες των κυττάρων που έχουν επωαστεί με την φθορίζουσα χρωστική DAPI.

Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Neuro2A

Το επόμενο βήμα ήταν να εξετάσουμε το κατά πόσον η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 θα οδηγούσε σε μείωση του πολλαπλασιασμού και καρκινικών κυττάρων του Νευρικού Συστήματος. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την καρκινική σειρά Neuro2a που προέρχεται από Νευροβλάστωμα ποντικού. Ακολούθησε την ίδια διαδικασία με αυτή των HEK 293A. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι το ποσοστό πρόσληψης του BrdU από τα θετικά για την πρωτεΐνη YFP-LRH1 κύτταρα ήταν περίπου 2,5% ενώ, το αντίστοιχο ποσοστό των θετικών για την GFP κυττάρων αλλά και των κυττάρων που δεν μολύνθηκαν παρατηρήθηκε στο 37%. Παρόμοιες μετρήσεις έγιναν και για την PH3. Τα θετικά για την YFP-LRH1 κύτταρα ήταν επίσης θετικά για την PH3 σε ποσοστό 0,8% ενώ στις υπόλοιπες ομάδες θετικό σε ποσοστό 13%.



Εικόνα 8 Η πρωτεΐνη YFP-LRH1 εντοπίζεται αποκλειστικά όπως παρατηρούμε τα κύτταρα που φθορίζουν στο πράσινο στις παραπάνω σε αντίθεση με την GFP που εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο. Ακόμα γίνεται αντιληπτό πως δεν εντοπίζονται θετικά κύτταρα για την YFP-LRH1 και το BrdU ταυτόχρονα. Το ίδιο συμβαίνει και με το δείκτη του PH3.

Συμπερασματικά έχουμε:

- I. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων Neuro2a στην S φάση όπως προκύπτει από τις μετρήσεις πρόσληψης BrdU που δείχνουν περίπου 15 φορές μικρότερη πρόσληψη του από τα θετικά για YFP-LRH1 κύτταρα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα

- II. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 εμποδίζει τα κύτταρα Neuro2a να εισέλθουν στην φάση της Μίτωσης (Μ φάση), αφού όπως διαπιστώθηκε από τις μετρήσεις τα κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν NR5A2 είχαν περίπου 16 φορές μικρότερο ποσοστό κυττάρων στην Μ φάση όπως προέκυψε από τις μετρήσεις για τα θετικά για PH3 κύτταρα.

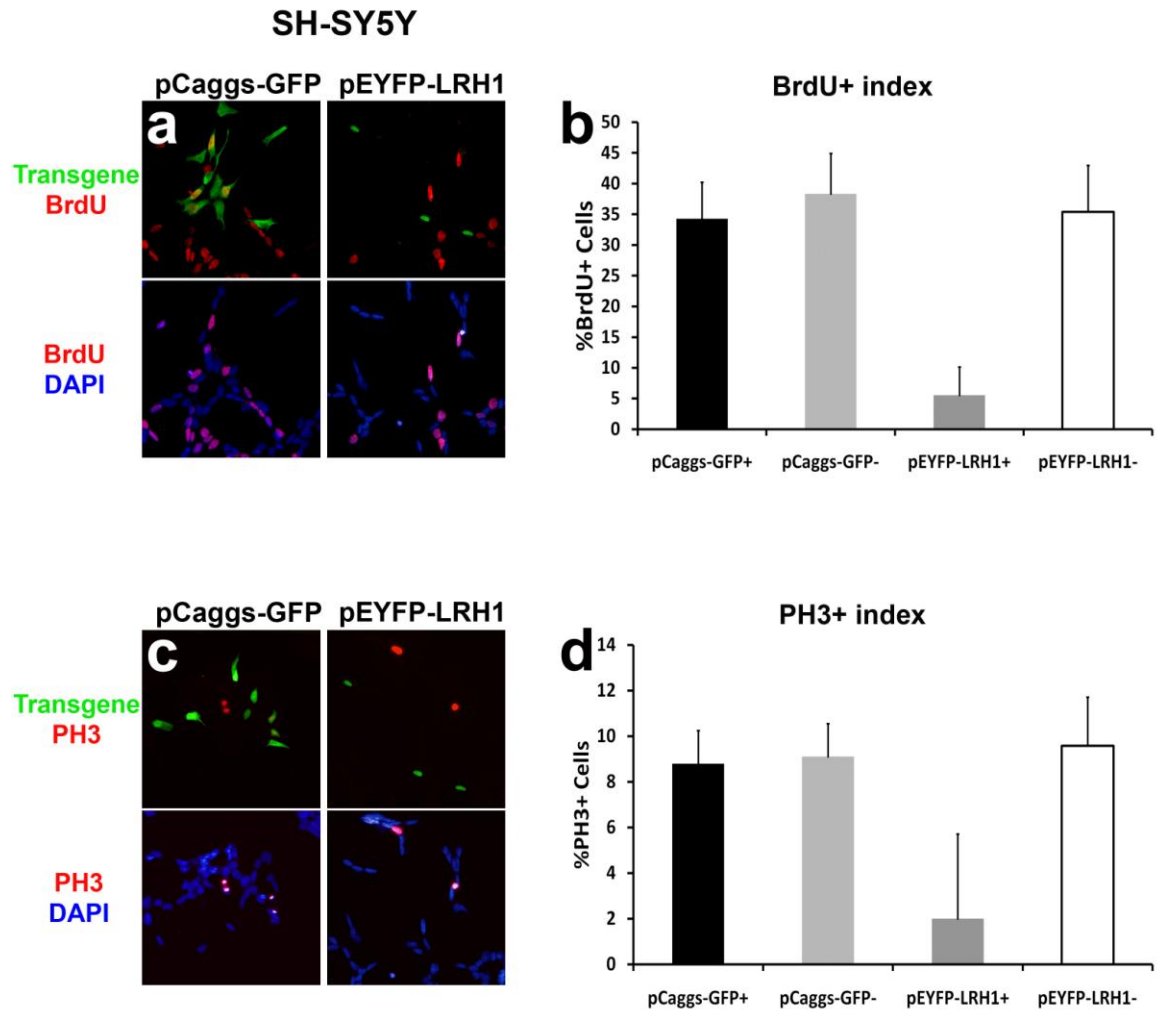
Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων SH-SY5Y

Συνεχίζοντας την πορεία μας στην διερεύνηση του πιθανού ογκοκατασταλτικού ρόλου του NR5A2 στον καρκίνο του Νευρικού Συστήματος, επεκταθήκαμε και σε άλλη σειρά καρκινικών κυττάρων. Πρόκειται για τα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία απομονώθηκαν από μυελό των οστών ενός τετράχρονου κοριτσιού με Νευροβλάστωμα. Ακολούθησε την ίδια διαδικασία με αυτή των HEK 293A. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι το ποσοστό πρόσληψης του BrdU από τα θετικά για την πρωτεΐνη YFP-LRH1 κύτταρα ήταν περίπου 5,5% ενώ, το αντίστοιχο ποσοστό των θετικών για την GFP κυττάρων αλλά και των κυττάρων που δεν μολύνθηκαν ήταν 36% περίπου. Παρόμοιες μετρήσεις έγιναν και για την PH3. Τα θετικά για την YFP-LRH1 κύτταρα ήταν επίσης θετικά για την PH3 σε ποσοστό 2% ενώ στις υπόλοιπες ομάδες θετικό σε ποσοστό 9%.

Συμπερασματικά έχουμε:

- I. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων SH-SY5Y στην S φάση όπως προκύπτει από τις μετρήσεις πρόσληψης BrdU που δείχνουν περίπου επτά φορές μικρότερη πρόσληψη του από τα θετικά για YFP-LRH1 κύτταρα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα
- II. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 εμποδίζει τα κύτταρα SH-SY5Y να εισέλθουν στην φάση της Μίτωσης (Μ φάση), αφού όπως διαπιστώθηκε από

τις μετρήσεις τα κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν NR5A2 είχαν περίπου τεσσεράμισι φορές μικρότερο ποσοστό κυττάρων στην M φάση όπως προέκυψε από τις μετρήσεις για τα θετικά για PH3 κύτταρα.



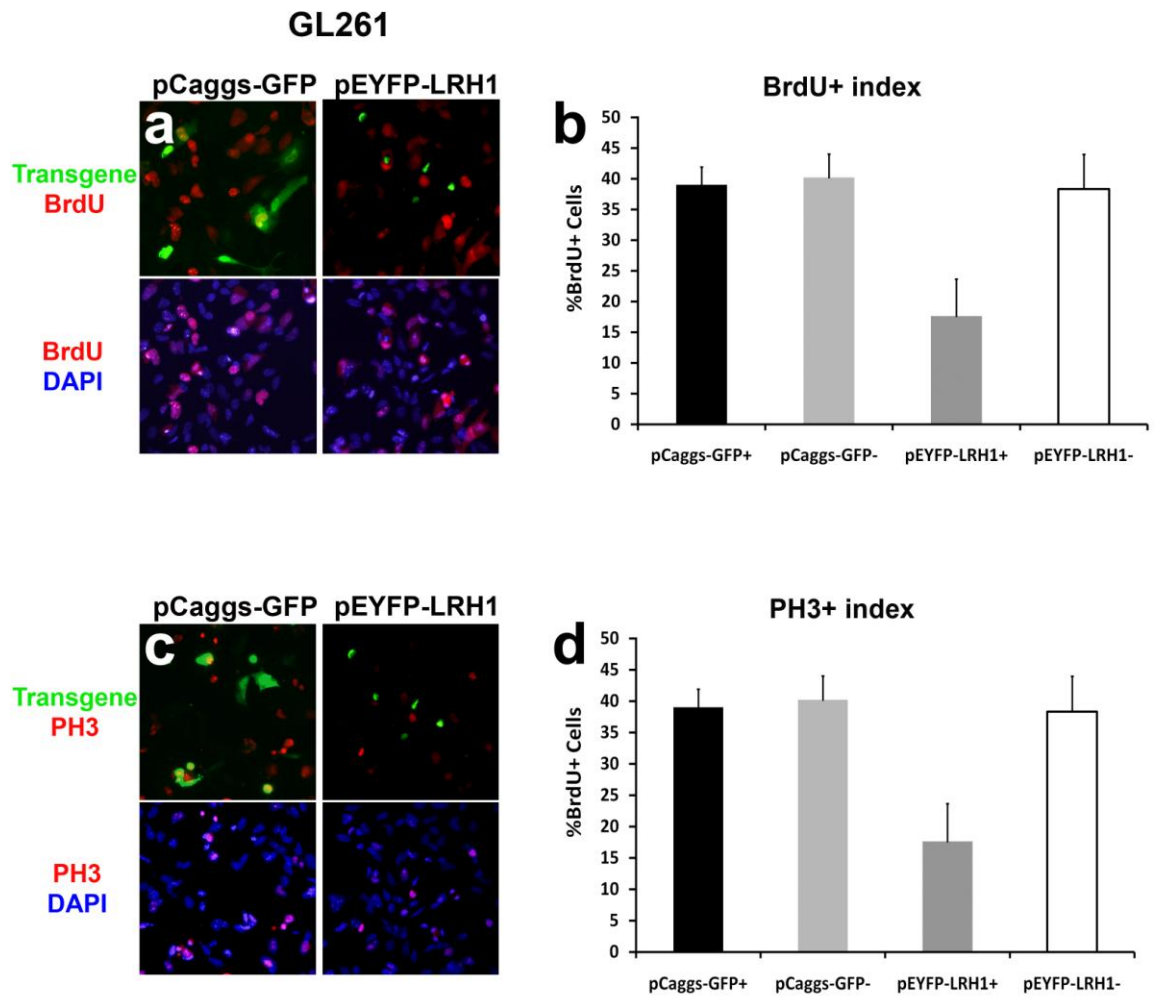
Εικόνα 9 Και σε αυτήν την κυτταρική σειρά πρωτεΐνη YFP-LRH1 εντοπίζεται αποκλειστικά όπως παρατηρούμε τα κύτταρα που φθορίζουν στο πράσινο στις παραπάνω σε αντίθεση με την GFP. Ακόμα γίνεται αντιληπτό πως δεν εντοπίζονται θετικά κύτταρα για την YFP-LRH1 και το BrdU ταυτόχρονα. Το ίδιο συμβαίνει και με το δείκτη του PH3.

Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων GL261

Έχοντας ικανοποιητικά στοιχεία για την ογκοκατασταλτική λειτουργία του NR5A2 σε κύτταρα Νευροβλαστώματος, θέλαμε να διερευνήσουμε με παρόμοιο τρόπο την δράση του NR5A2 σε μια μορφή καρκίνου που πλήττει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και χαρακτηρίζεται από επιθετικότητα, το Γλιοβλάστωμα. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για αυτά τα πειράματα, είναι τα GL261, κύτταρα Γλιοβλαστώματος προερχόμενα από ποντικό. Ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία με αυτή των HEK 293A. Εδώ τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο θεαματικά όσο στις προηγούμενες κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, οι μετρήσεις έδειξαν ότι το ποσοστό πρόσληψης του BrdU από τα θετικά για την πρωτεΐνη YFP-LRH1 κύτταρα ήταν περίπου 17,6% ενώ, το αντίστοιχο ποσοστό των θετικών για την GFP κυττάρων αλλά και των κυττάρων που δεν μολύνθηκαν ήταν κατά μέσο όρο 39% περίπου. Παρόμοιες μετρήσεις έγιναν και για την PH3. Τα θετικά για την YFP-LRH1 κύτταρα ήταν επίσης θετικά για την PH3 σε ποσοστό 7,5% ενώ στις υπόλοιπες ομάδες θετικό σε ποσοστό 14,5%.

