



**Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk**

Pracownia Analiz Struktur Subkomórkowych

Marta Orlicka-Płocka

**Mechanizm działania oraz właściwości proapoptotyczne rybozydu  
kinetyny i jego pochodnych w komórkach nowotworowych**

rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. Eliza Wyszko

Promotor pomocniczy:

dr Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska

Poznań 2022

*Pani Prof. dr hab. Elizie Wyszko składam podziękowania za wskazanie interesującego tematu badań oraz okazaną pomoc w trakcie jego realizacji, za opiekę naukową, twórcze dyskusje, cenne uwagi podczas przygotowywania niniejszej pracy oraz okazaną wyrozumiałość i życzliwość*

*Pani Dr Agnieszce Fedoruk- Wyszomirskiej dziękuję za wszechstronną pomoc, przekazaną wiedzę, ogromną życzliwość, okazaną w każdej sytuacji oraz za cenne wskazówki udzielone mi podczas przygotowywania niniejszej pracy*

*Pani Dr Dorocie Gurdzie-Woźnej dziękuję za przekazaną wiedzę, zwłaszcza tę „cytometryczną”, za wszechstronną pomoc i wsparcie na jakie mogłam liczyć w trakcie realizacji tej pracy i nie tylko oraz za twórcze, niekoniecznie naukowe dyskusje i miłą atmosferę*

*Współpracownikom:*

*Panu prof. dr. hab. Janowi Barciszewskiemu*

*Pani Prof. dr hab. Mirosławie Z. Naskręt-Barciszewskiej*

*Pani dr hab. Małgorzacie Giel- Pietraszuk, prof. IChB*

*Pani Iwonie Gawrońskiej*

*Pawłowi Pawelczakowi*

*Małgosi Grabowskiej*

*Konradowi Kuczyńskiemu*

*Pawłowi Głodowiczowi*

*Dziękuję za wspaniałą, ciepłą atmosferę oraz okazaną pomoc*

*Moim Najbliższym, rodzinie i przyjaciołom, dziękuję za miłość, troskę, wsparcie  
i wyrozumiałość*

*Szczególne podziękowania składam mojemu mężowi Kubie, za nieocenioną pomoc,  
cierpliwość i wiarę we mnie*

*Pracę tę dedykuję Kubie, Jankowi i Hani*

Badania zrealizowano ze środków:

NCN 2014/13/B/NZ7/02291



## SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI .....	5
STRESZCZENIE .....	10
WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY.....	12
1. WPROWADZENIE LITERATUROWE.....	14
1.1. Zastosowanie związków małowcząsteczkowych w terapiach przeciwnowotworowych 16	
1.1.1. Obecny stan wiedzy dotyczący terapii przeciwnowotworowych.....	16
1.1.2. Perspektywy stosowania związków małowcząsteczkowych oraz związane z tym czynniki limitujące .....	19
1.1.3. Antymetabolity- historia badań .....	20
1.1.4. Analogi nukleozydów purynowych i pirymidynowych stosowane w leczeniu nowotworów.....	22
1.1.5. Adenozyna- jej rola w organizmie i terapiach nowotworowych.....	24
1.1.6. Pochodne adenozyny i ich wykorzystanie w terapiach przeciwnowotworowych 28	
1.1.7. Rybozyd kinetyny.....	31
1.2. Wpływ rybozydu kinetyny na metabolizm nukleozydów purynowych .....	34
1.3. Metabolizm nukleozydów purynowych.....	36
1.3.1. Regulacja metabolizmu i biosyntezy nukleotydów w komórkach ssaków .....	36
1.3.2. Metabolizm nukleozydów purynowych w komórkach nowotworowych.....	39
1.3.3. Szlak rezerwowy metabolizmu puryn .....	39
1.3.4. Kinaza adenozyny jako kluczowy enzym szlaku rezerwowego.....	42
1.3.5. Szlak de novo biosyntezy puryn .....	45
1.3.6. Purynosom .....	46
1.4. Rodzaje hodowli komórkowych .....	49
1.5. Metabolizm i bioenergetyka komórek nowotworowych .....	52
1.5.1. Mitochondria- więcej niż fabryka energii .....	58
1.5.2. Regulowana śmierć komórkowa .....	59
1.5.3. Apoptoza związana z mitochondriami .....	61
1.5.4. Autofagia i mitofagia.....	63
1.6. Wpływ związków małowcząsteczkowych na status oksydacyjny komórek glejaka wielopostaciowego.....	65
1.6.1. Reaktywne formy tlenu .....	68
1.6.2. RFT a śmierć komórkowa .....	71
2. CEL PRACY .....	73

3. MATERIAŁY I METODY .....	76
3.1. Linie komórkowe wykorzystane w badaniach.....	76
3.2. Utrzymywanie i przechowywanie linii komórkowych .....	76
3.3. Spis związków chemicznych wykorzystywanych w eksperymentach .....	77
3.4. Udział rybozydu kinetyny w metabolizmie puryn.....	77
3.4.1. Synteza N6-furfurylo-(1'- <sup>13</sup> C)adenozyny .....	77
3.4.2. Hodowla komórek .....	78
3.4.3. Analiza proliferacji komórek w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu xCELLigence .....	78
3.4.4. Oznaczanie poziomu apoptozy/nekrozy metodą cytometrii przepływowej .....	79
3.4.5. Pomiar stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2 metodą cytometrii przepływowej .....	79
3.4.6. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej .....	80
3.4.7. Tworzenie sferoidów komórek HepG2 i analiza mitochondrialnego potencjału błonowego ( $\Delta\Psi_m$ ) za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej .....	80
3.4.8. Izolacja i hydroliza DNA.....	82
3.4.9. Izolacja całkowitego RNA.....	82
3.4.10. Transkrypcja RNA in vitro .....	82
3.4.11. Hydroliza RNA i znakowanie [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP hydrolizatu RNA .....	83
3.4.12. Chromatografia TLC .....	83
3.4.13. Przygotowanie ekstraktów komórkowych zawierających mieszaninę dNTP i NTP .....	83
3.4.14. Procedura HPLC-DAD-ESI/MS.....	84
3.4.15. Analiza formowania purynosomu za pomocą cytometrii przepływowej .....	85
3.4.16. Immunofluorescencyjna detekcja inozyny i purynosomów .....	86
3.4.17. Przyżyciowa analiza powstających purynosomów.....	87
3.4.18. Analiza Western blot .....	87
3.4.19. Pomiar zawartości ATP w komórkach HepG2.....	88
3.4.20. Modelowanie i dokowanie ligandów.....	89
3.4.21. Analiza proteomiczna .....	90
3.4.22. Metody uzupełniające- Synteza cDNA i PCR w czasie rzeczywistym.....	90
3.5. Wpływ rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów komórek nowotworowych.....	92
3.5.1. Hodowla komórkowa .....	92
3.5.2. Analiza proliferacji komórek w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu xCELLigence .....	93
3.5.3. Oznaczanie poziomu apoptozy/nekrozy za pomocą cytometrii przepływowej..	94

3.5.4.	Analiza LIVE/DEAD za pomocą mikroskopu konfokalnego .....	94
3.5.5.	Analiza potencjału błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ ) technikami cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej .....	95
3.5.6.	Pomiar masy mitochondriów za pomocą MitoTracker Green FM metodą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej .....	96
3.5.7.	Pomiar stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2 metodą cytometrii przepływowej .....	97
3.5.8.	Pomiar zawartości ATP w komórkach HepG2 hodowanych w podłożu zawierającym galaktozę .....	98
3.5.9.	Monitorowanie wychwytu glukozy za pomocą 2-NBDG metodą cytometrii przepływowej .....	99
3.5.10.	Analiza metabolizmu energetycznego w komórkach HepG2 .....	99
3.5.11.	Detekcja autofagii i mitofagii w komórkach HepG2 metodą cytometrii przepływowej .....	100
3.5.12.	Oznaczenie poziomu wapnia za pomocą cytometrii przepływowej.....	101
3.5.13.	Oznaczanie wewnątrzkomórkowego poziomu NAD .....	101
3.5.14.	Pomiary oddychania komórkowego i statusu sprzężenia mitochondrialnego w nienaruszonych komórkach.....	101
3.5.15.	Apoptoza/nekroza w czasie rzeczywistym- wizualizacja za pomocą holotomografii .....	102
3.5.16.	Tworzenie sferoidów, inkubacja z RK i przygotowanie do analizy cytometrycznej i wizualizacji mikroskopowej.....	103
3.6.	Wpływ rybozydu kinetyny i jego pochodnych na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach glejaka wielopostaciowego .....	105
3.6.1.	Modelowanie homologiczne półotwartej konformacji ludzkiej kinazy adenozyiny.....	105
3.6.2.	Przygotowanie ligandów i dokowanie molekularne.....	107
3.6.3.	Synteza 8-azaRK i 7-deazaRK .....	107
3.6.4.	Hodowla komórek .....	107
3.6.5.	Analiza zużycia tlenu.....	107
3.6.6.	Analiza porównawcza generowania mitochondrialnych RFT przeprowadzona za pomocą cytometrii przepływowej .....	107
3.6.7.	Tworzenie sferoidów, inkubacja ze związkami i przygotowanie do wizualizacji mikroskopowej – selekcja pochodnej RK.....	108
3.6.8.	Analiza porównawcza właściwości przeciwnowotworowych i pro- oksydacyjnych RK i 7-deazaRK, z wykorzystaniem dwuwymiarowej hodowli komórek T98G	109
3.7.	Analiza statystyczna .....	113
4.	WYNIKI.....	115

4.1.	Udział rybozydu kinetyny w metabolizmie puryn.....	115
4.1.1.	Udział analogu adenozy- rybozydu kinetyny w szlakach enzymatycznych biosyntezy puryn w komórkach eukariotycznych.....	115
4.1.2.	Wyznaczenie optymalnego stężenia RK dla analiz obejmujących badania przepływu metabolicznego.....	117
4.1.3.	KMP - pierwszy metabolit pośredni w szlaku rezerwowym.....	121
4.1.4.	Szlak rezerwowy- biosynteza mono-, di- i trójfosforanów RK.....	123
4.1.5.	Synteza DNA.....	125
4.1.6.	Wzajemne oddziaływanie szlaków metabolizmu puryn.....	127
4.1.7.	Asocjacja purynosomu.....	131
	Materiały uzupełniające do części Udział rybozydu kinetyny w metabolizmie puryn...	136
4.2.	Wpływ rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów.....	146
4.2.1.	Zamiana glukozy na galaktozę w pożywce hodowlanej przyspiesza śmierć komórek po traktowaniu RK.....	146
4.2.2.	Pozbawienie glukozy nasila działanie RK- wpływ związku na różne linie komórkowe wykazujące efekt Crabtree.....	150
4.2.3.	Hamowanie glikolizy za pomocą 2-DG w komórkach HepG2, poddanych działaniu RK, jest mniej skuteczne w indukowaniu śmierci komórek niż w komórkach poddanych działaniu RK i hodowanych w pożywce zawierającej galaktozę.....	153
4.2.4.	RK indukuje perturbacje potencjału błony mitochondrialnej i obniża poziom ATP w komórkach HepG2.....	155
4.2.5.	RK zaburza parametry oksydacyjne w komórkach HepG2 rosnących w pożywce zawierającej galaktozę lub glukozę.....	159
4.2.6.	Rybozyd kinetyny indukuje autofagię oraz mitofagię, zaburzając gospodarkę wapnia, funkcje łańcucha oddechowego i utrzymanie odpowiedniego poziomu NAD.....	162
4.2.7.	Wpływ rybozydu kinetyny na żywotność sferoidów komórek HepG2.....	167
4.3.	Wpływ rybozydu kinetyny na produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach glejaka wielopostaciowego.....	171
4.2.8.	Związki małowcząsteczkowe jako element terapii oksydacyjnej w komórkach GBM: Profile metaboliczne i analiza porównawcza mitochondrialnych RFT w komórkach T98G vs. HepG2.....	171
4.2.9.	Poszukiwanie analogów RK wykazujących podobne powinowactwo do kinazy adenozy- (ADK).....	173
4.2.10.	Wpływ RK, 8-azaRK i 7-deazaRK na żywotność sferoidów komórek T98G.....	175
4.2.11.	Indukcja cytoplazmatycznego i mitochondrialnego stresu oksydacyjnego w sferoidach T98G po podaniu RK, 8-azaRK i 7-deazaRK.....	178
4.2.12.	Kinaza adenozy- jako kluczowy enzym dla uzyskania pełnej aktywności i toksyczności pochodnej adenozy- poprzez szlak rezerwowy.....	183

4.2.13. Zaburzenie parametrów oksydacyjnych w komórkach T98G po działaniu RK i 7-deazaRK. Wpływ związków na aktywację metabolicznego SO i mechanizmów obrony antyoksydacyjnej.....	186
4.2.14. Wpływ RK i 7-deazaRK na utlenianie DNA.....	189
4.2.15. Wpływ RK i 7-deazaRK na poziom ekspresji genów biorących udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny w komórkach T98G.....	190
5. DYSKUSJA .....	194
5.1. Wpływ rybozydu kinetyny na metabolizm puryn.....	194
5.2. Wpływ rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów.....	204
5.3. Wpływ rybozydu kinetyny na produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach glejaka wielopostaciowego .....	217
6. PODSUMOWANIE .....	230
7. WYKAZ SCHEMATÓW, RYSUNKÓW I TABEL.....	233
Spis schematów.....	233
Spis rysunków.....	235
Spis tabel.....	236
Materiały uzupełniające - rysunki i tabele .....	236
8. BIBLIOGRAFIA.....	237

## STRESZCZENIE

N<sup>6</sup>-furfuryloadenozyna (rybozyd kinetyny, RK) jest pochodną adenozy, która hamuje proliferację komórek nowotworowych. Jej aktywność jest zależna od kinazy adenozykowej, która decyduje o jej toksyczności.

