Abstract

We examined the expression of PC by immunohistochemistry of paraffin-embedded breast tissue sections of 57 breast cancer patients with different stages of cancer progression. PC was expressed in the cancerous areas of breast tissue at higher levels than in the non-cancerous areas. We also found statistical association between the levels of PC expression and tumor size and tumor stage ($P < 0.05$). The involvement of PC with these two parameters was further studied in four breast cancer cell lines with different metastatic potentials; i.e., MCF-7, SKBR3 (low metastasis), MDA-MB-435 (moderate metastasis) and MDA-MB-231 (high metastasis). The abundance of both PC mRNA and protein in MDA-MB-231 and MDA-MB-435 cells was 2-3-fold higher than that in MCF-7 and SKBR3 cells. siRNA-mediated knockdown of PC expression in MDA-MB-231 and MDA-MB-435 cells resulted in a 50% reduction of cell proliferation, migration and in vitro invasion ability, under both glutamine-dependent and glutamine-depleted conditions. MDA-MB-231 cells containing PC knockdown showed a marked reduction in viability and proliferation rates suggesting the perturbation of pathways that are involved in cancer invasiveness. Strong PC suppression lowered glucose incorporation into downstream metabolites of oxaloacetate, the product of the PC reaction, including malate, citrate and aspartate. Levels of pyruvate, lactate, the redox partner of pyruvate, and acetyl-CoA were also lower suggesting the impairment of mitochondrial pyruvate cycles. Serine, glycine and 5-carbon sugar levels and flux of glucose into fatty acids were decreased. ATP, ADP and NAD(H) levels were unchanged indicating that PC suppression did not significantly affect mitochondrial energy production. The data indicate that the major metabolic roles of PC in invasive breast cancer are primarily anaplerosis, pyruvate cycling and mitochondrial biosynthesis of precursors of cellular components required for breast cancer cell growth and replication.

We also combine the literature data on the miRNAs that potentially regulate 40 metabolic enzymes responsible for metabolic reprogramming in cancers, with additional miRs from computational prediction. By combining known and predicted interactions of oncogenic transcription factors (TFs) (c-MYC, HIF1α and p53), sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1), 40 metabolic enzymes, and regulatory miRs we have established one of the first reference maps for miRs and oncogenic TFs that regulate metabolic reprogramming in cancers. The combined network shows that glycolytic enzymes are linked to miRs via p53, c-MYC, HIF1α, whereas the genes in serine, glycine and one carbon metabolism are regulated via the c-MYC, as well as other regulatory organization that cannot be observed by investigating individual miRs, TFs, and target genes.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการแสดงออกของเอ็นไซม์ pyruvate carboxylase (PC) ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมของผู้ป่วย 57 รายที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเต้านมในระยะที่ 1-4 โดยวิธี Immunohistochemistry พบว่าเอนไซม์ PC มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยรายเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ระดับการแสดงออกของเอนไซม์นี้ มีความสัมพันธ์กับระยะของมะเร็งเต้านม และขนาดของก้อนเนื้อมะเร็ง ซึ่งความเกี่ยวข้องของเอ็นไซม์ PC กับระยะและขนาดของมะเร็งเต้านมได้นำมาศึกษาต่อในเซลล์มะเร็งเต้านมแบบเพาะเลี้ยงที่มีระดับความสามารถในการแพร่กระจายต่างกัน เช่น เซลล์ MCF-7, SKBR3 (มีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำ), MDA-MB-435 (มีความสามารถในการแพร่กระจายปานกลาง) และ MDA-MB-231 (มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง) พบว่าในเซลล์มะเร็งที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง เช่น MDA-MB-231 และ MDA-MB-435 จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ PC ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนสูงกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำ เช่น MCF-7 and SKBR3 ประมาณ 2-3 เท่า การยับยั้งการแสดงออกของเอ็นไซม์ PC ด้วยsiRNA ในเซลล์ MDA-MB-231 และ MDA-MB-435 พบว่ามีผลทำให้การเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองลดลงถึง 50% ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีกลูตามีน และเพื่อยืนยันผลการทดลองข้างต้น จึงทำการสร้างเซลล์ MCF-7 ให้มีการสร้างเอ็นไซม์ PC เพิ่มขึ้น พบว่าทำให้อัตราการเจริญเติบโต, การเคลื่อนที่ และความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองเพิ่มขึ้น 2 เท่า คณะผู้วิจัยได้ทำการสร้างเซลล์ที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ PC อย่างถาวรโดยใช้เซลล์ MDA-MB-231 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง และทำการวัดระดับ metaboliteโดย LC-MS และใช้คาร์บอนไอโซโทปติดตามที่น้ำตาลกลูโคสและกลูตามีน ในเซลล์ MDA-MB-231 ที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ PC พบว่ามีการลดลงของ TCA cycle intermediate เช่น citrate และ malate ซึ่งการลดลงดังกล่าวมีผลทำให้การดึงสาร TCA cycle intermediate ไปสังเคราะห์สารต่างๆเช่น serine, glycine, aspartate และ กรดไขมัน ทำได้น้อยลง ซึ่งสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของโปรตีน, ไขมัน และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้ระดับของ pyruvate, acetyl Co-A และ lactate ซึ่งเป็น redox partner ของ pyruvate ก็ลดลงเช่นกัน การลดลงของ citrate และ malate ชี้ให้เห็นถึงความบกพร่องของ pyruvate cycle ระหว่างไมโทคอนเดรียและ cytosol ดังนั้นเซลล์ที่ถูกยับยั้ง PC จึงมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง จากผลการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นถึงบทบาททางเมตาบอลิซึมของเอ็นไซม์ PC ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการดำรงอยู่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาขอบข่ายการควบคุมเอ็นไซม์ในขบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์มะเร็งต่าง ๆ โดยวิธี computational biology พบว่าการแสดงออกของเอ็นไซม์ควบคุมเมตาบอลิซึมถูกควบคุมในแบบเครือข่ายผ่าน oncogenic transcription factor ได้แก่ HIF1a, p53 และ c-myc และ SREBP1 ในระดับ transcription และ miRNA.

Keywords: Pyruvate carboxylase, cancer, metastasis, metabolism, \ anapleorsis, aerobic glycolysis, mass spectroscopy, transcription, miRNA