Συμπερασματικά έχουμε:

- I. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 σε αυτήν την κυτταρική σειρά δεν έφερε τα ίδια θεαματικά αποτελέσματα με αυτά των προηγούμενων πειραμάτων στις άλλες σειρές. Παρ' όλα αυτά βλέπουμε πως μειώνει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων GL261 όπως προκύπτει από τις μετρήσεις πρόσληψης BrdU που δείχνουν περίπου δύο φορές μικρότερη πρόσληψη του από τα θετικά για YFP-LRH1 κύτταρα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα
- II. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 μειώνει τα κύτταρα GL261 που εισέρχονται στην φάση M, αφού όπως διαπιστώθηκε από τις μετρήσεις τα κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν NR5A2 είχαν περίπου δύο φορές μικρότερο ποσοστό κυττάρων στην M φάση όπως προέκυψε από τις μετρήσεις για τα θετικά για PH3 κύτταρα.



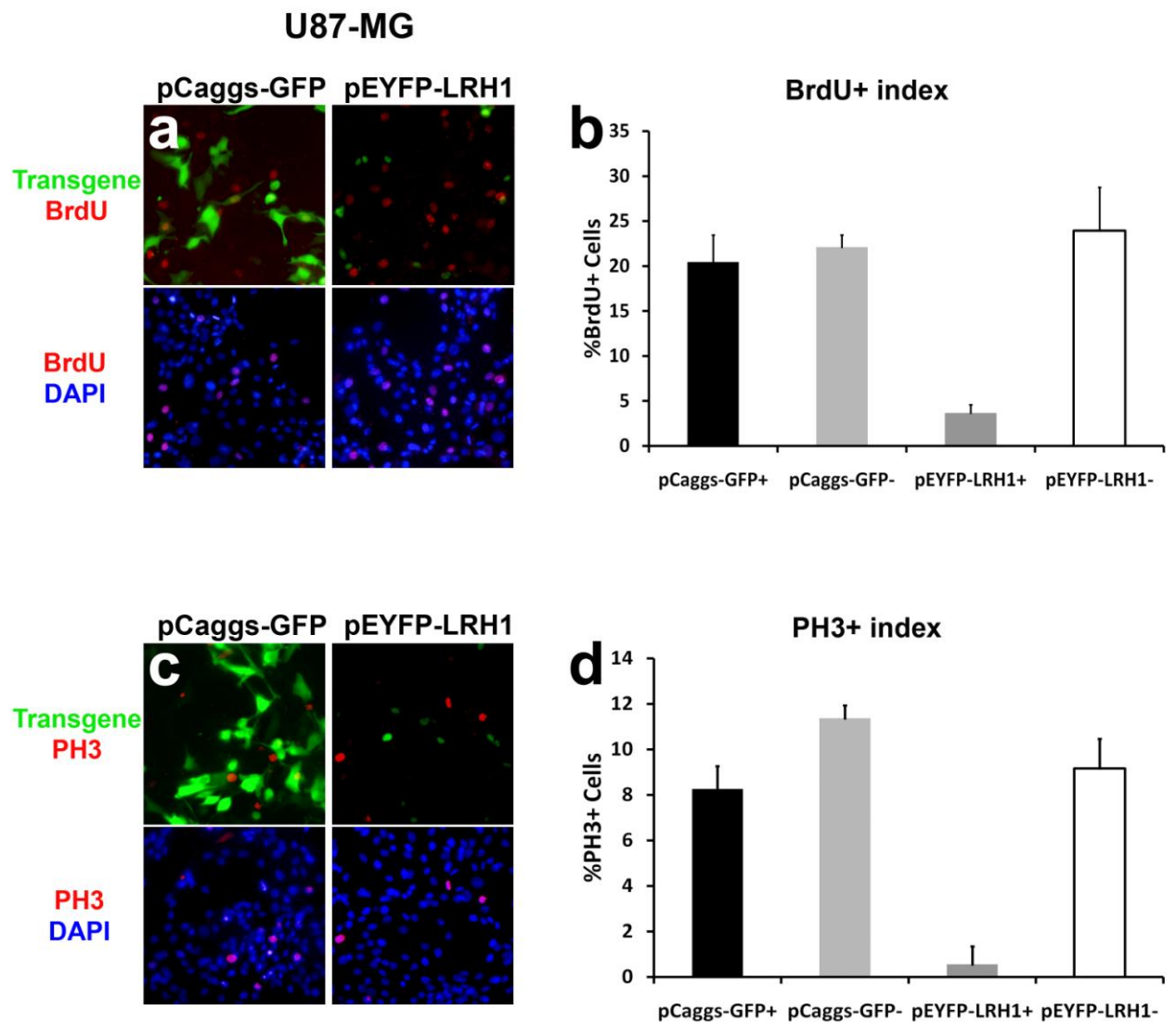
Εικόνα 10 Η πρωτεΐνη YFP-LRH1 εντοπίζεται αποκλειστικά όπως παρατηρούμε τα κύτταρα που φθορίζουν στο πράσινο στις παραπάνω σε αντίθεση με την GFP που εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο. Με κόκκινο χρώμα εντοπίζονται τόσο το BrdU όσο και η PH3. Στο κυανό χρώμα εκπέμπουν οι πυρήνες των κυττάρων που έχουν επωαστεί με την φθορίζουσα χρωστική DAPI.

Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων U87-MG

Η επόμενη σειρά στην οποία υπερεκφράσαμε τον NR5A2, είναι αυτή των κυττάρων U87-MG. Πρόκειται για κύτταρα πρωτογενούς γλιοβλαστώματος τα οποία απομονώθηκαν από τον εγκέφαλο 44χρονου ασθενή. Ακολούθησε την ίδια διαδικασία με αυτή των HEK 293A. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι το ποσοστό πρόσληψης του BrdU από τα θετικά για την πρωτεΐνη YFP-LRH1 κύτταρα ήταν περίπου 3,6% ενώ, το αντίστοιχο ποσοστό των θετικών για την GFP κυττάρων αλλά και των κυττάρων που δεν μολύνθηκαν ήταν 22% περίπου. Παρόμοιες μετρήσεις έγιναν και για την PH3. Τα θετικά για την YFP-LRH1 κύτταρα ήταν επίσης θετικά για την PH3 σε ποσοστό 0.56% ενώ στις υπόλοιπες ομάδες θετικό σε ποσοστό 9%.

Συμπερασματικά έχουμε:

- I. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων SH-SY5Y στην S φάση όπως προκύπτει από τις μετρήσεις πρόσληψης BrdU που δείχνουν περίπου έξι φορές μικρότερη πρόσληψη του από τα θετικά για YFP-LRH1 κύτταρα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα
- II. Η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 εμποδίζει τα κύτταρα SH-SY5Y να εισέλθουν στην φάση της Μίτωσης (M φάση), αφού όπως διαπιστώθηκε από τις μετρήσεις τα κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν NR5A2 είχαν περίπου δεκαέξι φορές μικρότερο ποσοστό κυττάρων στην M φάση όπως προέκυψε από τις μετρήσεις για τα θετικά για PH3 κύτταρα.



Εικόνα 11 Και σε αυτήν την κυτταρική σειρά πρωτεΐνη YFP-LRH1 εντοπίζεται αποκλειστικά όπως παρατηρούμε τα κύτταρα που φθορίζουν στο πράσινο στις παραπάνω σε αντίθεση με την GFP. Ακόμα γίνεται αντιληπτό πως δεν εντοπίζονται θετικά κύτταρα για την YFP-LRH1 και το BrdU ταυτόχρονα. Το ίδιο συμβαίνει και με το δείκτη του PH3.

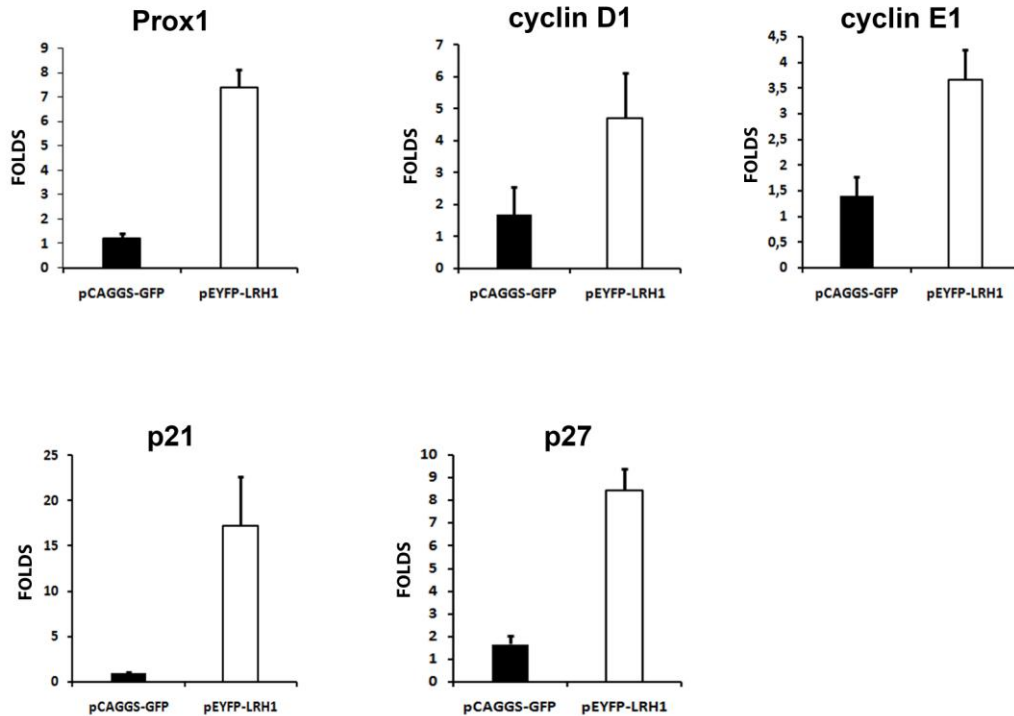
Η υπερέκφραση NR5A2 επάγει αναστολείς του πολλαπλασιασμού

Η υπερέκφραση του NR5A2 οδήγησε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων Neuro2A, SH-SY5Y και U87-MG όπως κατέδειξε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού. Επόμενο ήταν λοιπόν να εμβαθύνουμε την ανάλυση. Για τον σκοπό αυτό διαμολύναμε με τα ίδια πλασμίδια (pEYFP-LRH1 και pCAGGS-GFP) που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειράματα του ανοσοφθορισμού. Το επόμενο βήμα ήταν η Real Time PCR ή qPCR, για να ελέγξουμε κάποιους μάρτυρες πολλαπλασιασμού.

Κύτταρα Neuro2A

Τα κύτταρα αφέθηκαν 48 ώρες μετά την διαμόλυνση (μέθοδος CaCl₂) να αναπτυχθούν. Ακολούθησε η απομόνωση RNA και η σύνθεση του cDNA. Τα γονίδια που ελέγξαμε ήταν οι κυκλίνες cyclin D1 και E1 που αφορούν την μετάβαση του κυττάρου από την G1 στην S φάση, της p21 ενός αναστολέα του κυτταρικού κύκλου που ρυθμίζει την μετάβαση από την G1 στην S φάση και της p27-kip1 που έχει παρόμοιο ρόλο στην μετάβαση στην πρόοδο της G1 φάσης.

Neuro2A



Εικόνα 12 Σύγκριση των επιπέδων mRNA διαφόρων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου κατά την υπερέκφραση του NR5A2 στα Neuro2A

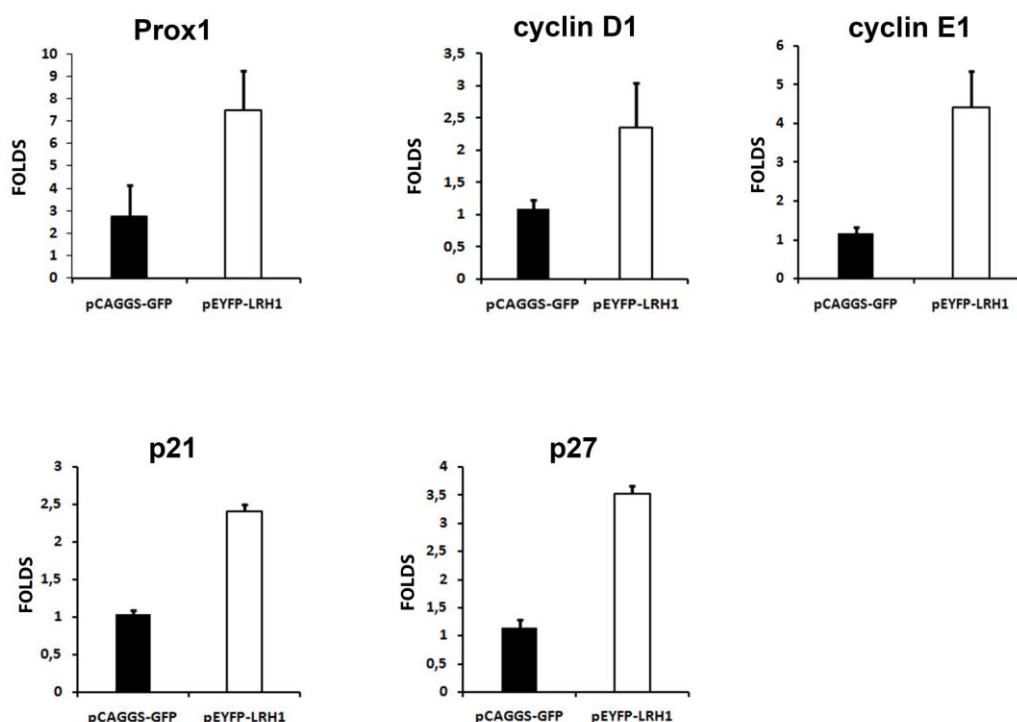
Τα πειράματα κατέδειξαν αύξηση των επιπέδων του mRNA της cyclin D1 και E1 ενώ παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων στο mRNA του p21 και του p27-kipl. Σημαντική επίσης είναι και η αύξηση του mRNA του γονιδίου Prox1 Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο NR5A2 αυξάνει είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο τα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων με αποτέλεσμα την μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων Neuro2A.