W celu sprawdzenia czy RK może brać udział w wewnątrzkomórkowym, metabolicznym przepływie puryn i w ten sposób zakłócać funkcje enzymów biosyntezy puryn, wykorzystałam stabilny izotop. Znakowany RK był metabolizowany przez komórki nowotworowe, co prowadziło do produkcji metabolitów. Używając różnych, komplementarnych testów komórkowych, prześledziłam drogę metabolitów pośrednich, powstałych w wyniku enzymatycznej transformacji [<sup>13</sup>C]RK w komórkach nowotworu wątrobowokomórkowego (linia komórkowa HepG2) i wykazałam obecność licznych modyfikacji w DNA i RNA. Tak szczegółowe badania ukazały złożoność działania rybozydu kinetyny w komórkach nowotworowych, powodując zaburzenia metaboliczne, asocjację purynosomów i w ostateczności indukcję śmierci komórki. Uzyskane wyniki wskazują, że w metabolizm pochodnych purynowych oraz regulację ich biosyntezy i transformację w komórkach nowotworowych, zaangażowane są wszystkie trzy szlaki (*de novo*, rezerwowy i kataboliczny), wzajemnie się uzupełniające, poprzez dostarczanie metabolitów pośrednich do kolejnych syntez.

Potwierdziłam, że rybozyd kinetyny w komórkach nowotworowych wykazuje złożony mechanizm działania, wpływając na wiele poziomów organizacji komórki. Jego obecność zaburza metabolizm komórek nowotworowych, powodując brak równowagi energetycznej, oksydacyjnej, spowalniając proliferację komórek nowotworowych.

Terapie oparte na związkach małowcząsteczkowych umożliwiły nowe spojrzenie na leczenie nowotworów z uwzględnieniem zaburzeń funkcji mitochondrialnych, takich jak obniżenie potencjału błony mitochondrialnej, indukcja stresu oksydacyjnego, czy wpływ na ich morfologię. Wykazałam, że RK to związek, który selektywnie wpływa na szlaki molekularne, kluczowe dla wzrostu i apoptozy komórek, poprzez zakłócanie funkcji mitochondriów, a tym samym może być potencjalnym środkiem mitotoksycznym.

Metabolizm komórek nowotworowych opiera się głównie na efekcie Crabtree, który polega na indukowanym przez glukozę zahamowaniu oddychania komórkowego, a tym samym fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), co wspomaga przeżycie komórek nowotworowych w warunkach stresu metabolicznego. Najprostszym sposobem obejścia tego zjawiska było zastąpienie glukozy galaktozą w środowisku hodowlanym. W konsekwencji

komórki stały się bardziej wrażliwe na perturbacje mitochondrialne wywołane przez czynnik mitotoksyczny. W niniejszej pracy zbadalam wpływ RK na funkcje mitochondriów w komórkach HepG2 zmuszonych do polegania głównie na OXPHOS.

Wykazałam, że RK w środowisku galaktozy jest silniejszym czynnikiem indukującym apoptozę, obniża potencjał błony mitochondrialnej, zmniejsza poziom glutationu, wyczerpuje ATP komórkowe i indukuje produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w stanie OXPHOS, co prowadzi do utraty żywotności komórek.

Ostatni etap moich badań stanowiło wykazanie wpływu RK i jego pochodnych na status redoks komórek glejaka wielopostaciowego. Terapie przeciwnowotworowe oparte na związkach małowcząsteczkowych, poprzez upośledzenie balansu oksydacyjnego, mogłyby także stanowić nowe podejście terapeutyczne w leczeniu glejaka wielopostaciowego (GBM). Rybozyd kinetyny i nowo zaprojektowane pochodne (8-azaRK, 7-deazaRK) selektywnie wpływają na szlaki molekularne, kluczowe dla wzrostu komórek poprzez zakłócanie statusu redoks komórek nowotworowych. Dzięki temu związki te mogą stanowić potencjalną alternatywę w terapii oksydacyjnej GBM. Podwyższony podstawowy poziom reaktywnych form tlenu (RFT) w GBM wspomaga przeżycie komórek nowotworowych i powoduje ich oporność na leki. Najprostszym sposobem indukowania śmierci komórek jest osiągnięcie progu redoks i ominięcie mechanizmów obrony antyoksydacyjnej. W konsekwencji, komórki stają się bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny (SO), wywołany przez czynniki egzogenne.

W niniejszej pracy zbadalam wpływ RK i jego pochodnych na status redoks komórek T98G w hodowlach 2D i 3D. Zastosowanie sferoidów komórek T98G pozwoliło mi na wyselekcjonowanie jednej pochodnej - 7-deazaRK - o porównywalnej z RK aktywności przeciwnowotworowej. Oba związki indukowały powstawanie RFT i genotoksycznego SO, powodując peroksydację lipidów i prowadząc do apoptozy. Wyniki te wskazują, że RK i 7-deazaRK modulują komórkowe środowisko redoks komórek T98G, a wrażliwość tych komórek zależy od wydajności mechanizmów antyoksydacyjnych.

## WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

2D i 3D - dwu- i trójwymiarowe hodowle komórkowe in vitro

ACD - przypadkowa śmierć komórki

ADCD - śmierć komórki zależna od autofagii

Ado - adenozyina

ADP - adenozyino-5'-difosforan

ADSL - liaza adenylobursztynianowa

AIRS - syntetaza rybonukleotyd 5'-aminoimidazolu

AMP - adenozyino-5'-monofosforan

AMPK - kinaza aktywowana 5'AMP

AMPK - Kinaza aktywowana 5'AMP

APRT - fosforybozylotransferaza adeninowa

ATIC - dwufunkcyjne białko biosyntezy puryn PURH (syntaza monofosforanu inozyny)

ATP - adenozyino-5'-trójfosforan

CART-T - chimeryczne komórki T receptora antygeny są komórkami T

CASP3, CASP6 i CASP7 – kaspazy wykonawcze 3, 6 i 7

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

EGFR - receptor nabłonkowego czynnika wzrostu

ENT1, ENT2, ENT3, ENT4 - transportery nukleozydów (1-4)

FasL - białko transbłonowe typu II

GARS - ligaza fosforybozyloaminowo-glicynowa

GART - formiotransferaza fosforybozyloglicynamidu

GBM - glejak wielopostaciowy

GMP, GDP, GTP - guanozyino-5'-monofosforan, guanozyino-5'-difosforan, guanozyino-5'-trójfosforan

GSH - glutation

HPRT - fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa

I - inozyna

ICD - immunogenna śmierć komórki

IMP - monofosforan inozyny

KDP - 5'- difosforan rybozydu kinetyny

KIT - kinaza tyrozynowo-białkowa KIT

KMP - 5'- monofosforan rybozydu kinetyny

KTP - 5'- trójfosforan rybozydu kinetyny

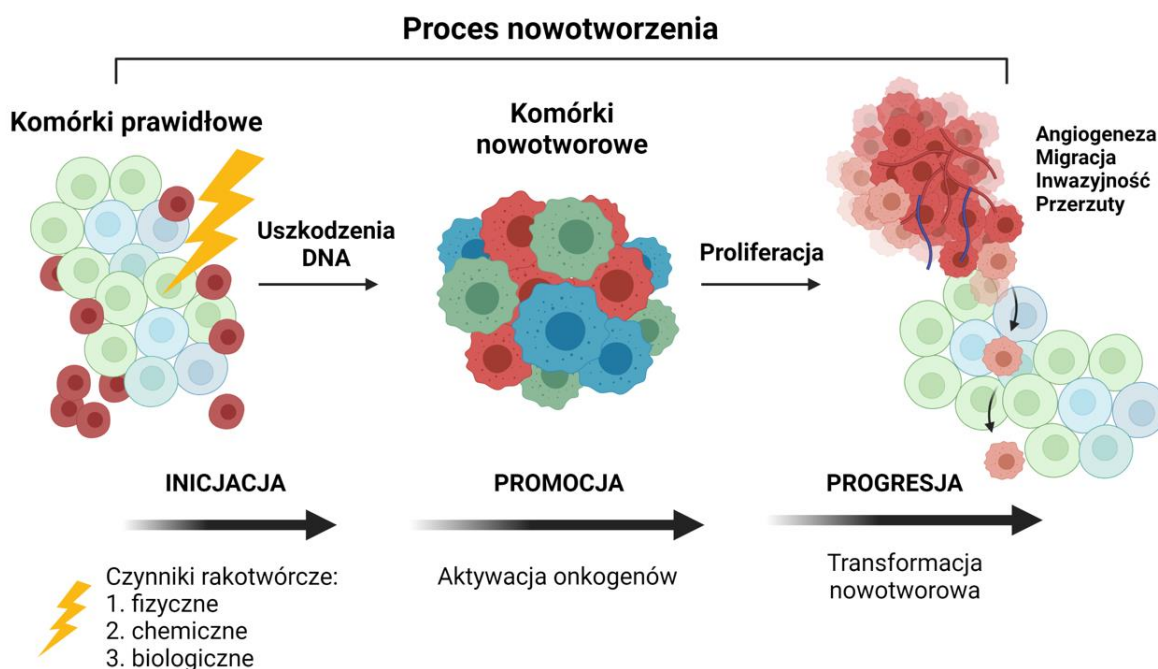
LDCD - śmierć komórki zależna od lizosomu



MMP - potencjał błony mitochondrialnej  
MOMP - Permeabilizacja zewnętrznej błony mitochondrialnej  
mTOR - kinaza mTOR, tzw. ssaczy cel rapamycyny  
NAD - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy  
NADH - Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy  
NMDP - kinaza difosforanów nukleozydów  
NMPK - kinaza monofosforanów nukleozydów  
OXPHOS - fosforylacja oksydacyjna  
p53 - czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego  
PAICS - karboksylaza fosforybozyloaminoimidazolu  
PDGFR- $\alpha$  - receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\alpha$   
PFAS/FGAMS - karboksylaza fosforybozyloaminoimidazolu  
PI3K - 3 kinaza fosfatydyloinozytolu  
PNP - fosforylaza nukleozydów purynowych  
PPAT - amidofosforofibosylotransferaza  
PRPP - pirofosforan fosforybozylu  
PTEN - ludzkie białko kodowane przez gen supresorowy PTEN  
R5P - rybozo-5-fosforan  
RCD - regulowana śmierć komórki  
RFT - reaktywne formy tlenu  
RK - rybozyd kinetyny  
RNA - kwas rybonukleinowy  
RNR - reduktaza rybonukleotydomowa  
SOD - dysmutaza ponadtlenkowa  
TCA - cykl Krebsa  
TNF - alfa czynnik martwicy nowotworów  
VEGFR - receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego

## 1. WPROWADZENIE LITERATUROWE

Nowotwór to złożona jednostka chorobowa, którą cechuje niekontrolowany wzrost komórek i wysoka ich zdolność do rozprzestrzeniania się na inne organy ciała. Proces nowotworzenia może rozpocząć się niemal w każdym miejscu ludzkiego ciała, które składa się z bilionów komórek (**Schemat 1**) National Cancer Institute, [1].

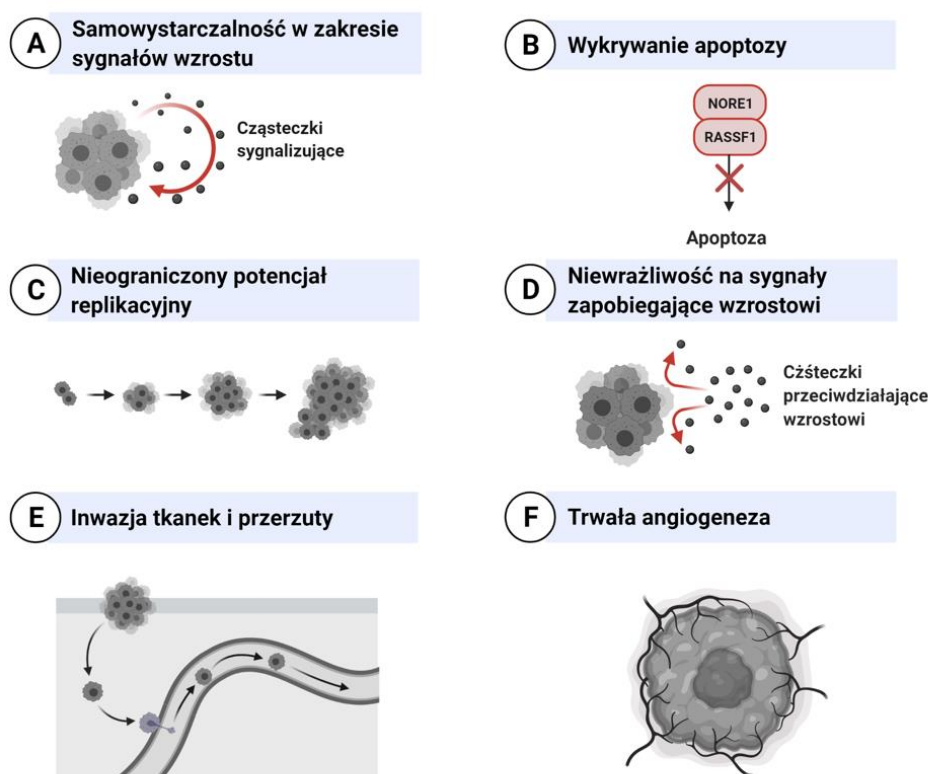


**Schemat 1:** Etapy procesu nowotworzenia, czynniki wywołujące oraz efekty transformacji nowotworowej.

Schemat powstał w oparciu o informacje pochodzące ze strony internetowej National Cancer Institute oraz publikacji [2], w programie BioRender.com.

Nowotwór może być chorobą uwarunkowaną genetycznie i powodowany jest mutacjami genów, które kontrolują sposób funkcjonowania komórek, zwłaszcza ich wzrost i podziały. Oprócz czynników dziedzicznych lub mutacji nabytych, istnieją także inne czynniki rakotwórcze, tzw. *karcynogeny*, które mają wpływ na błędy podczas podziału komórek i uszkodzenia DNA. Są to głównie szkodliwe substancje w środowisku, takie jak substancje chemiczne (dym papierosowy, alkohol itp.), czynniki biologiczne (wirusy) i fizyczne (np. promieniowanie jonizujące, UV) (**Schemat 1**). Organizm zazwyczaj eliminuje komórki z uszkodzonym DNA, zanim staną się one nowotworowe. Jednak zdolność organizmu do tego procesu zmniejsza się wraz z wiekiem, spada wtedy wydajność systemów naprawczych, co przyczynia się do wyższego ryzyka zachorowania na nowotwór w późniejszym okresie życia. Nowotwór u każdej osoby ma unikalną kombinację zmian genetycznych, a w miarę jego

wzrostu pojawiają się dodatkowe zmiany (Światowa Organizacja Zdrowia, ang. World Health Organization, WHO). Z czasem komórki nowotworowe stają się coraz bardziej odporne na mechanizmy kontrolne zapobiegające nowotworzeniu- w rezultacie dzielą się szybciej niż ich komórki progenitorowe (prekursorowe). Ponadto mają one zdolność unikania zaprogramowanej śmierci komórkowej, mimo że ich liczne nieprawidłowości zwykle czynią je głównymi celami apoptozy. W późnych stadiach procesu nowotworzenia, komórki te przełamują granice prawidłowych tkanek i dają przerzuty (rozprzestrzeniają się) do innych miejsc w organizmie (**Schemat 2**).



**Schemat 2:** Cechy komórek nowotworowych. Schemat powstał w oparciu o informacje pochodzące ze strony internetowej National Cancer Institute, w programie BioRender.com.

Dotychczas zidentyfikowano około 200 różnych rodzajów nowotworów, co świadczy o tym, że jest to choroba bardzo zróżnicowana na poziomie tkankowym i ta różnorodność jest głównym wyzwaniem dla jej specyficznej diagnostyki, a następnie skuteczności leczenia.

Progresja nowotworu jest wynikiem zaburzenia równowagi metabolicznej, regulacji proliferacji i różnicowania komórek, co przyczynia się do wzrostu heterogenności oraz zróżnicowanej odpowiedzi na terapię [3]. Nowotwory są jedną z głównych przyczyn zgonów

na całym świecie, a w ostatniej dekadzie wiele badań skupiło się na poszukiwaniu nowych terapii, które zmniejszyłyby efekty uboczne wywołane przez konwencjonalne terapie. Dlatego też dogłębne zrozumienie złożonych procesów nowotworzenia, ma fundamentalne znaczenie dla projektowania precyzyjnych i skutecznych terapii.

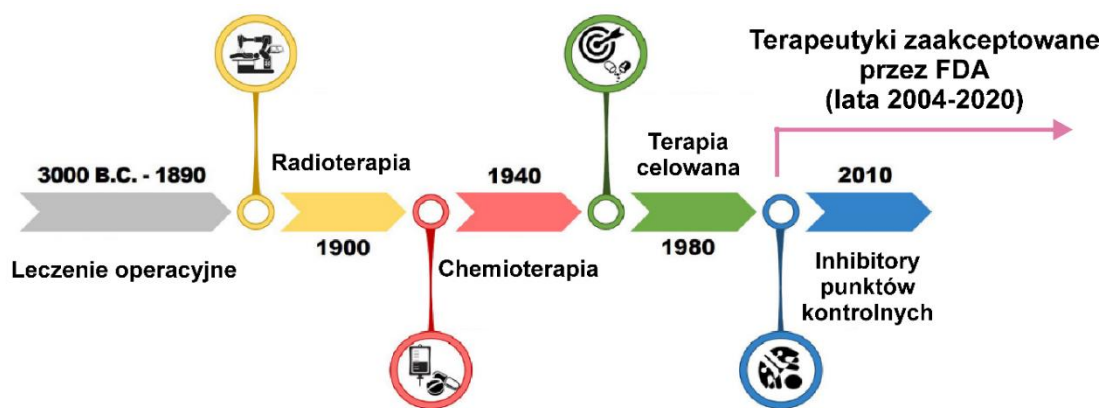
## **1.1. Zastosowanie związków małowcząsteczkowych w terapiach przeciwnowotworowych**

W ostatnich latach wykazano, że terapie przeciwnowotworowe oparte o związki małowcząsteczkowe, mają silny wpływ na funkcjonowanie komórek nowotworowych, poprzez oddziaływanie na zdefiniowane cele molekularne lub całe szlaki metaboliczne. Związki te wykazują określony mechanizm działania, który polegać może na aktywacji lub inaktywacji ścieżek biologicznych, związanych z regresją nowotworu przy jednoczesnym zminimalizowaniu niekorzystnego działania wpływu na zdrowe tkanki. Związki małowcząsteczkowe wpływają również na aktywację maszynerii śmierci komórkowej, poprzez bezpośrednie działanie na mitochondria, co jest obiecującym podejściem terapeutycznym, ponieważ wiąże się z uruchomieniem odpowiedzi komórkowej na zaistniały stres i utrzymaniem równowagi metabolicznej komórki [4, 5].

Odkrywanie i rozwój leków małowcząsteczkowych uległo transformacji w ciągu ostatnich lat, a postęp ten rozpoczął się od stosowania chemioterapii klasycznej do strategii medycyny spersonalizowanej, która skupia się na lekach ukierunkowanych molekularnie.

### ***1.1.1. Obecny stan wiedzy dotyczący terapii przeciwnowotworowych***

Odkrycie i rozwój małowcząsteczkowych leków przeciwnowotworowych zostało zrewolucjonizowane w ciągu ostatnich 20 lat [6]. Przede wszystkim rezygnuje się z uniwersalnego podejścia, kładącego nacisk na chemioterapię konwencjonalną, na rzecz strategii medycyny spersonalizowanej, która koncentruje się na precyzyjnych lekach przeciwnowotworowych ukierunkowanych molekularnie (**Schemat 3**).



**Schemat 3:** Oś czasu przedstawiająca 4 kluczowe punkty zwrotne we współczesnej onkologii. Zmiany te przyczyniły się do poprawienia skuteczności leczenia nowotworów, w tym także tych zaawansowanych.

Schemat pochodzi z publikacji [6].

Możliwe do wykorzystania cechy komórek nowotworowych, są w coraz większym stopniu odkrywane, dzięki lepszemu zrozumieniu ich biologii oraz podłoża genetycznego nowotworu. Do powstania nowej generacji terapii przeciwnowotworowych, przyczyniło się między innymi zrozumienie takich procesów jak progresja komórek nowotworowych, inwazyjność, zdolność tworzenia przerzutów oraz unikanie śmierci komórkowej [7], a także wykorzystanie takich metod jak np. sekwencjonowanie genomów nowotworowych. Niemniej, badanie mechanizmów działania związków małowcząsteczkowych niesie ze sobą szereg trudności, a kluczowym etapem jest ich walidacja i selekcja celu molekularnego [7].

Chemioterapia pozostaje nadal ważnym elementem terapii przeciwnowotworowej, jednakże pojawiają się nowsze "leki celowane", które są skuteczniejsze, w niektórych typach nowotworów. Istnieją dwa główne podejścia w celowanej terapii nowotworów: przeciwciała monoklonalne skierowane na receptory powierzchniowe komórek, czy enzymy wewnątrzkomórkowe oraz związki małowcząsteczkowe. Każda z tych strategii znacznie zwiększa skuteczność leczenia i wskaźniki przeżywalności chorych [7, 8].

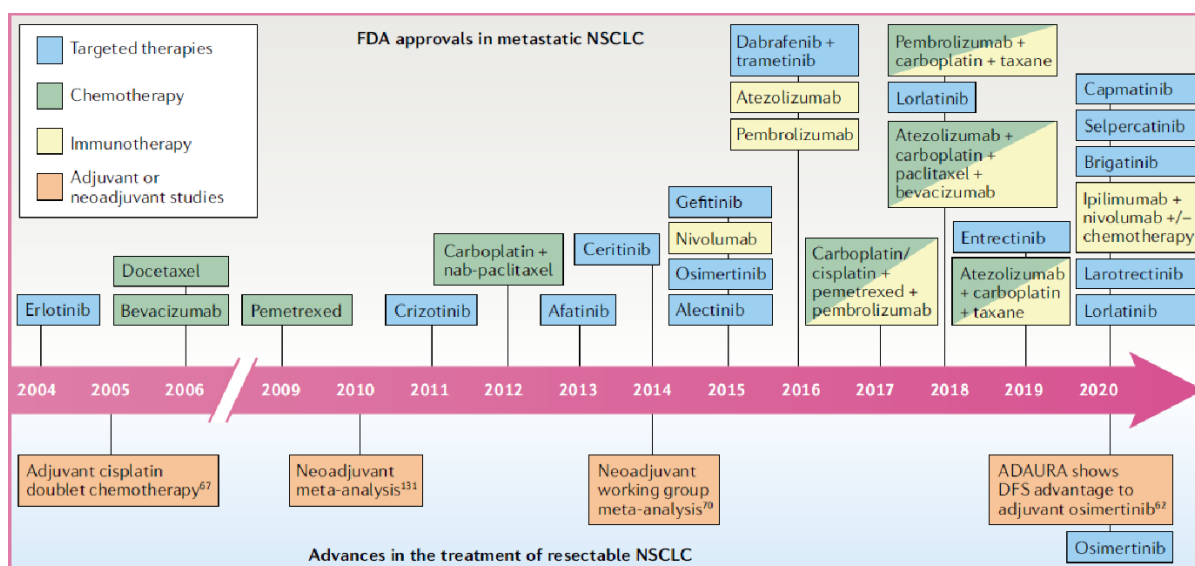
Przeciwciała monoklonalne czy leki immunoterapeutyczne pozwoliły na opracowanie nowych personalizowanych protokołów terapeutycznych, które wykazały bardzo wysoką skuteczność i niską toksyczność wobec pacjentów [9, 10]. Terapie te charakteryzują się zazwyczaj wysoką selektywnością, mimo iż przeciwciała, na których się opierają, cechują się dużą masą cząsteczkową, a ich cele molekularne są często ograniczone do powierzchni komórek. Ponadto, badania w dziedzinie onkologii są nieustannie ukierunkowywane na odkrywanie nowych i skutecznych strategii terapeutycznych, w tym obiecujących immunoterapii CAR-T (ang. chimeric antigen receptors T cells; Yescarta® i Kymriah® są

obecnie jedynymi dwoma zatwierdzonymi przez FDA produktami terapii komórkowej CAR-T dostępnymi na rynku w Stanach Zjednoczonych) i terapii genowej [11-15].