Κύτταρα SH-SY5Y

Τα κύτταρα αφέθηκαν 48 ώρες μετά την διαμόλυνση (μέθοδος CaCl₂) να αναπτυχθούν. Ακολούθησε η απομόνωση RNA και η σύνθεση του cDNA. Τα

γονίδια που ελέγξαμε ήταν οι κυκλίνες cyclin D1 και E1 που αφορούν την μετάβαση του κυττάρου από την G1 στην S φάση, της p21 ενός αναστολέα του κυτταρικού κύκλου που ρυθμίζει την μετάβαση από την G1 στην S φάση και της p27-kip1 που έχει παρόμοιο ρόλο στην μετάβαση στην πρόοδο της G1 φάσης.

SH-SY5Y



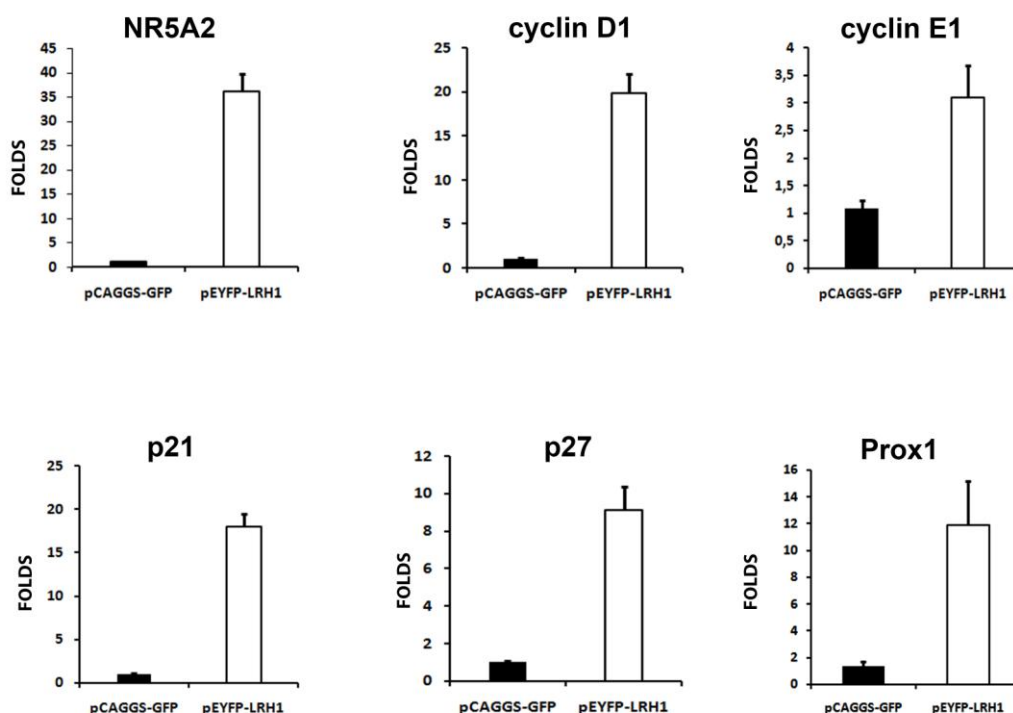
Εικόνα 13 Σύγκριση των επιπέδων mRNA διαφόρων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου κατά την υπερέκφραση του NR5A2 στα SH-SY5Y

Κύτταρα U87-MG

Τα κύτταρα αφέθηκαν 48 ώρες μετά την διαμόλυνση (μέθοδος Lipofectamine) να αναπτυχθούν. Ακολούθησε η απομόνωση RNA και η σύνθεση του cDNA. Τα γονίδια που ελέγξαμε ήταν για αρχή ο NR5A2 ώστε να επιβεβαιωθεί η υπερέκφρασή του και στην συνέχεια παρατηρήσαμε την έκφραση των κυκλινών cyclin D1 και E1 που αφορούν την μετάβαση του κυττάρου από την G1 στην S φάση, της p21 ενός

αναστολέα του κυτταρικού κύκλου που ρυθμίζει την μετάβαση από την G1 στην S φάση και της p27-kip1 που έχει παρόμοιο ρόλο στην μετάβαση στην πρόοδο της G1 φάσης.

U87-MG



Εικόνα 14 Σύγκριση των επιπέδων mRNA διαφόρων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου κατά την υπερέκφραση του NR5A2 στα U87-MG

Τα πειράματα επιβεβαίωσαν την υπερκέκφραση του mRNA του NR5A2. Υπήρξε αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων του mRNA της cyclin D1 και E1 ενώ παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων στο mRNA του p21 και του p27-kip1. Σημαντική επίσης είναι και η αύξηση του mRNA του γονιδίου Prox1 Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο NR5A2 αυξάνει είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο τα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων με αποτέλεσμα την μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων U87-MG.

Χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 στα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα και σε διάφορες κυτταρικές σειρές

Στα προηγούμενα πειράματα, είδαμε πως ο NR5A2/LRH1 αποτελεί έναν ανασταλτικό παράγοντα της πολλαπλασιαστικής ικανότητας διαφόρων καρκινικών σειρών που πλήττουν το Νευρικό Σύστημα. Το επόμενο βήμα στην πειραματική διαδικασία είναι χρήση ουσιών που σύμφωνα με την βιβλιογραφία ενισχύουν την δράση του NR5A2 δρώντας ως αγωνιστές του. Στα παρακάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δύο τέτοιες ουσίες, ο DLPC (dilauroyl-phosphatidylcholine) (AVANTI) και ο DUPC (diundecanoyl-phosphatidylcholine) (AVANTI).

Χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 στα Νευρικά βλαστικά κύτταρα

Τα πρώτα κύτταρα στα οποία δοκιμάσαμε τους αγωνιστές είναι τα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα στα οποία πρωτοπαρατηρήθηκε από το εργαστήριό μας η ανασταλτική στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ικανότητα του NR5A2/LRH1.

Μελέτη των δεικτών BrdU και PH3

Μια μέρα πριν την προσθήκη των αγωνιστών στα κύτταρα, τα καλλιεργήσαμε σε 24-well πιάτο με θρεπτικό που περιείχε αυξητικούς παράγοντες, ενώ σε κάθε φρεάτιο το πιάτου είχε προηγηθεί προσθήκη καλυπτρίδας η οποία είχε επωαστεί με πολύ-L-λυσίνη. Την επόμενη μέρα προσθέτουμε τους αγωνιστές τους οποίους τους διατηρούμε σε διάλυμα 100% αιθανόλης σε συγκέντρωση 10mM. Για τις ανάγκες του πειράματος χωρίσαμε τα κύτταρα σε πέντε πειραματικές ομάδες. Στην πρώτη ομάδα είχαμε κύτταρα τα οποία περιείχαν 50μM DLPC στο θρεπτικό τους, στην δεύτερη, τα κύτταρα που περιείχαν 100μM DLPC. Την τρίτη ομάδα αποτελούσαν τα κύτταρα, το

θρεπτικό των οποίων περιείχε 50μM DUPC, ενώ στην τέταρτη η συγκέντρωση του DUPC ήταν 100μM. Η τελευταία ομάδα απαρτιζόταν από τα κύτταρα στα οποία είχε προστεθεί μόνο ο διαλύτης των δύο αγωνιστών, δηλαδή 100% αιθανόλη με συγκέντρωση 1%. Αφήσαμε τα κύτταρα να αναπτυχθούν 48 ώρες μετά την προσθήκη των αγωνιστών. Δυο ώρες πριν την μονιμοποίηση (fixation) των κυττάρων προσθέσαμε σε κάθε φρεάτιο που αναπτύσσονταν την ουσία BrdU (Bromo-deoxy-Uridine), που αποτελεί υποκατάστατο της θυμίνης, μιας εκ των τεσσάρων βάσεων του DNA.

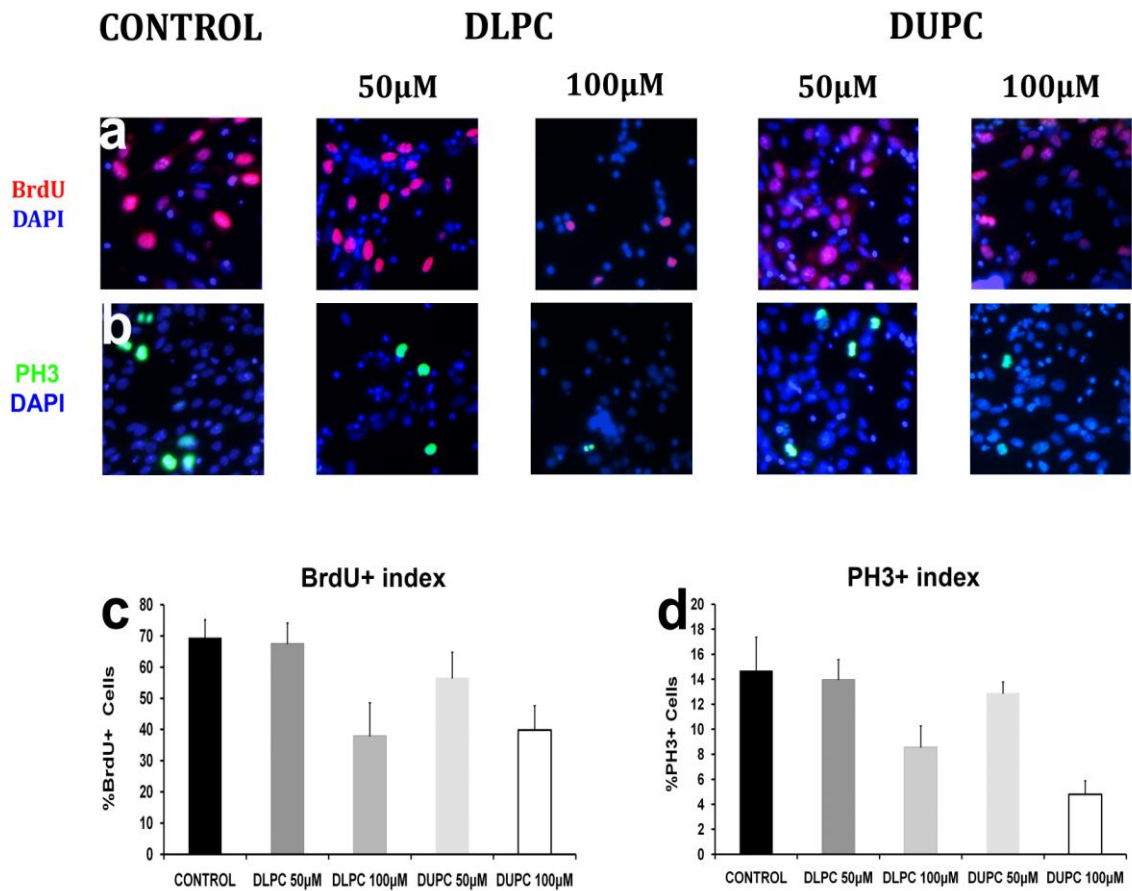
Μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων, ακολούθησαν μέθοδοι ανοσοκυτταροφθορισμού με σκοπό να εντοπιστούν το BrdU και η PH3 και στις πέντε ομάδες δειγμάτων. Τα στερεωμένα κύτταρα, πριν την μονιμοποίηση τους, επωάστηκαν με DAPI. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα μετρήσεων για BrdU και PH3 ύστερα από την χρήση αγωνιστών στα νευρικά βλαστικά κύτταρα

cell group	% BrdU index	%PH3 index
Control	69,4	14,7
DLPC 50μM	67,6	14
DLPC 100μM	38	8,6
DUPC 50μM	56,6	12,9
DUPC 100μM	39,8	4,8

Το πείραμα αυτό έδειξε πως και οι δύο αγωνιστές του NR5A2/LRH1 μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των Νευρικών Βλαστικών κυττάρων καθώς παρατηρήθηκε μείωση των δεικτών BrdU και PH3 στην συγκέντρωση των 100μM. Αργότερα δοκιμάστηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση, η οποία όμως αποδείχθηκε τοξική για τα κύτταρα

NSCs (+GFs)



Εικόνα 15: Η προσθήκη των αγωνιστών στα Νευρικά Βλαστικά κύτταρα σε συγκέντρωση 100μM μειώνουν τον πολλαπλασιασμό τους. Με κόκκινο χρώμα εντοπίζεται το BrdU ενώ, το PH3 με πράσινο. Στο κυανό χρώμα εκπέμπουν οι πυρήνες των κυττάρων που έχουν επωαστεί με την φθορίζουσα χρωστική DAPI.