Dla porównania, związki małowcząsteczkowe różnią się selektywnością i ze względu na ich mały rozmiar, mogą potencjalnie wiązać szerszy zakres celów zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych. Do chwili obecnej, istnieją 43 małowcząsteczkowe inhibitory zatwierdzone przez Agencję Żywności i Leków (FDA), do stosowania we wskazaniach onkologicznych. Wśród nich obecne są, inhibitory wielu kinaz, które wywierają działanie przeciwnowotworowe, poprzez jednoczesne oddziaływanie na szerokie spektrum ludzkiego kinomu [16]. Przykładem takich związków są sorafenib i sunitinib i podobnie jak większość leków z tej klasy, oba leki hamują kinazy VEGFR1, VEGFR2, KIT, i PDGFR- $\alpha$  (pełne nazwy kinaz znajdują się w *Wykazie skrótów*).

Selektywne inhibitory małowcząsteczkowe, w niektórych przypadkach, hamują pojedynczy element sygnalizacji komórkowej [8]. Na przykład w wielu różnych nowotworach złośliwych dochodzi do pozytywnego wzmocnienia funkcji kinazy tyrozynowej, a szereg małowcząsteczkowych inhibitorów kinaz został już wprowadzony do badań klinicznych. Przykłady obejmują takie związki jak imatinib (stosowany w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej i nowotworów przewodu pokarmowego), erlotynib (nie drobnokomórkowy rak płuca) i inne (**Schemat 4**) [11].

Ponadto, nowe, łączone terapeutyczne protokoły, które wykorzystują różne leki i różne rodzaje leczenia, są w trakcie badań klinicznych, w celu znalezienia nowych schematów, mogących zwiększyć skuteczność leczenia i zmniejszyć możliwość rozwoju oporności farmakologicznej [17].



**Schemat 4:** Oś czasu przedstawiająca leki (w tym inhibitory małowcząsteczkowe) dopuszczone lub wskazane do leczenia nowotworów przez Agencję Żywności i Leków (FDA), na przykładzie niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC, ang. non-small-cell lung carcinoma). Schemat pochodzi z publikacji [18].

### *1.1.2. Perspektywy stosowania związków małowcząsteczkowych oraz związane z tym czynniki limitujące*

Związki małowcząsteczkowe są stosowane jako środki terapeutyczne, głównie dlatego, że ich opracowywanie i dostarczanie jest stosunkowo proste. Mimo, że leki tego typu mogą być dość dobrymi inhibitorami enzymów, ligandami receptorów lub modulatorami allosterycznymi, nadal posiadają poważne ograniczenia. Jednym z takich czynników limitujących jest fakt, iż większość funkcji komórkowych uwarunkowana jest poprzez interakcje białek z innymi białkami. Celowanie w sieci oddziaływań białko-białko za pomocą małych cząsteczek nadal stanowi wyzwanie, którego prawdopodobnie nie da się pokonać, wykorzystując te związki jako jedyne narzędzia. Ponadto, aby lek mógł być wykorzystany klinicznie, musi być selektywny, co oznacza, że musi wiązać się ze swoim celem molekularnym ze stosunkowo wysokim powinowactwem [19]. Dlatego nadal, jednym z obszarów, w którym związki małowcząsteczkowe prawdopodobnie są najlepszymi możliwymi narzędziami terapeutycznymi, to zwalczanie bakterii, grzybów i wirusów. Co więcej, związki te stały się także interesującym celem w badaniach nad procesem starzenia oraz chorób neurodegeneracyjnych [20-22].

Nowe leki małowcząsteczkowe ukierunkowane na interesujący enzym lub receptor, są opracowywane przy użyciu dobrze ugruntowanych procedur [23]. Ponadto, kolejne związki o potencjale terapeutycznym, są tworzone poprzez generowanie nowych pochodnych znanych już związków, a następnie spośród nich dokonuje się wyboru najbardziej aktywnych i najbardziej specyficznych. Alternatywnie, zupełnie nowe związki ukierunkowane na konkretne białko, mogą też być identyfikowane poprzez wysokoprzepustowe badania przesiewowe, szeroko dostępnych bibliotek chemicznych, a następnie stosuje się ten sam proces generowania pochodnych i ich selekcji [24].

Pomimo postępu, jaki dokonał się w dziedzinie leczenia nowotworów, liczne ograniczenia pozostają wciąż wyzwaniem, a do ważniejszych z nich należą [25, 26]:

1. oporność na leki, główne wyzwanie zarówno dla tradycyjnej chemioterapii, jak i nowszych terapii celowanych,
2. identyfikacja odpowiednich celów molekularnych dla rozwoju terapii celowanych,

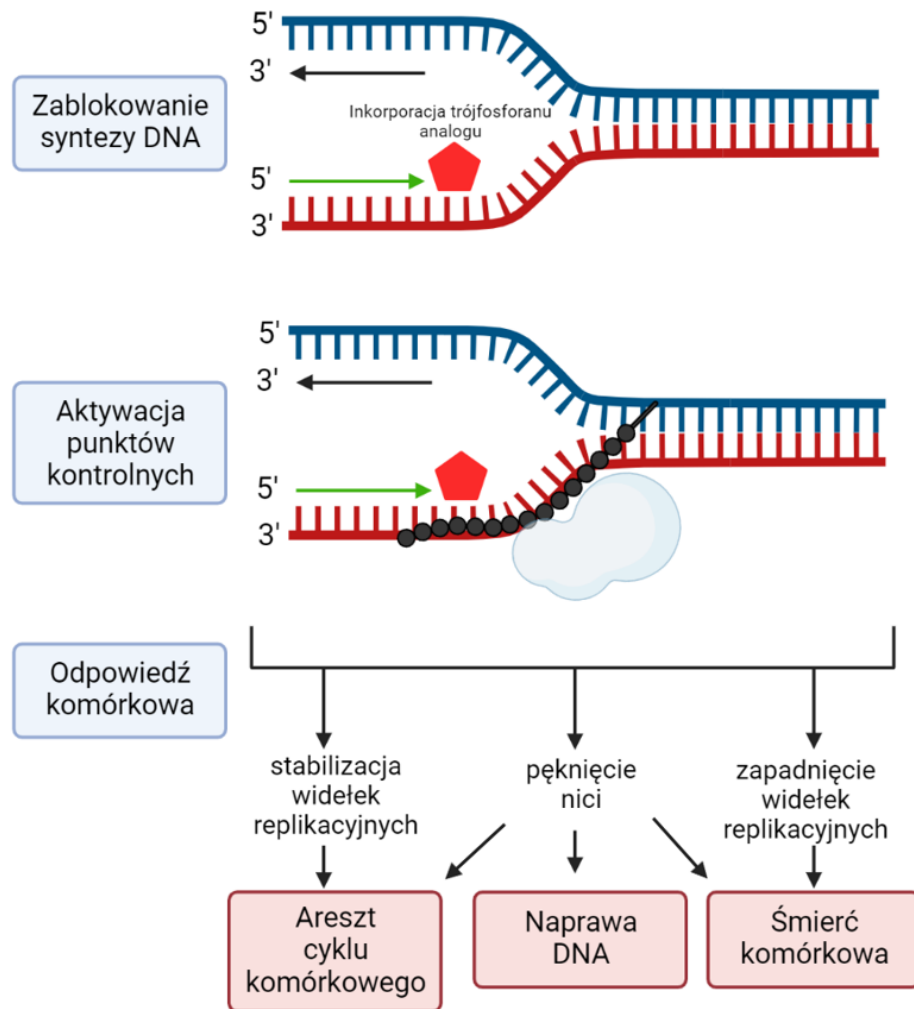
3. projektowanie i opracowywanie leków lub nośników, które skutecznie rozpoznają te cele,
4. uszkodzenia DNA komórek nowotworowych, co prowadzi do powstawania kolejnych mutacji genowych,
5. opracowanie metod leczenia, w celu złagodzenia skutków ubocznych wszystkich rodzajów terapii przeciwnowotworowych.

Leki przeciwnowotworowe posiadają wszechstronny mechanizm działania w zależności od ich miejsca docelowego lub niecelowanego. Nowe metody leczenia mogą zapoczątkować rewolucję w dziedzinie onkologii klinicznej, opartą głównie na indywidualnym podejściu do każdego pacjenta.

### ***1.1.3. Antymetabolity- historia badań***

Po II wojnie światowej opracowano nowe metody terapeutyczne w leczeniu nowotworów, oparte o wykorzystanie cząsteczek naśladujących strukturę fizjologicznych metabolitów, tzw. *antymetabolity*, blokując w ten sposób łańcuchy enzymatyczne niezbędne do syntezy naturalnie występujących puryn i pirymidyn, co skutkuje zahamowaniem proliferacji komórek [6]. Do głównych antymetabolitów należą analogi folianów (aminopteryna i metotreksat), puryn (merkaptopuryna) i pirymidyn (fluorouracyl, gemcitabina, kapecytabina [6, 27, 28]. Antymetabolity wykazują dwa sposoby działania: hamowanie kluczowych enzymów biorących udział w syntezie kwasu nukleinowego oraz wbudowywanie się do DNA i RNA w celu przerwania nici lub przedwczesnego zakończenia łańcucha (**Schemat 5**). Zazwyczaj działają na fazę S cyklu komórkowego, a ich skuteczność cytotoxyczna jest na ogół większa, gdy są one podawane przez dłuższy okres czasu, posiadają odmienne mechanizmy działania, farmakokinetykę i wywołują różnego typu działania niepożądane [28, 29].





**Schemat 5:** Model odpowiedzi molekularnej i komórkowej, na inkorporację analogów nukleozydów, co prowadzi do zahamowania rozwoju widełek replikacyjnych. W zależności od stopnia uszkodzenia i odpowiedzi molekularnej, dochodzi do ustabilizowania widełek, przzerwania nici lub ich uszkodzenia poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego, zainicjowanie naprawy DNA lub śmierć komórki. Schemat powstał na podstawie publikacji [29], w programie BioRender.com.

W praktyce klinicznej stosuje się obecnie dwie antypuryny: merkaptopurynę (6-merkaptopuryna) i tioguaninę (6-tioguanina). Oba leki łatwo wnikają do komórki i są metabolizowane wewnątrzkomórkowo do aktywnych form, które hamują syntezę puryn *de novo* i są nieprawidłowo wbudowywane do DNA. Inne antymetabolity nowej generacji powszechnie stosowane to trimetrexat, pralatreksat, raltitrexed, czy lometrexol [26].