Μελέτη των δεικτών Nestin και procaspase 3

Βλέποντας την μείωση του πολλαπλασιασμού με τους δείκτες BrdU και PH3 θέλαμε να ελέγξουμε έναν ακόμα δείκτη πολλαπλασιασμού. Αυτός είναι η Nestin, ένα ενδιάμεσο ινίδιο αποτελεί η έκφραση της οποίας χαρακτηρίζει τα πολλαπλασιαζόμενα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα και αποτελεί έναν αξιόλογο δείκτη πολλαπλασιασμού. Κάτι άλλο που παρατηρήσαμε χρησιμοποιώντας τους αγωνιστές,

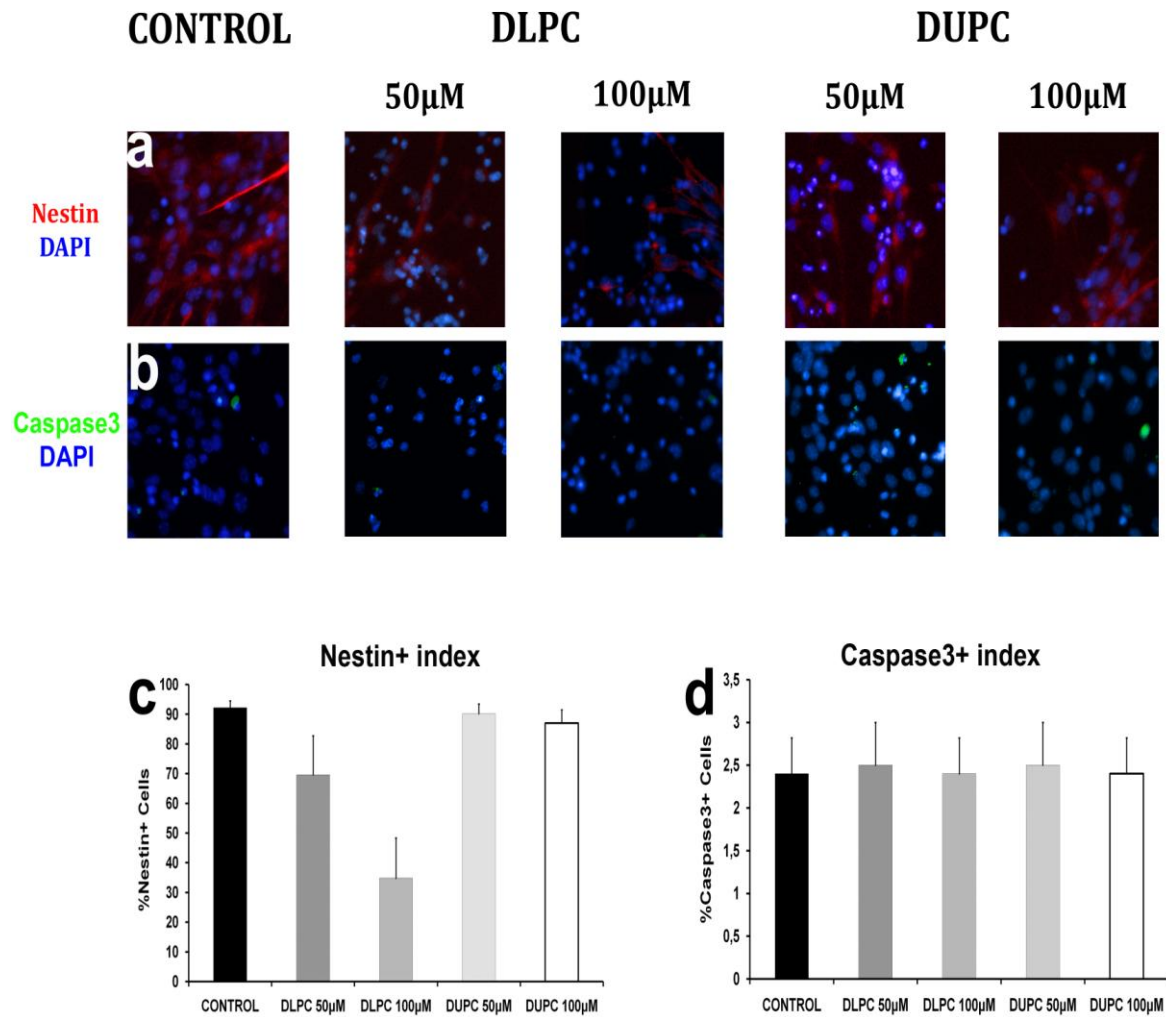
είναι πως σε μεγάλη συγκέντρωση βλέπαμε μειωμένο συνολικό αριθμό κυττάρων. Έτσι αποφασίσαμε να ελέγξουμε μέσω της ανοσοανίχνευσης της pro-caspase 3 αν τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση. Ακολουθήσαμε όμοια διαδικασία με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση BrdU και PH3. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5 Αποτελέσματα μετρήσεων για Nestin και pro-caspase3 ύστερα από την χρήση αγωνιστών στα νευρικά βλαστικά κύτταρα

cell group	% Nestin index	% Pro Caspase 3 index
Control	92,2	2,4
DLPC 50μM	69,6	2,5
DLPC 100μM	34,8	2,6
DUPC 50μM	90,2	2,5
DUPC 100μM	87	2,7

Το πείραμα αυτό έδειξε πως ο αγωνιστής DLPC του NR5A2/LRH1 μειώνει τον πολλαπλασιασμό των Νευρικών Βλαστικών κυττάρων αφού μειώθηκαν τα θετικά για Nestin κύτταρα με την προσθήκη αγωνιστή. Ακόμη οι αγωνιστές δεν προκαλούν απόπτωση αφού το ποσοστό των θετικών για pro-caspase3 κυττάρων έμεινε σταθερό και στις πέντε ομάδες δειγμάτων.

NSCs (+GFs)



Εικόνα 16 Η προσθήκη του αγωνιστή DLPC στα Νευρικά Βλαστικά κύτταρα σε συγκέντρωση 100μΜ μειώνει τον πολλαπλασιασμό τους. Επίσης κανείς από τους δύο δεν επάγει την απόπτωση. Με κόκκινο χρώμα εντοπίζεται η Nestin και με πράσινο η pro-caspase3. Στο κυανό χρώμα εκπέμπουν οι πυρήνες των κυττάρων που έχουν επωαστεί με την φθορίζουσα χρωστική DAPI.

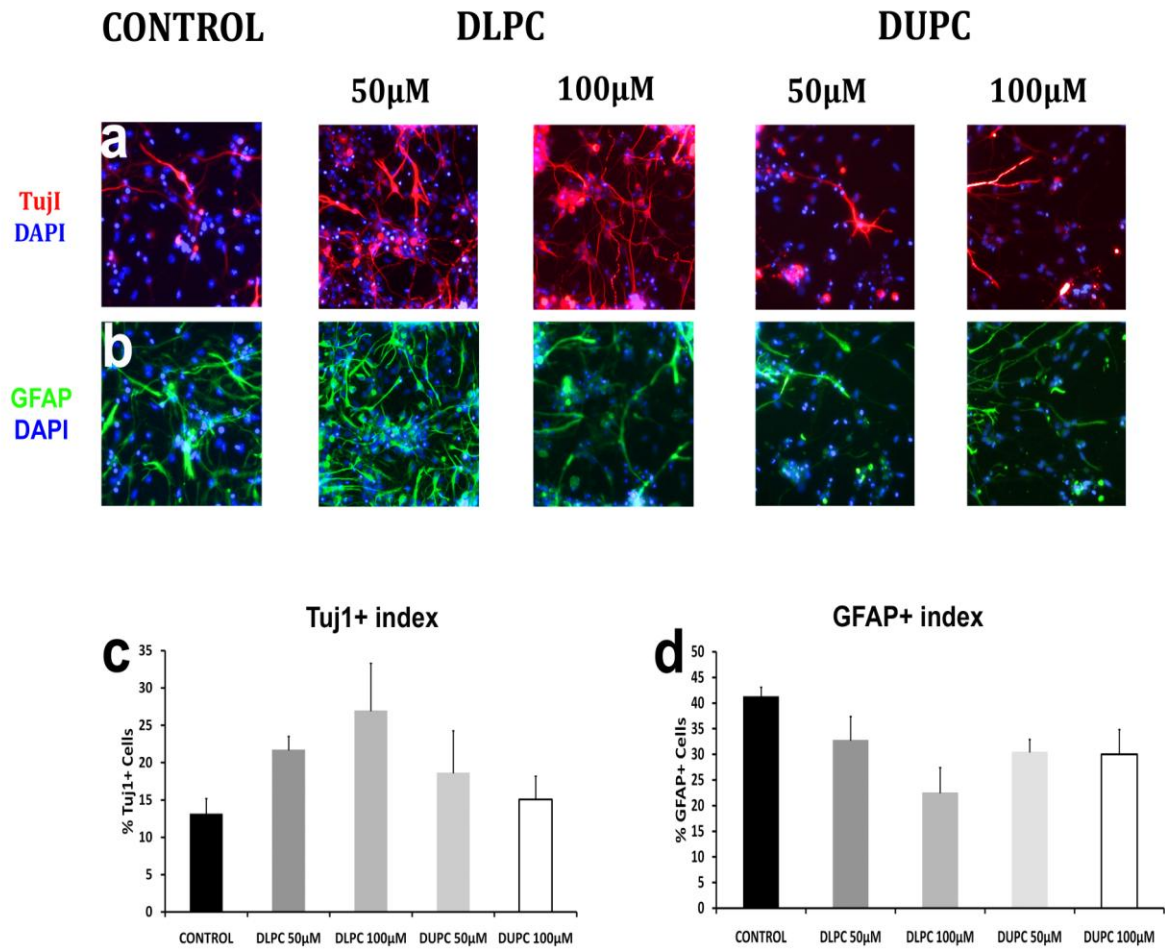
Μελέτη των δεικτών Tuj1 και GFAP

Δεδομένα του εργαστηρίου μας έχουν ήδη δείξει πως η υπερέκφραση του NR5A2/LRH1 στα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα, τα οδηγεί στη διαφοροποίηση και συγκεκριμένα στην διαφοροποίηση προς νευρώνες. Αναλόγως, θέλαμε να ελέγξουμε το κατά πόσον οι αγωνιστές του πυρηνικού αυτού υποδοχέα, είχαν την δυνατότητα επαγωγής της νευρωνικής διαφοροποίησης των Νευρικών Βλαστικών κυττάρων. Για αυτό το πείραμα έγινε χρήση αντισωμάτων για δύο συγκεκριμένους δείκτες διαφοροποίησης. Ο ένας είναι ο Tuj1 ($\beta 3$ Tubulin), μια πρωτεΐνη η οποία είναι άφθονη στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα. Ο άλλος δείκτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GFAP, πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων η οποία χαρακτηρίζει τα αστροκύτταρα. Μια μέρα πριν την προσθήκη των αγωνιστών στα κύτταρα, τα καλλιεργήσαμε σε 24-well πιάτο με θρεπτικό που στερούνταν αυξητικών παραγόντων, ενώ σε κάθε φρεάτιο το πιάτου είχε προηγηθεί προσθήκη καλυπτρίδας η οποία είχε επωαστεί με πολύ-L-λυσίνη. Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτήν της ανίχνευσης Nestin και pro-caspase 3. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα μετρήσεων για Tuj I και GFAP ύστερα από την χρήση ναγωνιστών στα νευρικά βλαστικά κύτταρα

cell group	% Tuj1 index	% GFAP index
Control	13	41,3
DLPC 50μM	21,75	32,8
DLPC 100μM	27	22,58
DUPC 50μM	18,6	30,5
DUPC 100μM	15	30

NSCs (-GFs)



Εικόνα 17 Η προσθήκη αγωνιστών και ιδιαίτερα του DLPC οδηγούν τα Νευρικά Βλαστικά κύτταρα προς την νευρωνική διαφοροποίηση. Με κόκκινο χρώμα εντοπίζεται το Tuji1 και με πράσινο το GFAP. Στο κυανό χρώμα εκπέμπουν οι πυρήνες των κυττάρων που έχουν επωαστεί με την φθορίζουσα χρωστική DAPI.

Το πείραμα αυτό έδειξε πως οι αγωνιστές NR5A2/LRH1 οδηγούν τα νευρικά βλαστικά κύτταρα προς την νευρωνική διαφοροποίηση αφού μειώνουν τα θετικά για GFAP κύτταρα και αυξάνουν τα αντίστοιχα για Tuji1.

Χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 σε κυτταρικές σειρές καρκίνων του Νευρικού συστήματος

Έχοντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα από την υπερέκφραση του NR5A2 στις καρκινικές σειρές και από την χρήση αγωνιστών του NR5A2 στα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα

Οι αγωνιστές του NR5A2/LRH1 δεν μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των Neuro2a κυττάρων

Η πρώτη σειρά στην οποία δοκιμάσαμε αγωνιστές ήταν αυτή των κυττάρων Neuro2a. Μια μέρα πριν την προσθήκη των αγωνιστών στα κύτταρα, τα καλλιεργήσαμε σε 24-well πιάτο, ενώ σε κάθε φρεάτιο το πιάτου είχε προηγηθεί προσθήκη καλυπτρίδας η οποία είχε επωαστεί με πολύ-L-λυσίνη. Την επόμενη μέρα προσθέτουμε τους αγωνιστές τους οποίους τους διατηρούμε σε διάλυμα 100% αιθανόλης σε συγκέντρωση 10mM. Για τις ανάγκες του πειράματος χωρίσαμε τα κύτταρα σε πέντε πειραματικές ομάδες. Στην πρώτη ομάδα είχαμε κύτταρα τα οποία περιείχαν 100μM DLPC στο θρεπτικό τους, στην δεύτερη, τα κύτταρα που περιείχαν 200μM DLPC. Την τρίτη ομάδα αποτελούσαν τα κύτταρα, το θρεπτικό των οποίων περιείχε 100μM DUPC, ενώ στην τέταρτη η συγκέντρωση του DUPC ήταν 200μM. Η τελευταία ομάδα απαρτιζόταν από τα κύτταρα στα οποία είχε προστεθεί μόνο ο διαλύτης των δύο αγωνιστών, δηλαδή 100% αιθανόλη με συγκέντρωση 2%. Αφήσαμε τα κύτταρα να αναπτυχθούν 48 ώρες μετά την προσθήκη των αγωνιστών. Δυο ώρες πριν την μονιμοποίηση (fixation) των κυττάρων προσθέσαμε σε κάθε φρεάτιο που αναπτύσσονταν την ουσία BrdU.

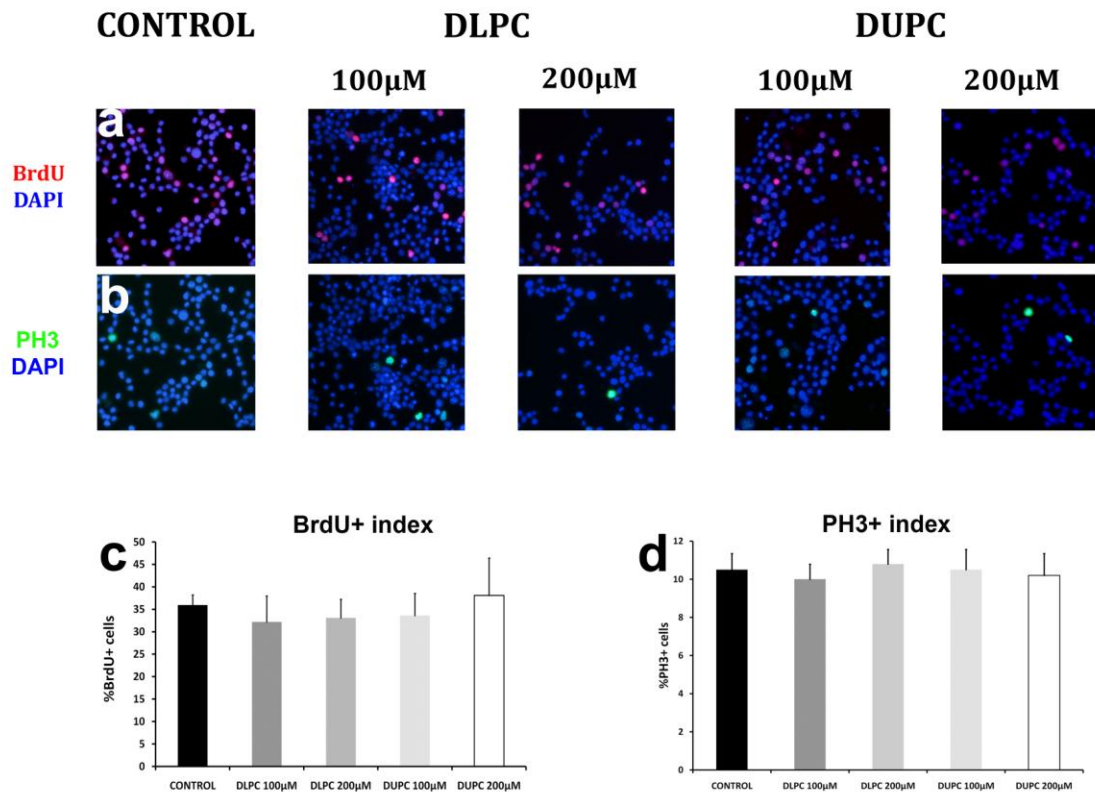
Μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων, ακολούθησαν μέθοδοι ανοσοκυτταροφθορισμού με σκοπό να εντοπιστούν το BrdU και η PH3 και στις πέντε ομάδες δειγμάτων. Τα μονιμοποιημένα κύτταρα, πριν την μονιμοποίηση τους, επωάστηκαν με DAPI. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μετρήσεων για BrdU και PH3 ύστερα από την χρήση αγωνιστών στα Neuro2a κύτταρα

cell group	% BrdU index	%PH3 index
Control	35,9	10,5
DLPC 100μM	32,2	10
DLPC 200μM	33,1	10,8
DUPC 100μM	33,6	10,5
DUPC 200μM	38,1	10,2

Το πείραμα αυτό έδειξε πως κανένας από τους δύο αγωνιστές του NR5A2/LRH1 δεν ήταν ικανός να μειώσει τον πολλαπλασιασμό των Neuro2a. Σε καμία από τις δύο υπό δοκιμή συγκεντρώσεις του κάθε αγωνιστή δεν παρατηρήθηκε μείωση των θετικών για BrdU ή PH3 κυττάρων. Αργότερα δοκιμάστηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση, η οποία όμως αποδείχθηκε τοξική για τα κύτταρα

Neuro2a



Εικόνα 18 Η προσθήκη των αγωνιστών στα Neuro2a κύτταρα δεν μειώνει τον πολλαπλασιασμό τους. Με κόκκινο χρώμα εντοπίζεται το BrdU ενώ, το PH3 με πράσινο. Στο κυανό χρώμα εκπέμπουν οι πυρήνες των κυττάρων, που έχουν επωαστεί με την φθορίζουσα χρωστική DAPI.

Η χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 δεν μειώνει τον πολλαπλασιασμό των SH-SY5Y κυττάρων

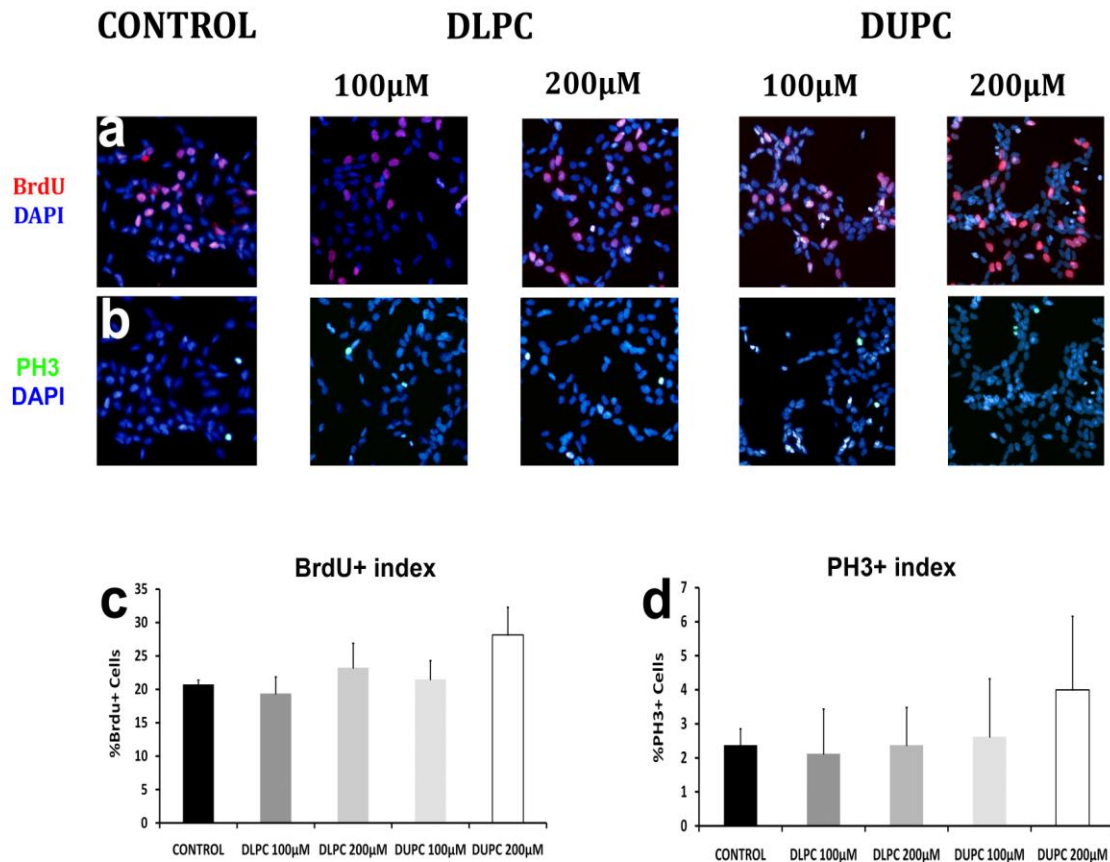
Η επόμενη κυτταρική η οποία θα επωαζόταν με αγωνιστές για τον NR5A2 είναι τα SH-SY5Y. Ακολουθήσαμε όμοια διαδικασία με αυτήν που εφαρμόστηκε στα Neuro2A. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8 Αποτελέσματα μετρήσεων για BrdU και PH3 ύστερα από την χρήση αγωνιστών στα SH-SY5Y κύτταρα

cell group	% BrdU index	%PH3 index
Control	20,75	2,4
DLPC 100μM	19,4	2,1
DLPC 200μM	23,25	2,4
DUPC 100μM	21,5	2,6
DUPC 200μM	28,1	4

Το πείραμα αυτό έδειξε πως κανένας από τους δύο αγωνιστές του NR5A2/LRH1 δεν ήταν ικανός να μειώσει τον πολλαπλασιασμό των SH-SY5Y. Αντιθέτως στην συγκέντρωση των 200μM του αγωνιστή DUPC παρατηρείται σχετική αύξηση των θετικών για BrdU και PH3 κυττάρων.

SH-SY5Y



Εικόνα 19 Η προσθήκη των αγωνιστών στα SH-SY5Y κύτταρα δεν μειώνει τον πολλαπλασιασμό τους. Με κόκκινο χρώμα εντοπίζεται το BrdU ενώ, το PH3 με πράσινο. Στο κυανό χρώμα εκπέμπουν οι πυρήνες των κυττάρων, που έχουν επωαστεί με την φθορίζουσα χρωστική DAPI.

Η χρήση αγωνιστών του NR5A2/LRH1 δεν μειώνει τον πολλαπλασιασμό των GL261 κυττάρων

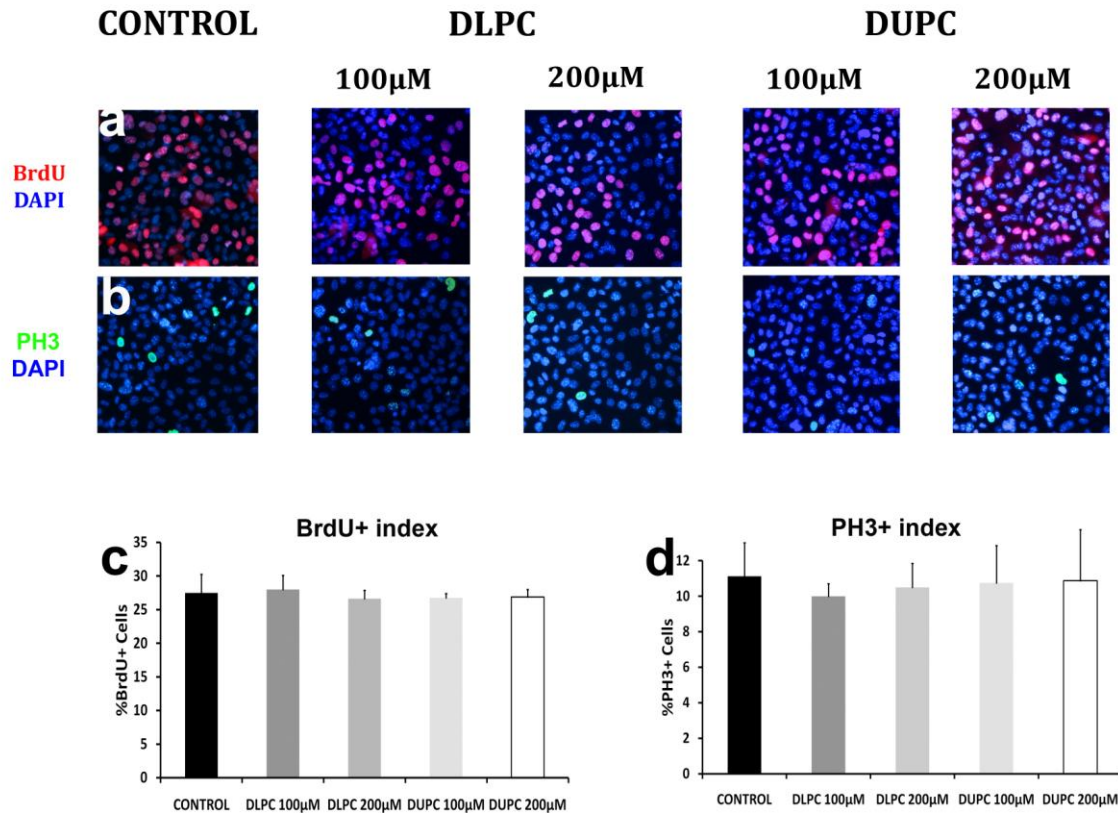
Για τα GL261 ακολουθήσαμε όμοια διαδικασία με αυτήν που εφαρμόστηκε στα Neuro2A. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9 Αποτελέσματα μετρήσεων για BrdU και PH3 ύστερα από την χρήση αγωνιστών στα GL261

cell group	% BrdU index	%PH3 index
Control	27,5	11,1
DLPC 100μM	28	10
DLPC 200μM	26,6	10,5
DUPC 100μM	26,7	10,7
DUPC 200μM	26,8	10,8

Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος έδειξαν πως κανένας από τους δύο αγωνιστές του NR5A2/LRH1 δεν ήταν ικανός να μειώσει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των GL261. Σε καμία από τις δύο υπό δοκιμή συγκεντρώσεις του κάθε αγωνιστή δεν παρατηρήθηκε μείωση των θετικών για BrdU ή PH3 κυττάρων.

GL261



Εικόνα 20 Η προσθήκη των αγωνιστών στα GL261 κύτταρα δεν μειώνει τον πολλαπλασιασμό τους. Με κόκκινο χρώμα εντοπίζεται το BrdU ενώ, το PH3 με πράσινο. Στο κυανό χρώμα εκπέμπουν οι πυρήνες των κυττάρων, που έχουν επωαστεί με την φθορίζουσα χρωστική DAPI.