Pierwszą badaną klasą antymetabolitów były antyfoliany, co zapoczątkował Sidney Farber- pionier współczesnej chemioterapii [1]. W latach czterdziestych ubiegłego wieku zajmował się badaniem aminopteryny, antymetabolitu kwasu foliowego o działaniu

cytostatycznym. Jako pierwszy uzyskał remisję ostrej białaczki limfoblastycznej dzięki zastosowaniu wyżej wymienionego specyfiku u chorych dzieci. Dziesięć lat po odkryciach Farber'a wykazano, że antyfoliany specyficznym hamują reduktazę dihydrofolianową (DHFR). Enzym ten katalizuje reakcję powstawania tetrahydrofolianu, który jest kluczowym kofaktorem podczas biosyntezy aminokwasów, puryn i pirymidyn [30]. W szczególności, metotreksat trwale wiązał DHFR, prowadząc do zahamowania syntezy tymidylanu i syntezy puryny, a następnie do indukcji apoptozy [31]. Ten mechanizm działania okazał się być bardzo skutecznym w ograniczaniu wzrostu guzów litych, w tym raka piersi, jajnika, głowy i szyi oraz pęcherza moczowego [31, 32].

Na początku lat 50. zsyntetyzowano kolejne antymetabolity i wiele z nich jest stosowanych do dziś. Należą do nich 6-merkaptopuryna i 5-fluorouracyl (5-FU), analogi odpowiednio puryn i pirymidyn, szeroko stosowane w praktyce klinicznej w leczeniu zarówno nowotworów hematologicznych [33], jak i litych nowotworów [34, 35]. Są również stosowane jako środki immunosupresyjne i immunomodulacyjne w leczeniu chorób autoimmunologicznych (choroba Crohna, autoimmunologiczne zapalenie wątroby, toczniowe zapalenie nerek). W 1954 r., Skipper i Hitchings [36] badali analogi puryn, między innymi, 6-merkaptopurynę, która zaburza syntezę pochodnych nukleotydowych hipoksantyny oraz guaniny [37, 38]. Wykazano, że 6-merkaptopuryna hamuje kilka reakcji enzymatycznych, w tym tworzenie adenozyno-5'-monofosforanu (AMP), który jest niezbędny do syntezy DNA i RNA. Związek ten jest szczególnie skuteczny u pacjentów z ostrą białaczką limfocytową (ALL) i ostrą białaczką szpikową (AML). W 1957 roku Charles Heidelberger zsyntetyzował 5-FU, który zrewolucjonizował leczenie nowotworów przewodu pokarmowego, ze szczególnym uwzględnieniem raka jelita grubego [6].

Terapie przeciwnowotworowe stale ewoluują, a od drugiego okresu powojennego do nadejścia nowego tysiąclecia, nastąpił wzrost liczby leków i terapii dostępnych w leczeniu wszystkich nowotworów hematologicznych i litych, które przyczyniły się do znacznego obniżenia wskaźników umieralności na nowotwory [6].

#### ***1.1.4. Analogi nukleozydów purynowych i pirymidynowych stosowane w leczeniu nowotworów***

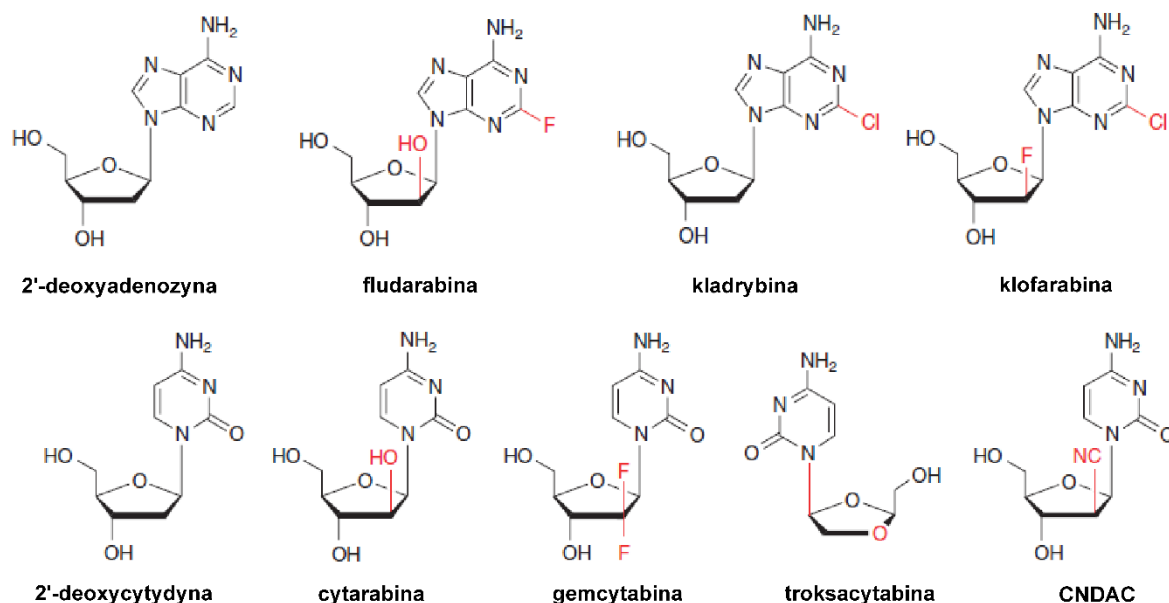
Pomimo obiecujących postępów w poszukiwaniu nowych środków chemioterapeutycznych, nadal istnieje pilna potrzeba opracowania bardziej skutecznych i mniej toksycznych leków. Nukleozydy i odpowiadające im zasady są podstawowymi elementami składowymi wielu systemów biologicznych i w związku z tym były intensywnie

badane ze względu na ich nieodłączne strukturalne podobieństwo do naturalnie występujących [39]. Ze względu na powiązanie pomiędzy metabolizmem nukleotydów purynowych i pirymidynowych, proliferacją komórek i różnicowaniem komórek nowotworowych, hamowanie kluczowych enzymów w metabolizmie nukleotydów i syntezie DNA, może być stosowane jako metoda chemioterapeutyczna w leczeniu nowotworów. Analogi nukleozydów zakłócają lub konkurują z trójfosforanami nukleozydów w syntezie kwasów nukleinowych. Wiele z tych związków włączanych jest do DNA przez polimerazy podczas normalnej syntezy DNA (**Schemat 5**), co może blokować dalsze wydłużenie łańcucha i powoduje przeciąganie widełek replikacyjnych. Mechanizmy te doprowadzają do aktywacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego i procesów naprawy DNA, co może przyczyniać się do lekooporności [29].

Większość analogów puryn (**Schemat 6**) o działaniu antyneoplastycznym, stosowanych jest prawie wyłącznie w leczeniu nowotworów złośliwych, zwykle białaczek i chłoniaków. Fludarabina jest najczęściej stosowana i jest lekiem pierwszego wyboru w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej [40]. Ze względu na swoje działanie immunosupresyjne fludarabina jest również stosowana w leczeniu wirusowego zapalenia wątroby typu B. Kladrybina i pentostatyna są pochodnymi adenozyiny i są stosowane głównie w białaczce włochatokomórkowej. Klofarabina jest również pochodną adenozyiny i jest wybierana w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej, głównie u dzieci, u których zawiodły wcześniejsze terapie. Nelarabina jest pochodną guaniny i jest stosowana w leczeniu białaczki i chłoniaka limfoblastycznego, zwykle po niepowodzeniu wcześniejszych terapii [28, 29].

Istnieją trzy podgrupy antymetabolitów nukleozydów purynowych i pirymidynowych, które indukują różnicowanie się komórek nowotworowych [39]:

- 1.1. inhibitory syntezy DNA,
- 1.2. nukleozydy zaburzające wzorce metylacji,
- 1.3. związki, które zaburzają syntezę *de novo* prekursorów kwasów nukleinowych.



**Schemat 6:** Przykłady analogów nukleozydów purynowych. Wzory pochodzą z publikacji [29].

\*\*\*

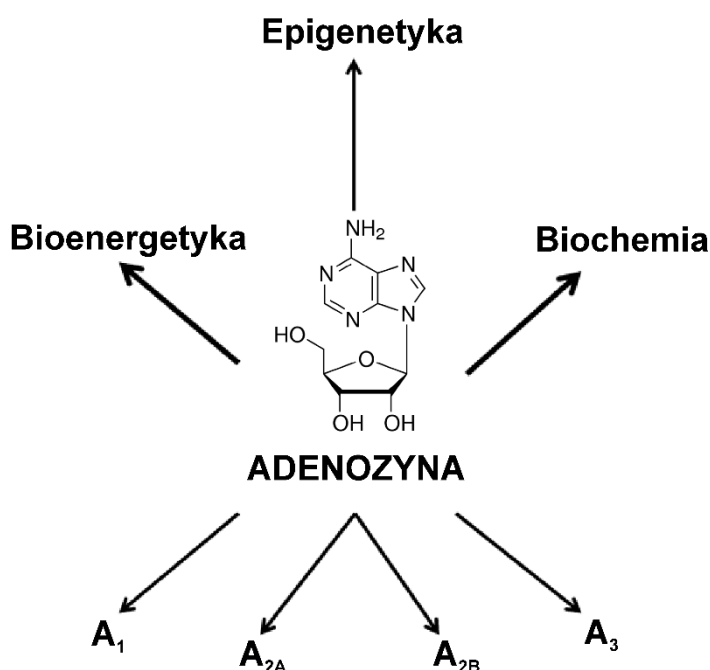
*Rybozyd kinetyny, będący pochodną adenozy, a którego właściwości komórkowe są tematem niniejszej rozprawy doktorskiej, należy do ostatniej wskazanej podgrupy antymetabolitów. Jego właściwości i wpływ na metabolizm nukleozydów purynowych zostanie opisany szczegółowo poniżej.*

#### 1.1.5. Adenozy- jej rola w organizmie i terapiach nowotworowych

W ostatnich latach, wiele badań wykazało, że adenozy jest skuteczna w leczeniu nowotworów, a co ważniejsze, niektóre jej analogi zostały również z powodzeniem wprowadzone do terapii przeciwnowotworowych [41]. Adenozy to endogenny nukleozyd purynowy, składający się z reszty adeniny i rybozy, połączonych wiązaniem  $\beta$ -N<sup>9</sup>-glikozydowym. W organizmie pełni ona kluczowe funkcje, do których przede wszystkim zalicza się uczestnictwo w procesach biochemicznych, w tym udział w transporcie energii (ATP i ADP), ponadto jest ona nośnikiem informacji genetycznej (element budulcowy kwasów nukleonowych), neuroprzekaznikiem oraz uczestniczy w reakcjach metylacji jako S-adenozylometionina (**Schemat 7**) [42].

Adenozy wywołuje szereg odpowiedzi fizjologicznych w tkankach ssaków poprzez interakcję z receptorami adenozy (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>2B</sub> i A<sub>3</sub>) zlokalizowanymi na powierzchni komórek (**Schemat 7**) [43]. Duże zainteresowanie metabolizmem adenozy pojawiło się po odkryciu, iż sygnały przekazywane przez receptory adenozynowe, biorą udział w ochronie

komórek i tkanek poddawanych stresowi niedokrwiennemu [44]. W normalnych warunkach tlenowych, tempo katabolizmu i anabolizmu ATP są równe, co pozwala na utrzymanie stabilnego stężenia w cytozolu, zarówno ATP jak i ADP (odpowiednio 5-10 mM i 40-60 mM w sercu) [45, 46]. W warunkach stresu tkankowego lub urazu, takich jak niedokrwienie lub niedotlenienie, dopływ tlenu jest niewystarczający do fosforylacji oksydacyjnej ADP w celu regeneracji ATP, a stosunek ATP/ADP jest zaburzony [47]. Rosnące stężenie ADP prowadzi do zwiększenia aktywności kinazy adenylationowej (tj.  $2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ) w kierunku tworzenia AMP, aby utrzymać stabilny stosunek ADP/AMP [48]. Następuje późniejszy wzrost netto stężenia AMP [47], który z kolei jest hydrolizowany do adenozyiny.



**Schemat 7:** Adenozyina jako regulator homeostazy działający poprzez wiele szlaków zależnych i niezależnych od receptorów adenozyinowych. Rysunek pochodzi z publikacji [51].

Ze względu na zwiększone stężenie w cytozolu, adenozyina jest uwalniana do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie może wiązać się z receptorami adenozyinowymi. Ponieważ adenozyina inicjuje kaskady sygnalizacyjne, które mogą wywoływać poważne skutki, jej stężenie w komórce musi być ściśle regulowane. Stężenie adenozyiny w cytozolu w warunkach normoksycznych, oscyluje w zakresie 0,01 a 0,1 mM [52-54]. Enzymami odpowiedzialnymi za obniżanie stężenia adenozyiny są kinaza adenozyiny (ADK) i deaminaza adenozyiny (ADA), które katalizują odpowiednio fosforylację i deaminację adenozyiny, w celu wytworzenia odpowiednio AMP i inozyny [43], co zostanie opisane w dalszej części niniejszej rozprawy doktorskiej.