Οι αγωνιστές του NR5A2/LRH1 μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των U87-MG κυττάρων

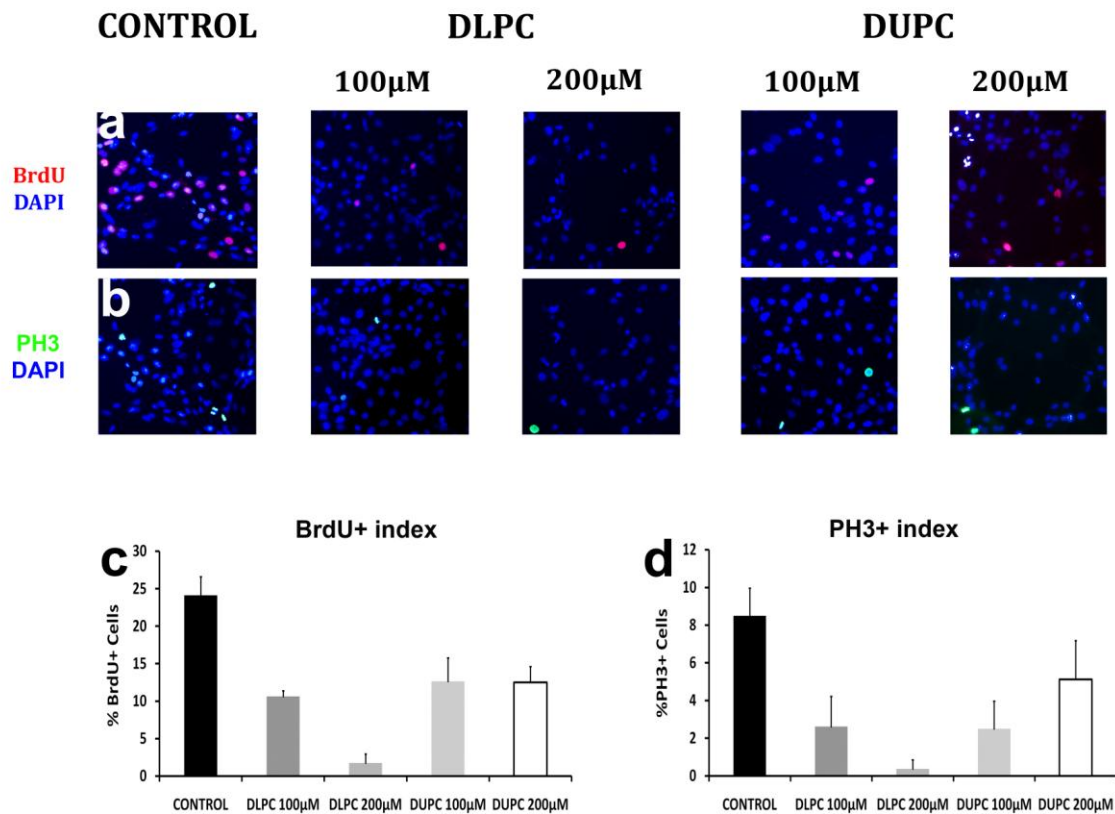
Η τελευταία σειρά στην οποία προσθέσαμε αγωνιστές για τον NR5A2 είναι τα κύτταρα U87-MG. Ακολουθήσαμε όμοια διαδικασία με αυτήν που εφαρμόστηκε στα Neuro2A. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 10 Αποτελέσματα μετρήσεων για BrdU και PH3 ύστερα από την χρήση αγωνιστών στα U87-MG

cell group	% BrdU index	%PH3 index
Control	24,1	8,5
DLPC 100μM	10,6	2,6
DLPC 200μM	2	0,4
DUPC 100μM	13	2,5
DUPC 200μM	12,5	5,1

Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος έδειξαν και οι δύο αγωνιστές του NR5A2/LRH1 είναι ικανοί να μειώσουν τον πολλαπλασιασμό των U87-MG. Ειδικά ο DLPC στην συγκέντρωση των 200μM μειώνει περίπου δώδεκα φορές το ποσοστό των θετικών για BrdU, κυττάρων και περίπου είκοσι φορές το αντίστοιχο ποσοστό για το PH3.

U87-MG



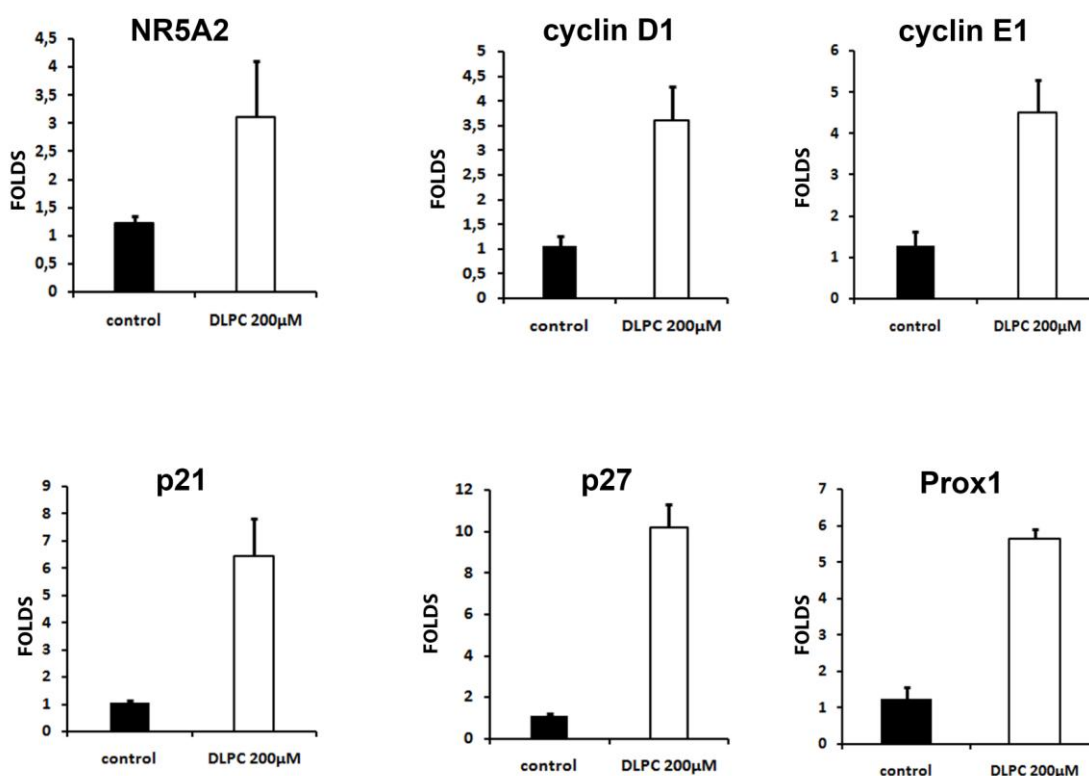
Εικόνα 21 Η προσθήκη των αγωνιστών στα κύτταρα U87-MG, μειώνει τον πολλαπλασιασμό τους. Με κόκκινο χρώμα εντοπίζεται το BrdU ενώ, το PH3 με πράσινο. Στο κυανό χρώμα εκπέμπουν οι πυρήνες των κυττάρων, που έχουν επωαστεί με την φθορίζουσα χρωστική DAPI.

Η χρήση του αγωνιστή του NR5A2, DLPC, επάγει αναστολείς του πολλαπλασιασμού στα U87-MG

Από τις μελέτες ανοσοφθορισμού διαπιστώσαμε μια σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των U87-MG μετά την καλλιέργειά τους με τον αγωνιστή DLPC ειδικά στην συγκέντρωση των 200μM. Βασιζόμενοι στα δεδομένα της qPCR στην υπερέκφραση του NR5A2 στα εν λόγω κύτταρα, αποφασίσαμε να ελέγξουμε τα ίδια γονίδια ύστερα από την χρήση αγωνιστή.

Κύτταρα U87-MG καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό τους και χωρίστηκαν σε δύο πειραματικές ομάδες. Στην μία ομάδα είναι τα κύτταρα στο θρεπτικό τω οποίων ήταν παρών ο αγωνιστής DLPC σε συγκέντρωση 200μM, ενώ στην δεύτερη τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία μόνο του διαλύτη του DLPC. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν 48 ώρες μετά την προσθήκη αγωνιστή. Ακολούθησε απομόνωση RNA από και σύνθεση του cDNA. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για qPCR τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα.

U87-MG



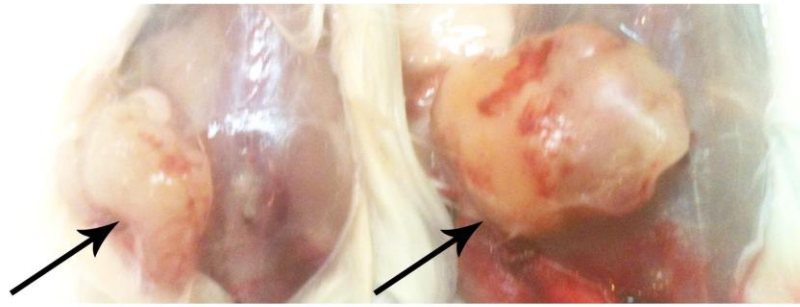
Εικόνα 22 Σύγκριση των επιπέδων mRNA διαφόρων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου ύστερα από την χρήση του αγωνιστή DLPC στα U87-MG

Τα αποτελέσματα της qPCR δείχνουν επαγωγή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *p21* και *p27-kip1* αλλά και του *Prox1*. Βέβαια και πάλι παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων mRNA των *cyclin D1* και *cyclin E1*.

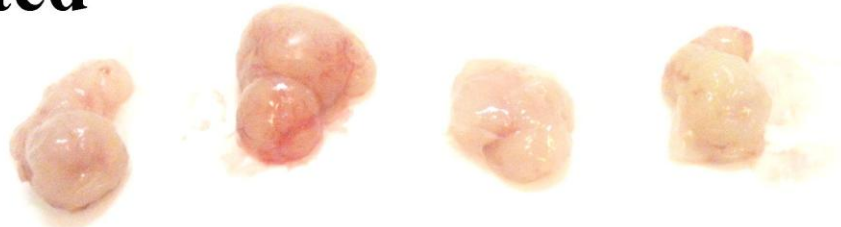
Χενοgrafts σε NOD/SCID ποντίκια των U87-MG ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η υπερέκφραση του NR5A2 όσο και η χρήση αγωνιστών του, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των U87-MG κυττάρων. Για το λόγο αυτό διεξάγαμε *in vivo* πειράματα ενιόντας τα U87-MG σε NOD/SCID στελέχη ποντικών. Σε κάθε ποντίκι ενέθηκαν τέσσερα εκατομμύρια κύτταρα. Τα ποντίκια αφέθηκαν να αναπτύξουν όγκους για 14 ημέρες. Μετά το πέρας αυτών των ημερών, δέκα από τα ποντίκια στα οποία έγιναν τα xenografts χωρίστηκαν σε δύο ομάδες των πέντε. Η πρώτη ομάδα λάμβανε ημερησίως δια στόματος, 4mg DLPC διαλυμένο σε 30% propylene-glycol (SIGMA). Στην δεύτερη ομάδα χορηγούνταν επίσης δια στόματος, μόνο το όχημα για το DLPC, δηλαδή 30% propylene-glycol. Η χορήγηση του αγωνιστή του NR5A2 διήρκησε 13 ημέρες. Στην περίοδο χορήγησης του αγωνιστή λαμβάνονταν μετρήσεις του μεγέθους του όγκου ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Συνολικά έγιναν 4 μετρήσεις. Αυτό που μετρούσαμε κάθε φορά ήταν το πλάτος και το μήκος του όγκου από κάθε ποντίκι. Έχοντας τα δύο αυτά στοιχεία υπολογίζαμε τον όγκο του όγκου με σκοπό να αξιολογήσουμε και να συγκρίνουμε τα μεγέθη μεταξύ των δύο ομάδων. Την επομένη από την τελευταία μέρα της χορήγησης του αγωνιστή DLPC τα ζώα θυσιάστηκαν και τμήμα από τους όγκους διατέθηκε τόσο για απομόνωση RNA, πρωτεΐνης και για ιστολογικά πειράματα.