Receptory adenozyiny (RA) należą do bardzo zróżnicowanej grupy tzw. receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR) odpowiedzialnych za przekazywanie sygnałów do wnętrza komórki. W celu przekazywania informacji, angażują one zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe, takie jak hormony, przekaźniki neuronalne, białka, peptydy, aminy, lipidy, nukleotydy czy pochodne aminokwasów i kwasów tłuszczowych [55].

Obecnie, prace badawcze koncentrują się na selektywnym ukierunkowaniu szlaków metabolicznych, które mogą być zmienione w procesie nowotworzenia, ze szczególnym uwzględnieniem zaburzonej homeostazy energetycznej [56] oraz zewnątrzkomórkową sygnalizacją *purynergiczną* [44, 57, 58]. Rola zewnątrzkomórkowej adenozyiny (eADO) w biologii nowotworów została również dobrze poznana, między innymi pod kątem znalezienia związku między stanem zapalnym, niedotlenieniem a adenozyiną. Wykazano między innymi, że metabolizm i sygnalizacja adenozyiny sterowane przez HIF (czynnik indukowany hipoksją, ang. hypoxia-inducible factor 1), są niezbędne do zapewnienia ochrony tkanek podczas stanów zapalnych, w tym urazu mięśnia sercowego, nieswoistego zapalenia jelit i ostrego uszkodzenia płuc [59]. Ponadto, wykazano, że głównym mechanizmem immunosupresyjnym jest szlak *adenozynergiczny*, który obecnie stanowi atrakcyjny cel w terapii przeciwnowotworowej. Aktywacja tego szlaku zachodzi w hipoksyjnym mikrośrodowisku guza, gdzie zewnątrzkomórkowa adenozyina wywiera lokalną supresję poprzez działanie na mechanizmy wewnątrzkomórkowe. Badania przedkliniczne antagonistów receptora adenozyinowego i przeciwciał, wykazały korzystną przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną, sugerując potencjalny mechanizm działania [58]. W związku z tym, szlak adenozyiny jest obecnie postrzegany jako istotna bariera dla skuteczności terapii immunologicznych i staje się ważnym celem terapeutycznym w chorobach nowotworowych.

Adenozyina jest kluczowym regulatorem metabolizmu i punktów kontrolnych systemu immunologicznego, zaangażowanych w „ucieczkę” nowotworu przed układem odpornościowym gospodarza [42]. Nadal jednak, rozwój skutecznych terapii opartych na adenozyinie, jest utrudniony ze względu na brak wiedzy na temat takich aspektów jak: uwzględnienie mniej kluczowych szlaków kontrolujących poziom ATP i adenozyiny, brak rozróżnienia między działaniem zależnym i niezależnym od receptora adenozyiny, czy też skupienie się jedynie na zewnątrzkomórkowej adenozyinie, bez uwzględnienia jej wewnątrzkomórkowego metabolizmu (**Schemat 8**) [44]. Ponadto wymagana jest też szersza ocena całego *purynomu*, czyli kompleksu składającego się z tysięcy białek, biorącego udział w utrzymaniu homeostazy komórkowej, a także zaangażowanego w odpowiedź komórkową. Poznanie mechanizmów łączących, niektóre części tej złożonej sieci oraz fizjologicznego

znaczenia różnych połączeń jest bardzo skomplikowane, natomiast zrozumienie innych części purynomu obejmujących transport adenozyiny i innych nukleozydów jest nadal mniej poznane [60]. Transportery nukleozydowe są integralnymi białkami błonowymi, które odpowiadają za przepływ nukleozydów, takich jak adenozyina, oraz analogów nukleozydów, stosowanych w wielu terapiach przeciwnowotworowych, przeciwwirusowych i przeciw pasożytniczych przez błony komórkowe [60]. Transport ten może odbywać się zależnie od jonów  $\text{Na}^+$  lub biernie za pomocą nośnika (ang. sodium-independent equilibrative nucleoside transport). Dotychczas zidentyfikowano cztery transportery należące do systemu  $\text{Na}^+$ -niezależnego: ENT1, ENT2, ENT3 oraz ENT4 (równowagowe transportery nukleozydów, ang. equilibrative nucleoside transporters) [55] (**Schemat 8**).

Purynom, który tworzą różnego rodzaju receptory, ligandy, kofaktory, kanały i transportery, może stanowić bogate źródło potencjalnych leków i celów terapeutycznych dla leczenia różnych chorób człowieka [61, 62]. Analogi nukleozydów purynowych (PNA) i zasady azotowe, np. fludarabina, kladrybina (2-chloro-2'-deoksyadenozyna, 2-CdA), czy szereg pochodnych, powstałych w wyniku podstawienia w pozycji  $\text{N}^6$ , będących naturalnymi cytokinami, były jedną z pierwszych grup cytostatyków stosowanych w onkologii i są do dziś ważnym elementem terapii przeciwnowotworowych. Dotychczas jednak, mechanizm działania tych leków nie został dokładnie poznany, a ich działanie opiera się jedynie na hipotezach związanych z zahamowaniem syntezy deoksynukleotydów podstawowych, w procesie replikacji i naprawy DNA. Następnie, przyczynia się to do uruchomienia kaskady reakcji obejmujących aktywację endonukleaz, powstawanie dwuniciowych pęknięć DNA, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy związanej z mitochondriami, aktywowanej przez białko p53 oraz białka z rodziny BCl-2 [55].

Obecna wiedza na temat roli adenozyiny i jej analogów w aktywności przeciwnowotworowej stwarza unikalną szansę na przyspieszenie rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych. Choć niektóre analogi adenozyiny są już dostępne klinicznie jako leki przeciwnowotworowe, zachęcające byłoby zbadanie ich jeszcze większej liczby lub rozszerzenie zakresu działania tych, które są obecnie zatwierdzone.

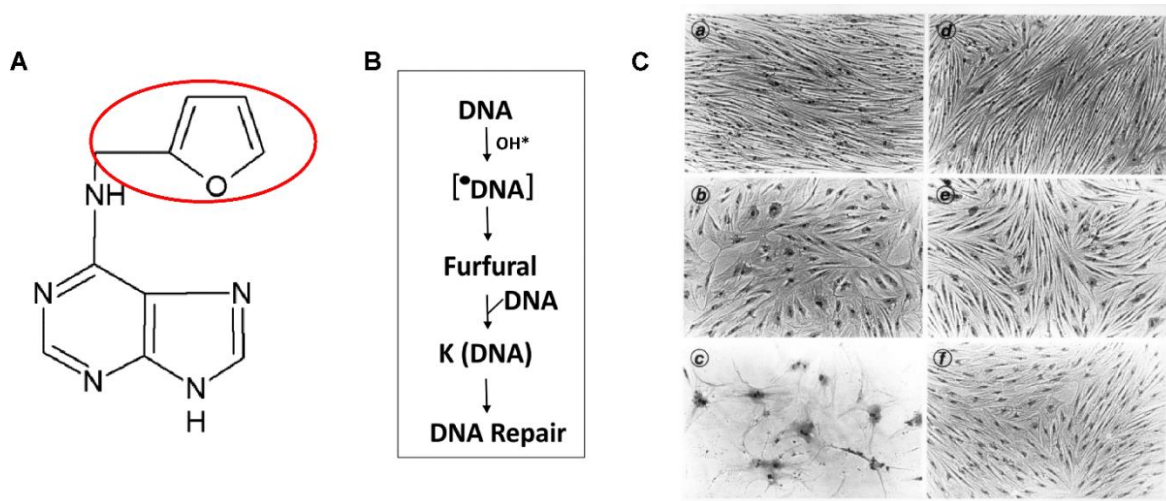




modulację całych szlaków metabolicznych (takich jak fosforylacja oksydacyjna), aktywację stresu oksydacyjnego i wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) [4, 5].

Hormony roślinne- *cytokininy*, mogą mieć różne zastosowania terapeutyczne w medycynie człowieka, a wśród nich znalazły się takie, które wykazują obiecującą aktywność przeciwnowotworową. Cytokininy są pochodnymi zasady purynowej adeniny, podstawionymi w pozycji N<sup>6</sup>, izoprenoidem, albo aromatycznym łańcuchem bocznym [63]. Stanowią one główną grupę hormonów roślinnych, które stymulują takie procesy jak wzrost i podziały komórkowe, transport aktywny przez błony, regenerację tkanek, a także opóźniają procesy starzenia się komórek [63-65].

Pierwszą z odkrytych cytokinin była N<sup>6</sup>-furfuryloadenina (kinetyna), wykazująca właściwości proliferacyjne wobec ludzkich komórek fibroblastów, będąca silnym antyoksydantem, stanowiąca ważny komponent w odpowiedzi na stres oksydacyjny (**Schemat 9**) [66, 67]. Kinetyna powstaje podczas przetwarzania DNA poprzez eliminację wody i przegrupowanie 2-dezoksyrybozy związanej z kwasem nukleinowym, co prowadzi do N<sup>6</sup>-alkilacji adeniny przez alkohol furfurylowy [68]. Wykazano również, że zarówno kinetyna jak i jej rybozyd są toksyczne względem komórek czerniaka [64, 69].



**Schemat 9:** (A) Struktura N<sup>6</sup>-furfuryloadeniny (kinetyny), (B) będącej produktem oksydacyjnych uszkodzeń DNA. (C) Efekt przeciwstarzeniowy kinetyny na przykładzie ludzkich fibroblastów (zdjęcie pochodzi z publikacji [70] (a-c: komórki bez kinetyny; d-f: komórki hodowane w obecności kinetyny).

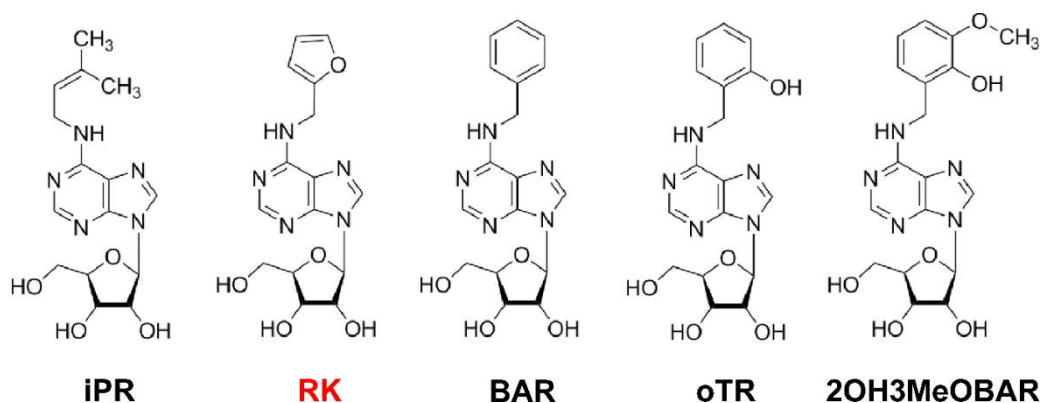
Naturalnie występujące rybozydy cytokininowe (**Schemat 10**), a wśród nich N<sup>6</sup>-izopentenyladenozyna (iPR), rybozyd kinetyny (RK) i N<sup>6</sup>-benzyloadenozyna (BAR), wykazują silne działanie cytotoksyczne wobec szeregu ludzkich linii komórkowych pochodzących zarówno z nowotworów hematologicznych, jak i guzów litych. Liczne badania

wykazały, że rybozydy są aktywne w zakresie stężeń submikromolarnych (przeciwko niektórym białaczkom) lub mikromolarnych [63]. Z kolei, w przypadku rybozydu trans-zeatyny (tZR), innej naturalnej cytokininy, która różni się od iPR hydroksylacją łańcucha bocznego izoprenoidu, a także jest najczęściej występującą cytokinią, wykazano, że jej toksyczność jest bardzo ograniczona [71, 72]. Ponadto, na podstawie analizy mikromacierzowej dotyczącej wpływu iPR (100  $\mu$ M) na linie komórkowe MCF-7 (nowotwór piersi) i A549 (nowotwór płuca), wykazano, że rybozyd ten indukuje geny zaangażowane w zatrzymanie cyklu komórkowego, [69].