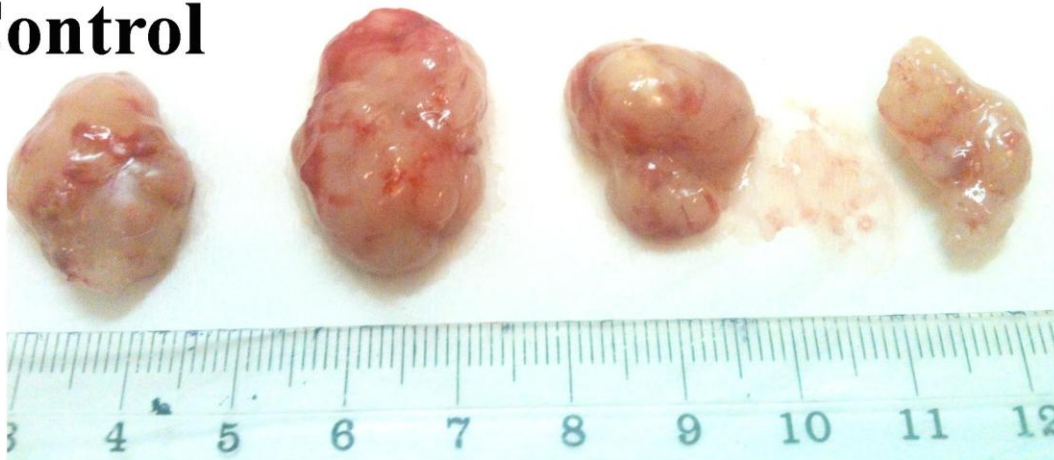
Treated Control



Treated

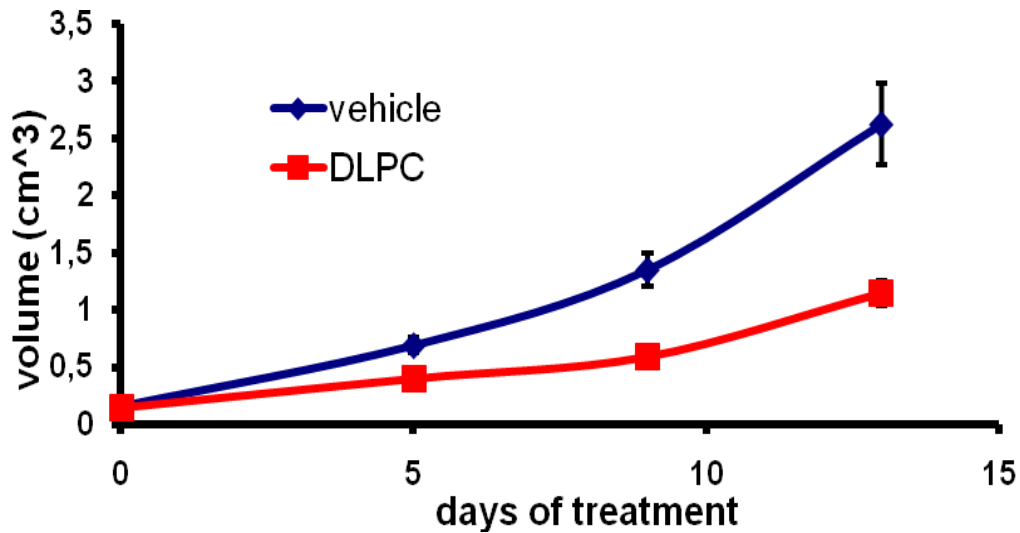


Control



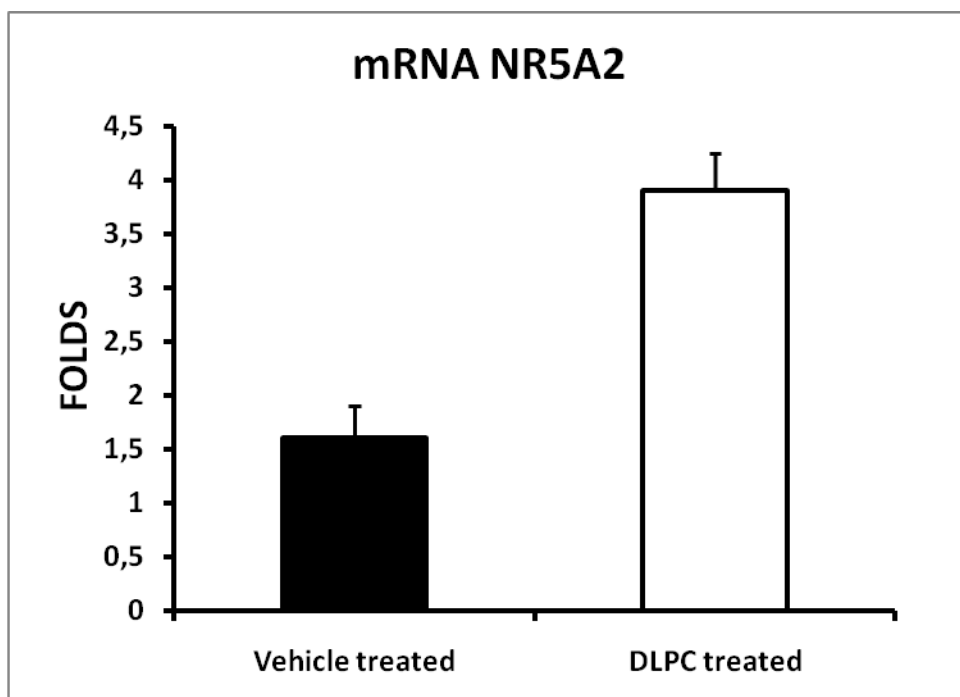
Εικόνα 23: Ενδεικτική φωτογραφία όπου απεικονίζονται όγκοι που αφαιρέθηκαν από τα ποντίκια. Παρατηρούμε πως οι όγκοι από τα ποντίκια που δέχθηκαν το DLPC είναι εμφανώς μικρότεροι.

Οι μετρήσεις του μεγέθους των όγκων έγιναν εφαρμόζοντας την εξίσωση: $\text{Όγκος} = (\text{Μήκος} \cdot \text{Πλάτος}^2) \cdot \pi / 6$. Αυτές έδειξαν μειωμένους κατά δύο φορές του όγκους των ατόμων που είχαν λάβει τον αγωνιστή του NR5A2.



Εικόνα 24: Σε αυτό το γράφημα παρατηρούμε πως κατά την διάρκεια της θεραπείας με αγωνιστή μειώνεται αισθητά ο ρυθμός αύξησης του όγκου

Ακολούθησε και qPCR από RNA που απομονώθηκε από τμήματα των όγκων με σκοπό να διαπιστωθεί το κατα πόσον έχουμε αύξηση του mRNA του NR5A2 με την χρήση των αγωνιστών. Τα δεδομένα από την qPCR έδειξαν αύξηση του mRNA του NR5A2. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα η μειωμένη αύξηση του μεγέθους των όγκων στα ποντίκια που προσέλαβαν DLPC μπορεί να σχετίζεται με την αύξηση της έκφρασης του NR5A2.



Εικόνα 25 Συγκριτική έκφραση του mRNA του NR5A2 μεταξύ των ατόμων που δεν έλαβαν τον αγωνιστή και αυτών που τον έλαβαν

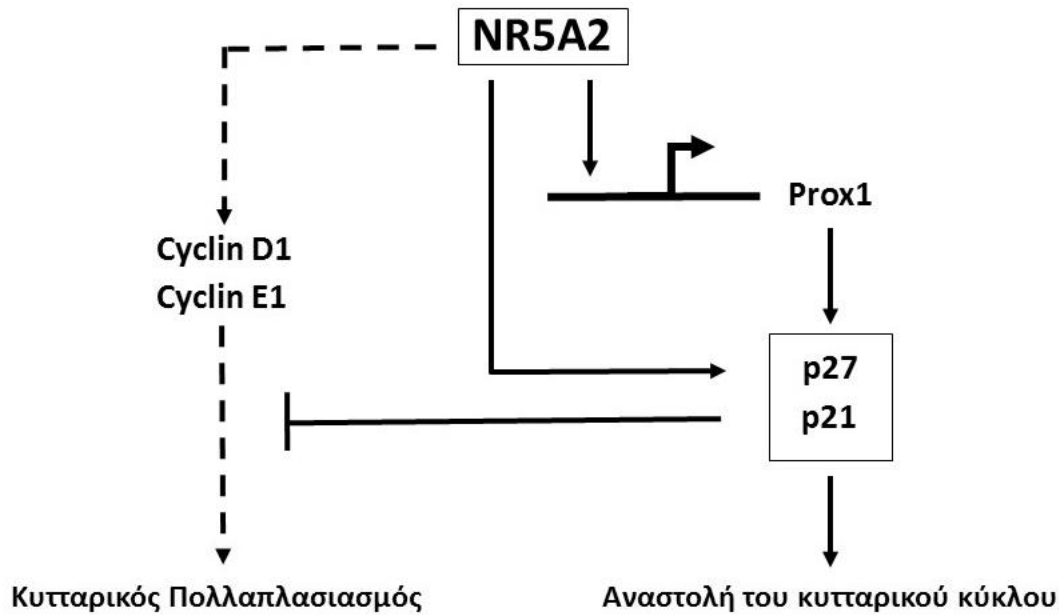
Συζήτηση

Οι μέχρι τώρα, γνωστές δράσεις του NR5A2 που αφορούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον καθιστούν ένα πιθανό ογκογονίδιο. Στην παρούσα εργασία καταδεικνύουμε έναν όχι και τόσο γνωστό ρόλο του NR5A2 στον καρκίνο του Νευρικού Συστήματος. Αρχικά ξεκινήσαμε τον έλεγχο για την δράση του NR5A2 σε καρκινικά κύτταρα του Νευρικού Συστήματος διότι, προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου μας έδειξαν πως ο NR5A2 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και οδηγεί σε νευρογένεση τα νευρικά βλαστικά κύτταρα. Προς αυτήν την κατεύθυνση εξετάσαμε την δράση του NR5A2 σε δύο μορφές καρκίνου του Νευρικού Συστήματος. Η μια είναι το Νευροβλάστωμα που αποτελεί νεοπλασία του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος και η δεύτερη είναι το Γλοιοβλάστωμα, μια κακοήθεια του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Οι σειρές που εξετάστηκαν είναι τα κύτταρα Neuro2A και SH-SY5Y που αποτελούν σειρές γλοιοβλαστώματος ποντικού

και ανθρώπου αντίστοιχα. Όσο αφορά το Γλοιοβλάστωμα εξετάσαμε τις σειρές GL261 και U87-MG που είναι σειρές ποντικού και ανθρώπου αντίστοιχα.

. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση του NR5A2 ανέστειλλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε θεαματικό βαθμό όπως διαπιστώθηκε από τις μελέτες ανοσοφθορισμού για τους δείκτες BrdU και pH3. Ο πιο έντονος φαινότυπος εμφανίστηκε στις σειρές Neuro2A, SH-SY5Y και U87-MG. Ειδικά για τα τελευταία ο φαινότυπος αυτός αποκτά μεγάλη σημασία, καθώς πρόκειται για κύτταρα ανθρώπινου γλοιοβλαστώματος, μια από τις πιο επιθετικές μορφές καρκίνου, με πολύ χαμηλό ποσοστό επιβίωσης. Και στις τρεις σειρές παρουσιάστηκε αύξηση στα επίπεδα του mRNA των γονιδίων *p21* και *p27-kip1* αλλά και του *Prox1*. Αξιοσημείωτη είναι η επαγωγή από την υπερέκφραση του NR5A2 των κυκλινών D1 και E1, οι οποίες είναι αποδέκτες της δράσης του NR5A2 σε άλλες μορφές καρκίνου.

Βλέπουμε πως ο NR5A2 έχει έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο στους καρκίνους του Νευρικού Συστήματος. Γνωρίζουμε από προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου μας, πως ο NR5A2 επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα Prox1 ο οποίος αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα του κυτταρικού κύκλου, μέσω της δράσης του στην πρωτεΐνη p27-kip1 και της ρυθμίζοντας και ελέγχοντας την μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Παρ' όλο που υπερέκφρασή του επάγει τις κυκλίνες της G1 φάσης, ο ίδιος επάγει γονίδια καταστολής του πολλαπλασιασμού στην ίδια φάση του κυτταρικού κύκλου. Είναι πιθανό λοιπόν πως ο NR5A2 να επιτελεί τον ογκοκατασταλτικό του ρόλο μέσω της επαγωγής του Prox1. Στις μορφές καρκίνου όπου ο NR5A2 διαδραματίζει έναν ογκογενετικό ρόλο, πιθανότατα να απουσιάζει ο μηχανισμός εκείνος που επάγει τα ογκοκατασταλτικά γονίδια.



Εικόνα 26 Πιθανός μηχανισμός δράσης του NR5A2 στις καρκινικές σειρές του νευρικού συστήματος

Στα επόμενα βήματα αυτής της εργασίας χρησιμοποιήσαμε αγωνιστές του NR5A2 που ενισχύουν της δράση του, ενώ αυξάνουν και την έκφρασή του. Στα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα αγωνιστές του NR5A2 και συγκεκριμένα ο DLPC, μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων χωρίς να τα οδηγεί σε απόπτωση. Επίσης αυξάνει την Νευρογένεση μειώνοντας παράλληλα την Γλοιογένεση όπως καταδείχθηκε από πειράματα ανοσοφθορισμού. Οι αγωνιστές του NR5A2 μείωσαν δραματικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων U87-MG, ενώ δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα στις σειρές Neuro2A, SH-SY5Y και GL261. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός πως με εξαίρεση τα κύτταρα U87-MG τα οποία εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα τον NR5A2, σε καμία από τις τρεις υπόλοιπες σειρές δεν παρατηρείται έστω και ασθενής έκφραση του NR5A2.

Σημαντικό εύρημα είναι τα *in vivo* πειράματα με τον αγωνιστή του NR5A2, DLPC. Ο DLPC μείωσε τον ρυθμό αύξησης των όγκων που αναπτύχθηκαν από την αλλομεταμοσχεύση των U87-MG (xenografts). Η μείωση του όγκου πιθανότατα έγινε μέσω του NR5A2 αφού βρέθηκε να είναι αυξημένος στους όγκους των ζώων που δέχθηκαν την θεραπεία. Τα αποτελέσματα αυτά, αποτελούν τα πρώτα προκλινικά δεδομένα για την αντιμετώπιση των Γλοιοβλαστωμάτων, μέσω της παρασκευής φαρμάκων-επαγωγέων του NR5A2.

Βέβαια για την αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ογκοκατασταλτική δράση του NR5A2 στις νεοπλασίες του Νευρικού Συστήματος, πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες. Μια σειρά πειραμάτων περιλαμβάνει την καταστολή του Prox1 από κύτταρα Γλοιοβλαστώματος και ταυτόχρονης επαγωγής του NR5A2 ώστε να ελεγχθεί η διατήρηση της αντιπολλαπλασιαστικής του δράσης. Ακόμη μελλοντικά πειράματα περιλαμβάνουν την καταστολή του NR5A2 στα κύτταρα U87-MG και την χρήση αγωνιστών ώστε να επιβεβαιωθεί πως η ογκοκατασταλτική τους δράση πραγματοποιείται μέσω του NR5A2. Επιπλέον πρέπει να γίνει μελέτη της δράσης του NR5A2 και των αγωνιστών του σε άλλες κυτταρικές σειρές ανθρώπινου Γλοιοβλαστώματος. Τέλος μια ακόμα σειρά πειραμάτων περιλαμβάνει την χρήση RNAseq για τον προσδιορισμό των αλλαγών στα γονίδια που εμπλέκονται στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού ύστερα από την χρήση των αγωνιστών του NR5A2.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Politis, P.K., D. Thomaidou, and R. Matsas, *Coordination of cell cycle exit and differentiation of neuronal progenitors*. Cell Cycle, 2008. **7**(6): p. 691-7.
2. Shirasaki, R. and S.L. Pfaff, *Transcriptional codes and the control of neuronal identity*. Annu Rev Neurosci, 2002. **25**: p. 251-81.
3. Louvi, A. and S. Artavanis-Tsakonas, *Notch signalling in vertebrate neural development*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(2): p. 93-102.
4. Lathia, J.D., M.P. Mattson, and A. Cheng, *Notch: from neural development to neurological disorders*. J Neurochem, 2008. **107**(6): p. 1471-81.
5. McKay, R., *Stem cells in the central nervous system*. Science, 1997. **276**(5309): p. 66-71.
6. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
7. Anderson, D.J., *Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual*. Neuron, 2001. **30**(1): p. 19-35.
8. Golden, J.A. and C.L. Cepko, *Clones in the chick diencephalon contain multiple cell types and siblings are widely dispersed*. Development, 1996. **122**(1): p. 65-78.
9. Doe, C.Q., *Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation*. Development, 2008. **135**(9): p. 1575-87.
10. Maris, J.M., et al., *Neuroblastoma*. Lancet, 2007. **369**(9579): p. 2106-20.
11. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 203-16.
12. Schor, N.F., *Neuroblastoma as a neurobiological disease*. J Neurooncol, 1999. **41**(2): p. 159-66.
13. Castel, V., et al., *Molecular biology of neuroblastoma*. Clin Transl Oncol, 2007. **9**(8): p. 478-83.
14. Evans, A.E., G.J. D'Angio, and J. Randolph, *A proposed staging for children with neuroblastoma*. Children's cancer study group A. Cancer, 1971. **27**(2): p. 374-8.
15. Pearson, A.D., et al., *High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial*. Lancet Oncol, 2008. **9**(3): p. 247-56.
16. Schwab, M., et al., *Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology*. Lancet Oncol, 2003. **4**(8): p. 472-80.
17. Grimmer, M.R. and W.A. Weiss, *Childhood tumors of the nervous system as disorders of normal development*. Curr Opin Pediatr, 2006. **18**(6): p. 634-8.
18. Nakagawara, A. and M. Ohira, *Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model*. Cancer Lett, 2004. **204**(2): p. 213-24.
19. Maris, J.M., *Recent advances in neuroblastoma*. N Engl J Med, 2010. **362**(23): p. 2202-11.
20. Johnsen, J.I., et al., *Embryonal neural tumours and cell death*. Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 424-38.
21. Frappaz, D., et al., *LMCE3 treatment strategy: results in 99 consecutively diagnosed stage 4 neuroblastomas in children older than 1 year at diagnosis*. J Clin Oncol, 2000. **18**(3): p. 468-76.
22. Maris, J.M. and K.K. Matthay, *Molecular biology of neuroblastoma*. J Clin Oncol, 1999. **17**(7): p. 2264-79.

23. Zage, P.E., et al., *Outcomes of the POG 9340/9341/9342 trials for children with high-risk neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group*. *Pediatr Blood Cancer*, 2008. **51**(6): p. 747-53.
24. Weinstein, J.L., H.M. Katzenstein, and S.L. Cohn, *Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma*. *Oncologist*, 2003. **8**(3): p. 278-92.
25. Evans, A.E., et al., *Prognostic factor in neuroblastoma*. *Cancer*, 1987. **59**(11): p. 1853-9.
26. van Noesel, M.M. and R. Versteeg, *Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'*. *Gene*, 2004. **325**: p. 1-15.
27. Jiang, M., J. Stanke, and J.M. Lahti, *The connections between neural crest development and neuroblastoma*. *Curr Top Dev Biol*, 2011. **94**: p. 77-127.
28. Breslow, N. and B. McCann, *Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma*. *Cancer Res*, 1971. **31**(12): p. 2098-103.
29. Brodeur, G.M., et al., *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage*. *Science*, 1984. **224**(4653): p. 1121-4.
30. Gross, N., et al., *Altered growth and phenotype in clonal mycN transfectants of the SK-N-SH neuroblastoma cell line*. *Int J Cancer*, 1994. **59**(1): p. 141-8.
31. Schmidt, M.L., et al., *The biological effects of antisense N-myc expression in human neuroblastoma*. *Cell Growth Differ*, 1994. **5**(2): p. 171-8.
32. Schweigerer, L., et al., *Augmented MYCN expression advances the malignant phenotype of human neuroblastoma cells: evidence for induction of autocrine growth factor activity*. *Cancer Res*, 1990. **50**(14): p. 4411-6.
33. Chan, H.S., et al., *MYCN protein expression as a predictor of neuroblastoma prognosis*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(10): p. 1699-706.
34. Bordow, S.B., et al., *Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(10): p. 3286-94.
35. Molenaar, J.J., et al., *Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes*. *Nature*, 2012. **483**(7391): p. 589-93.
36. Bown, N., et al., *Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(25): p. 1954-61.
37. Caron, H., et al., *Allelic loss of the short arm of chromosome 4 in neuroblastoma suggests a novel tumour suppressor gene locus*. *Hum Genet*, 1996. **97**(6): p. 834-7.
38. Fong, C.T., et al., *Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(10): p. 3753-7.
39. Maris, J.M., et al., *Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma*. *Cancer Res*, 1995. **55**(20): p. 4664-9.
40. Look, A.T., et al., *Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study*. *J Clin Oncol*, 1991. **9**(4): p. 581-91.
41. Brodeur, G.M., et al., *Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas*. *J Neurooncol*, 1997. **31**(1-2): p. 49-55.
42. Cohn, S.L., et al., *MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(21): p. 3604-13.
43. Mosse, Y.P., et al., *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. *Nature*, 2008. **455**(7215): p. 930-5.

44. Chang, H.H., et al., *Notch1 expression predicts an unfavorable prognosis and serves as a therapeutic target of patients with neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(17): p. 4411-20.
45. Becker, J., et al., *Homeobox transcription factor Prox1 in sympathetic ganglia of vertebrate embryos: correlation with human stage 4s neuroblastoma*. Pediatr Res, 2010. **68**(2): p. 112-7.
46. Wigle, J.T., et al., *An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype*. EMBO J, 2002. **21**(7): p. 1505-13.
47. Kaltezioti, V., et al., *Prox1 regulates the notch1-mediated inhibition of neurogenesis*. PLoS Biol, 2010. **8**(12): p. e1000565.
48. Foskolou, I.P., et al., *Prox1 suppresses the proliferation of neuroblastoma cells via a dual action in p27-Kip1 and Cdc25A*. Oncogene, 2013. **32**(8): p. 947-60.
49. Karcher, S., et al., *Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2182-9.
50. Moore, M.P., et al., *Intracranial tumors*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1996. **26**(4): p. 759-77.
51. 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.
52. Tso, C.L., et al., *Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 159-67.
53. Kleihues, P. and H. Ohgaki, *Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis*. Neuro Oncol, 1999. **1**(1): p. 44-51.
54. Krex, D., et al., *Long-term survival with glioblastoma multiforme*. Brain, 2007. **130**(Pt 10): p. 2596-606.
55. 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.
56. Hur, H., et al., *Cerebellar glioblastoma multiforme in an adult*. J Korean Neurosurg Soc, 2008. **43**(4): p. 194-7.
57. 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.
58. de Castro-Costa, C.M., et al., *Increased intracranial pressure in a case of spinal cervical glioblastoma multiforme. Analysis of these two rare conditions*. Arq Neuropsiquiatr, 1994. **52**(1): p. 64-8.
59. Jung, W.H., et al., *Congenital glioblastoma multiforme--report of an autopsy case*. J Korean Med Sci, 1990. **5**(4): p. 225-31.
60. Birbilis, T.A., et al., *Spinal metastasis of glioblastoma multiforme: an uncommon suspect?* Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(7): p. E264-9.
61. Lun, M., et al., *The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme*. J Neurooncol, 2011. **105**(2): p. 261-73.
62. 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.
63. 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.

64. Widjaja, A., et al., *Uncommon metastasis of a glioblastoma multiforme in liver and spleen*. Digestion, 2000. **61**(3): p. 219-22.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. Tysnes, B.B. and R. Mahesparan, *Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets*. J Neurooncol, 2001. **53**(2): p. 129-47.
69. Mentrikoski, M., et al., *Glioblastoma multiforme in skin: a report of 2 cases and review of the literature*. Am J Dermatopathol, 2008. **30**(4): p. 381-4.
70. Verdecchia, A., G. De Angelis, and R. Capocaccia, *Estimation and projections of cancer prevalence from cancer registry data*. Stat Med, 2002. **21**(22): p. 3511-26.
71. Mahvash, M., et al., *Glioblastoma multiforme in children: report of 13 cases and review of the literature*. Pediatr Neurol, 2011. **45**(3): p. 178-80.
72. Winters, J.L., D. Wilson, and D.G. Davis, *Congenital glioblastoma multiforme: a report of three cases and a review of the literature*. J Neurol Sci, 2001. **188**(1-2): p. 13-9.
73. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(1): p. 93-108.
74. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
75. Ulutin, C., et al., *Primary glioblastoma multiforme in younger patients: a single-institution experience*. Tumori, 2006. **92**(5): p. 407-11.
76. Simpson, J.R., et al., *Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1993. **26**(2): p. 239-44.
77. Katsetos, C.D., et al., *Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III beta-tubulin*. J Cell Physiol, 2009. **221**(3): p. 505-13.
78. Wilhelmsson, U., et al., *Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression*. Oncogene, 2003. **22**(22): p. 3407-11.
79. Baba, H., et al., *GFAP gene expression during development of astrocyte*. Dev Neurosci, 1997. **19**(1): p. 49-57.
80. Messing, A. and M. Brenner, *GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice*. Glia, 2003. **43**(1): p. 87-90.
81. Rutka, J.T., et al., *Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review*. J Neurosurg, 1997. **87**(3): p. 420-30.
82. Dohan, F.C., Jr., et al., *S-100 protein and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in human brain tumors*. Acta Neuropathol, 1977. **40**(2): p. 123-8.

83. Watanabe, T., et al., *IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1149-53.
84. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
85. Balss, J., et al., *Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors*. Acta Neuropathol, 2008. **116**(6): p. 597-602.
86. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
87. Dang, L., et al., *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate*. Nature, 2009. **462**(7274): p. 739-44.
88. Zhao, S., et al., *Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha*. Science, 2009. **324**(5924): p. 261-5.
89. Rakheja, D., et al., *The emerging role of d-2-hydroxyglutarate as an oncometabolite in hematolymphoid and central nervous system neoplasms*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 169.
90. Losman, J.A., et al., *(R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1621-5.
91. Koivunen, P., et al., *Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 484-8.
92. Noushmehr, H., et al., *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma*. Cancer Cell, 2010. **17**(5): p. 510-22.
93. Lu, C., et al., *IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 474-8.
94. Figueroa, M.E., et al., *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation*. Cancer Cell, 2010. **18**(6): p. 553-67.
95. Xu, W., et al., *Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases*. Cancer Cell, 2011. **19**(1): p. 17-30.
96. Hartmann, C., et al., *Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(6): p. 707-18.
97. Gan, H.K., A.H. Kaye, and R.B. Luwor, *The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme*. J Clin Neurosci, 2009. **16**(6): p. 748-54.
98. Vogt, N., et al., *Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11368-73.
99. Vivanco, I., et al., *The phosphatase and tensin homolog regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor response by targeting EGFR for degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6459-64.
100. Cloughesy, T.F., W.K. Cavenee, and P.S. Mischel, *Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 1-25.

101. Frattini, V., et al., *The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1141-9.
102. Singh, D., et al., *Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma*. Science, 2012. **337**(6099): p. 1231-5.
103. Jiao, Y., et al., *Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas*. Oncotarget, 2012. **3**(7): p. 709-22.
104. Liu, X.Y., et al., *Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations*. Acta Neuropathol, 2012. **124**(5): p. 615-25.
105. Nonoguchi, N., et al., *TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas*. Acta Neuropathol, 2013. **126**(6): p. 931-7.
106. Killela, P.J., et al., *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(15): p. 6021-6.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. Sun, G. and Y. Shi, *Nuclear receptors in stem cells and their therapeutic potential*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(13): p. 1299-306.
117. 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.
118. 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.

119. Goodwin, B., et al., *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 517-26.
120. 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.
121. 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.
122. 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.
123. 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.
124. Pullinger, C.R., et al., *Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype*. J Clin Invest, 2002. **110**(1): p. 109-17.
125. Clyne, C.D., et al., *Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20591-7.
126. Miki, Y., et al., *Immunolocalization of liver receptor homologue-1 (LRH-1) in human breast carcinoma: possible regulator of insitu steroidogenesis*. Cancer Lett, 2006. **244**(1): p. 24-33.
127. Annicotte, J.S., et al., *The nuclear receptor liver receptor homolog-1 is an estrogen receptor target gene*. Oncogene, 2005. **24**(55): p. 8167-75.
128. Thiruchelvam, P.T., et al., *The liver receptor homolog-1 regulates estrogen receptor expression in breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **127**(2): p. 385-96.
129. 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.
130. Duggavathi, R., et al., *Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation*. Genes Dev, 2008. **22**(14): p. 1871-6.
131. Gao, D.M., et al., *Expression of mouse liver receptor homologue 1 in embryonic stem cells is directed by a novel promoter*. FEBS Lett, 2006. **580**(7): p. 1702-8.
132. Zhou, Q., et al., *A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(42): p. 16438-43.
133. Xie, C.Q., et al., *Expression profiling of nuclear receptors in human and mouse embryonic stem cells*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(5): p. 724-33.
134. 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.
135. 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.
136. von Figura, G., et al., *Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation*. Gut, 2014. **63**(4): p. 656-64.

137. Flandez, M., et al., *Nr5a2 heterozygosity sensitises to, and cooperates with, inflammation in KRas(G12V)-driven pancreatic tumourigenesis*. *Gut*, 2014. **63**(4): p. 647-55.