W przypadku rybozydu orto-topoliny (oTR) udowodniono, że zakłóca on aktywację krytycznych komponentów szlaków sygnałowych MAPK (kinaza aktywowana mitogenami, ang. mitogen-activated protein kinase) i Akt (kinaza białkowa B, ang. protein kinase B) i indukuje wysoki poziom apoptozy poprzez wewnętrzny szlak śmierci komórkowej, w którym pośredniczą mitochondria [73], a także poprzez aktywację stresu siateczki śródplazmatycznej [74].

Oprócz powyższych przykładów, przeprowadzono także analizę *in vivo* aktywności przeciwnowotworowej rybozydów iPR, RK i BAR, między innymi wykorzystując ksenografty zwierzęce. [75-77]. iPR i BAR wykazały również obiecujące działanie przeciwko różnym nowotworom w ograniczonej liczbie badań klinicznych [78].

Voller i wsp. [63] wykazali, że N<sup>6</sup> podstawione pochodne adenozyliny wykazują aktywność przeciwnowotworową zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, opierając swoje wnioski o systematyczną analizę zależności pomiędzy strukturą chemiczną cytokinin, a ich działaniem cytotoksycznym wobec panelu ludzkich linii komórkowych nowotworów o różnym pochodzeniu histopatologicznym. Ponadto jako pierwsi pokazali, że hydroksylowane cytokininy aromatyczne (rybozyd orto-, meta-, para-topoliny) oraz rybozyd cis-zeatyny, wykazują aktywność cytotoksyczną.



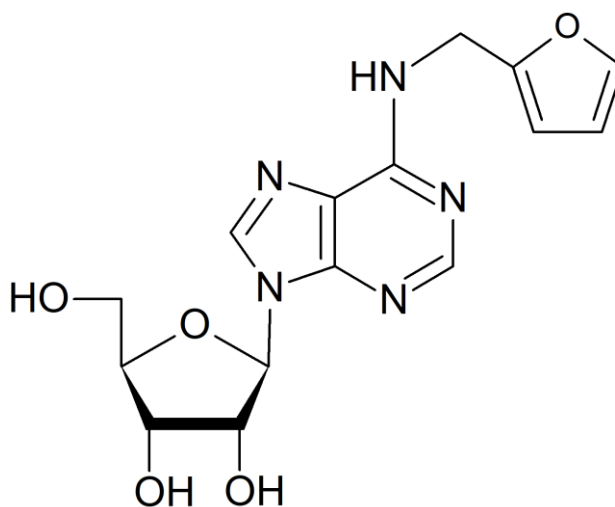
**Schemat 10:** Struktury naturalnych rybozydów cytokininowych o aktywności przeciwnowotworowej. Rysunek pochodzi z publikacji [79].

Mikromolarne stężenia zarówno rybozydów cytokinin, jak i samych zasad mogą również indukować śmierć komórki w kulturach komórek roślinnych, z pewnymi cechami typowymi dla apoptozy (aktywacja białek podobnych do kaspaz i fragmentacja DNA) [65, 80]. Śmierć komórki poprzedzona jest gwałtownym spadkiem poziomu ATP i wytworzeniem reaktywnych form tlenu. W przeciwieństwie do ich aktywności hormonalnej, która wymaga interakcji ze specyficznymi receptorami związanymi z błoną, wewnątrzkomórkowa konwersja cytokinin do monofosforanów jest konieczna, aby nabyły one właściwości cytotoksycznych [79].

Powyższe właściwości cytokinin, a także ich zdolność do indukowania apoptozy lub blokowania cyklu komórkowego, w wielu typach komórek nowotworowych, sprawia, że są one potencjalnymi kandydatami na leki stosowane w terapiach przeciwnowotworowych. Prowadzi to do rozwoju innowacyjnych związków i odkrycia wielu mechanizmów działania, a przyszłe badania mogłyby również pomóc określić, które związki z tej serii byłyby bezpieczniejsze i bardziej selektywne.

#### 1.1.7. *Rybozyd kinetyny*

N<sup>6</sup>-furfuryloadenozyna (rybozyd kinetyny, RK; **Schemat 11**), która stanowi przedmiot moich badań, selektywnie inhibuje proliferację komórek nowotworowych oraz indukuje ich apoptozę poprzez aktywację szlaku wewnątrzpo pochodnego, bezpośrednio związanego z mitochondriami. Wykazano, że rybozyd kinetyny jest w stanie zakłócić balans energetyczny w komórkach [68, 81], a efekt ten wydaje się selektywny w kontekście komórek nowotworowych i nienowotworowych [82].



**Schemat 11:** Rybozyd kinetyny. Struktura powstała w programie ACD/ChemSketch (2017) Freeware.

Moje badania pokazały, że rybozyd kinetyny jest związkiem, który w komórkach eukariotycznych wykazuje złożone działanie. Przede wszystkim jego cytotoksyczność jest związana z zaburzeniem funkcji mitochondrialnych, a z drugiej strony interesująca jest jego natura chemiczna i przemiany metaboliczne, którym ulega w komórce.

RK jest przedstawicielem dużej grupy analogów rybonukleozydów, do której należą m.in. dobrze poznane i stosowane już w badaniach klinicznych: czynnik mimetyczny AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranozyd) oraz 8-chloroadenozyna [83-85]. Choć oba te związki są pochodnymi puryn, każdy z nich może mieć unikalny mechanizm działania w komórkach nowotworowych.

RK to naturalnie występująca pochodna adenozyny, która została zidentyfikowana w białym młodych owoców kokosa [82] i podobnie jak kinetyna, powstaje w reakcji *in vivo* między rodnikiem hydroksylowym a DNA [86, 87]. Dotychczas wykazano, że RK hamuje aktywność genu CCND2 (ang. G1/S-specific cyclin-D2), co skutkuje obniżeniem ekspresji cykliny D1 i D2 białek zaangażowanych w zatrzymanie cyklu komórkowego, indukcję apoptozy i podobnie jak w przypadku izopentenyloadenozyny i N<sup>6</sup>-benzyloadenozyny, hamuje proliferację i indukuje apoptozę w ludzkich komórkach białaczki szpikowej [68, 77].

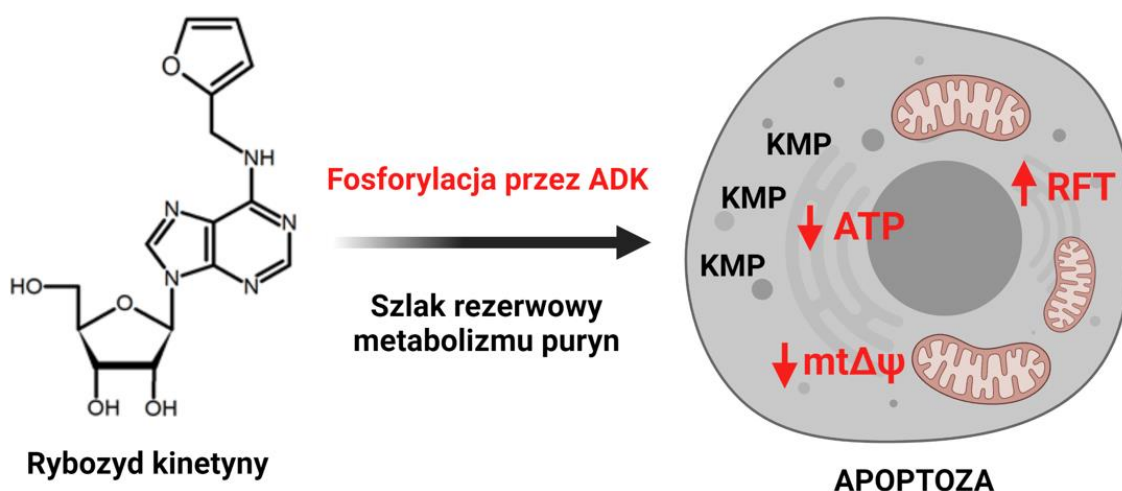
Cabello i wsp. [68], potwierdzili, że rezultaty uzyskane w wyniku badań prowadzonych z wykorzystaniem komórek nowotworu trzustki MiaPaCa-2, czerniaka A375 oraz innych ludzkich linii komórek nowotworowych, wskazują na masowe wyczerpywanie poziomu ATP i indukcję stresu genotoksycznego. Procesy te następują gwałtownie w odpowiedzi na ekspozycję RK i związane jest ze wzrostem ekspresji genów HMOX1 (oksygenaza hemu, ang. heme oxygenase 1 gene), CDKN1A (inhibitor kinaz cyklinozależnych 1A; ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) oraz uszkodzeniem DNA. Dane te sugerują, że wczesna indukcja genotoksyczności i wpływ na bioenergetykę komórek nowotworowych, są czynnikami sprawczymi, związanymi z cytotoksycznością RK i jego aktywnością przeciwnowotworową.

RK i kilka innych pochodnych puryn mogą wykazywać unikalny mechanizm działania, który negatywnie wpływa na równowagę metaboliczną komórek. RK może wywoływać zaburzenia równowagi energetycznej poprzez fosforylację przez kinazę adenozyny (ADK), pierwszy enzym szlaku rezerwowego metabolizmu puryn, co ułatwia toksyczność RK i prowadzi do kumulacji mono-, dwu- i trójfosforanów [88]. Niektóre z analogów puryn takie jak 8-chloroadenozyna i 2-chlorodeoksyadenozyna przyniosły już pozytywne wyniki w badaniach klinicznych [89, 90]. Podobnie, RK jest wykorzystywany jako jedna z alternatywnych metod leczenia przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL), do

których należy nowa generacja pochodnych purynowych [91], a także jest proponowany jako silny inhibitor przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) w ludzkich komórkach nowotworowych prostaty [86], co ma związek z progresją i inwazyjnością nowotworu. Ponadto, w odniesieniu do aktualnych wydarzeń związanych z pandemią wirusa SARS-COV-2, RK jest uważany za obiecującego kandydata jako agonistę receptora ACE2 (ang. angiotensin-converting enzyme 2) [92].

W jednej z naszych prac rozszerzyliśmy obserwacje dotyczące aktywności przeciwnowotworowej RK i wykazaliśmy, że w przypadku komórek raka wątrobowokomórkowego, wykazuje on aktywność proapoptotyczną, co jest bezpośrednią konsekwencją upośledzenia funkcji mitochondriów, wyczerpania puli ATP i zaburzeń oksydacyjnych [93]. Ponadto, Choi i wsp. [94] wykazali, że RK w komórkach HeLa doprowadza do wzrostu ekspresji genów Bad i Bak oraz spadku ekspresji genu Bcl-2, co prowadzić może bezpośrednio do uwolnienia cytochromu z mitochondriów oraz aktywację kaspazy-3. Wreszcie, wykazano skuteczność RK w modelu czerniaka indukowanego *in vivo*, sugerując, że związek ten selektywnie wyzwała śmierć komórek nowotworowych poprzez indukowanie klasycznego szlaku apoptotycznego i hamowanie proliferacji komórek czerniaka *in vitro* i *in vivo*. W świetle tych wyników, rybozyd kinetyny może być uważany za potencjalnego kandydata w leczeniu nowotworów.

Dotychczas mechanizm działania rybozydu kinetyny w komórkach nowotworowych nie był znany, a jeden z głównych proponowanych dotyczył konwersji pochodnych adenozyiny przez kinazę adenozyiny (ADK), co związane jest z toksycznością RK (**Schemat 12**). ADK jako jeden z najpowszechniej występujących enzymów należących do kinaz nukleozydowych, jest pierwszym enzymem alternatywnego szlaku syntezy adenozyiny, a także wykazuje szeroką specyficzność substratową.



**Schemat 12:** Jeden z proponowanych mechanizmów działania pochodnych adenozy. Aktywność i toksyczność rybozydu kinetyny w komórkach nowotworowych zależy od procesu fosforylacji przez kinazę adenozy (ADK).

## 1.2. Wpływ rybozydu kinetyny na metabolizm nukleozydów purynowych

Metabolizm nukleotydu purynowego odgrywa kluczową rolę w fizjologii komórek zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych [95, 96] i opiera się na trzech podstawowych ścieżkach: syntezie *de novo* (ściśle powiązanej z cyklem komórkowym; **Schemat 12**) szlaku *rezerwowym* i *katabolicznym* (**Schemat 13**) [96]. Wszystkie te szlaki są odpowiedzialne za syntezę nukleotydu oraz utrzymanie homeostazy ATP/ADP/adenozy [97]. Stosunek ATP do ADP jest ważnym fizjologicznym parametrem kontrolnym i służy jako kluczowy marker metabolizmu energetycznego i funkcji mitochondrialnych [98].

Zakłócenie tej równowagi prowadzi do rozwoju chorób, a w konsekwencji do śmierci komórki. Nukleotydy purynowe są głównie syntetyzowane z amfibolicznych związków pośrednich (synteza *de novo*) lub przez ponowne wykorzystanie wolnych, istniejących już zasad (*szlak rezerwowy*; ang. salvage synthesis i *szlak kataboliczny*). Reakcja rezerwowa jest głównym źródłem nukleotydu syntezy DNA, RNA oraz kofaktorów enzymów [99]. Puryny, zwłaszcza adenozy, odgrywają kluczową rolę w utrzymywaniu homeostazy i wspomaganie sygnalizacji komórkowej. Są też niezbędne w procesach komórkowych, takich jak transfer genetyczny (DNA), transkrypcja i translacja (RNA), magazynowanie energii (ATP i GTP) oraz sygnalizacja (cykliczny AMP i GMP), a także działają jako kofaktory (NADH, NADPH i koenzym A) w różnych reakcjach biochemicznych [100].

Jak wcześniej wykazano, główny mechanizm działania analogów puryn prowadzi do śmierci komórki i obejmuje wyłącznie fosforylowane metabolity, których aktywność jest zależna od ADK (pierwszego enzymu szlaku rezerwowego puryn) i wymaga wewnątrzkomórkowej akumulacji mono-, dwu- i trójfosforanów [88] (zagadnienie to zostanie przedstawione szerzej w dalszej części tego podrozdziału). Takie podejście lub ukierunkowanie na inny enzym szlaku syntezy puryn (np. reduktazę rybonukleotydową) jest jednak niewystarczające do osiągnięcia pełnego zrozumienia złożoności działania pochodnej w komórkach.

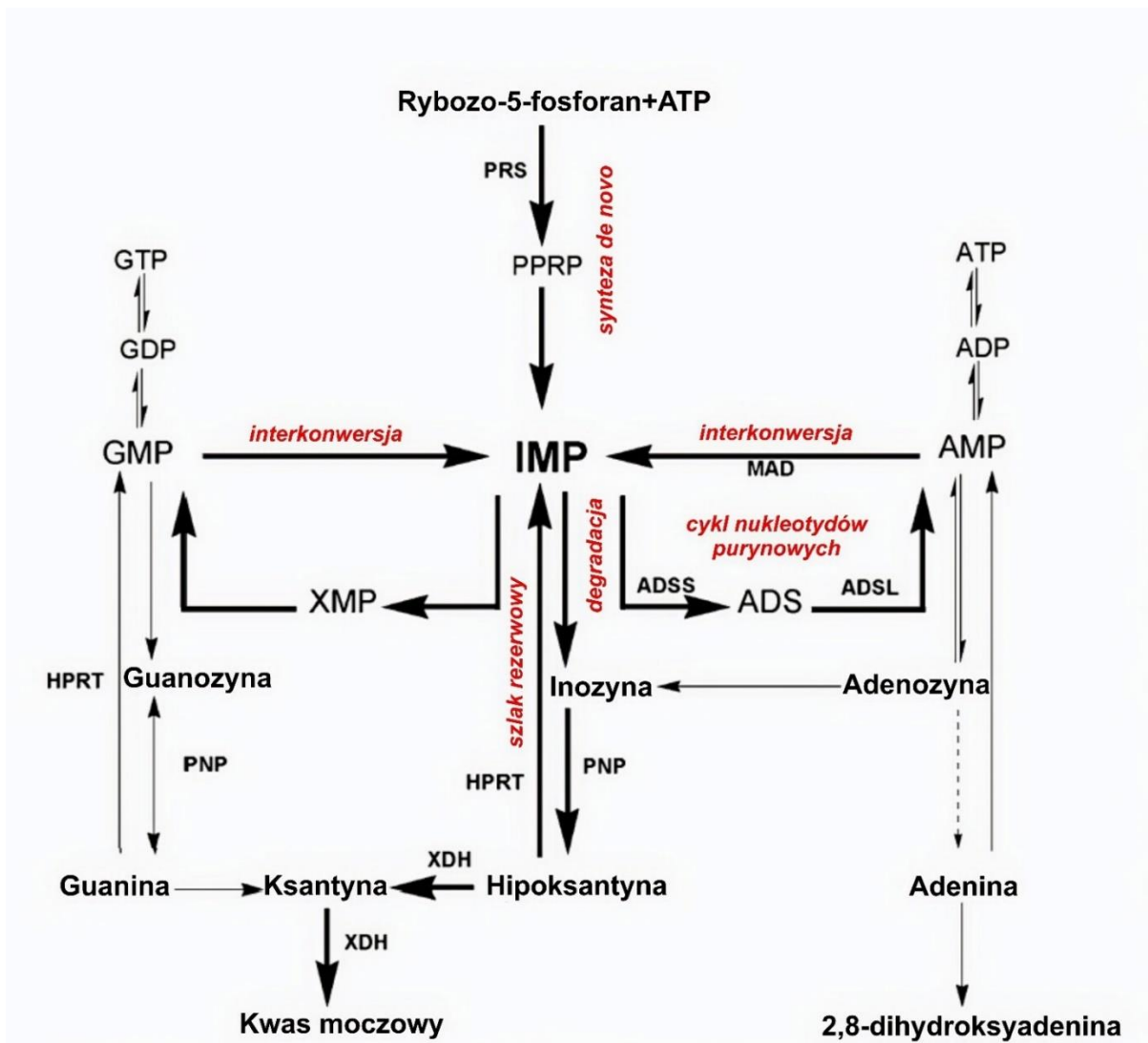
W niniejszej pracy wykażę, że RK jest związkami, który posiada wielowymiarowy efekt działania w komórkach eukariotycznych. Mechanizm działania RK w komórkach nowotworowych nie został dotychczas wyjaśniony i przeanalizowany w tak kompleksowy sposób, skupiający się nie tylko na wpływie RK na śmierć komórek, ale także na procesach enzymatycznych, w których uczestniczy, obejmujących trzy komplementarne szlaki metabolizmu puryn (*de novo*, *salvage* i *kataboliczny*).

Podstawowym pytaniem, na które chciałam uzyskać odpowiedź było to, czy rybozyd kinetyny, jako czynnik zewnętrzny, bierze udział w metabolicznym przepływie puryn (ang. *metabolic flux*) i może być odpowiedzialny za zakłócanie funkcji enzymów zaangażowanych w metabolizm, takich jak polimerazy DNA i RNA, kinazy, reduktaza rybonukleotydowa, deaminaza adenozyne i fosforylaza nukleozydów purynowych.

Takie podejście, rzuca nowe światło na zagadnienie metabolizmu pochodnych purynowych, obejmując dodatkowo akumulację modyfikacji w DNA powodujących zaburzenia metaboliczne i w konsekwencji śmierć komórki.

\*\*\*

*Rybozyd kinetyny stał się dla mnie źródłem poszukiwań nowych pochodnych o bardziej toksycznym działaniu wobec komórek nowotworowych, które byłyby również substratami dla ADK. Ponadto potwierdziłam, że pochodne purynowe, należące do grupy małych związków, mogą być potencjalnie wykorzystane do zwiększenia wrażliwości metabolicznej komórek nowotworowych, ponieważ wpływają na upośledzenie funkcji mitochondriów oraz indukują stres oksydacyjny. Powyższe zagadnienia, zostaną omówione przeze mnie szerzej w dalszej części niniejszej rozprawy doktorskiej.*



**Schemat 13:** Metabolizm puryn obejmujący trzy kluczowe szlaki: tworzenie nukleotydów purynowych monofosforanu inozyny (IMP) z prekursorów niepurynowych (synteza *de novo*) lub zasad purynowych (szlak rezerwowy); reakcje interkonwersji nukleotydów purynowych; degradacja do produktu końcowego - kwasu moczowego (reakcje kataboliczne). Schemat pochodzi z publikacji [101].

### 1.3. Metabolizm nukleozydów purynowych

#### 1.3.1. Regulacja metabolizmu i biosyntezy nukleotydów w komórkach ssaków

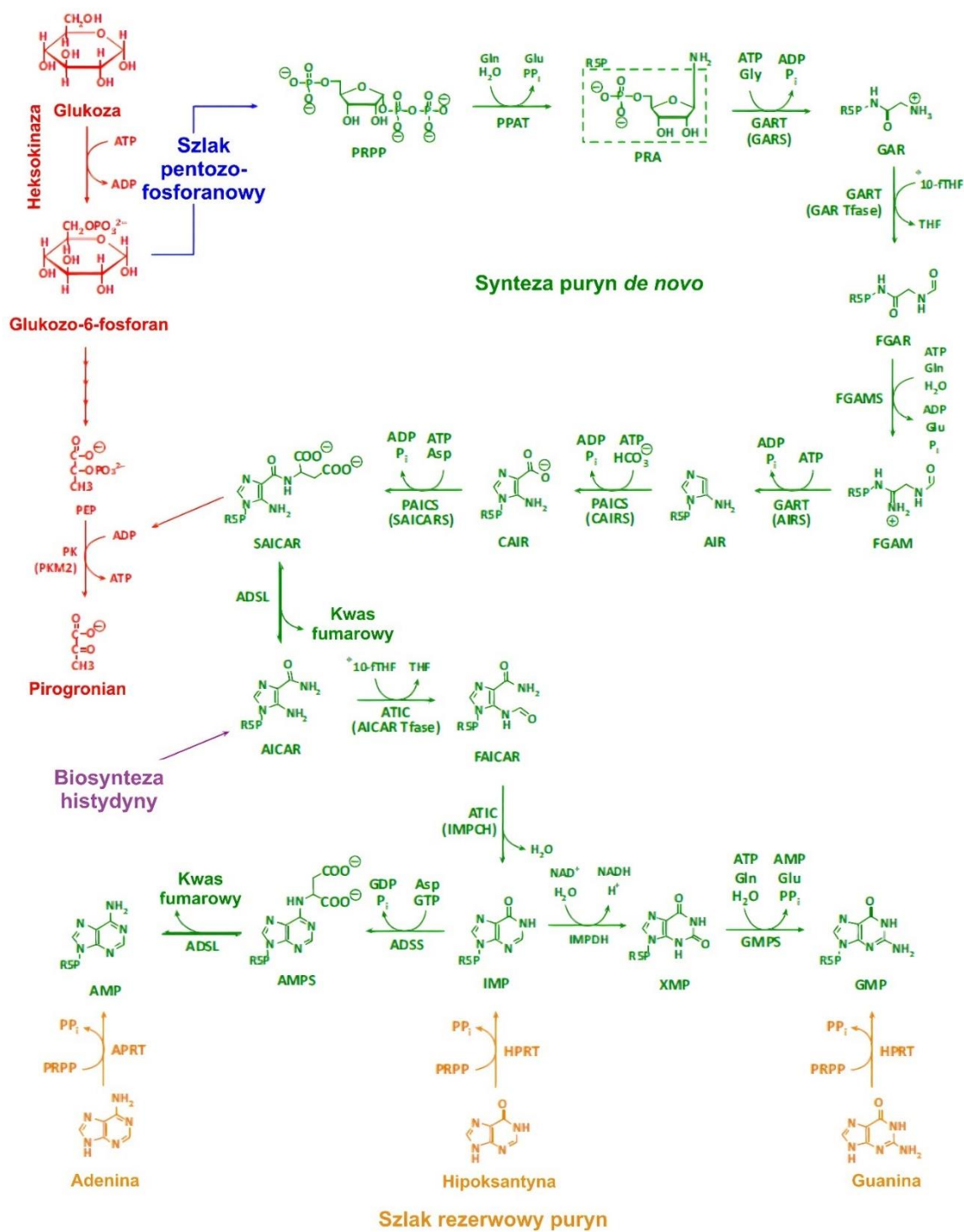
Nukleotydy odgrywają kluczową rolę w wielu różnych procesach biologicznych i są syntetyzowane *de novo* w sposób ciągły we wszystkich komórkach. Kiedy komórki proliferują, zostaje zwiększona synteza nukleotydów, ponieważ są one niezbędne w replikacji DNA oraz w biosyntezie RNA, w celu wsparcia syntezy białek na różnych etapach cyklu komórkowego, co regulowane jest na wielu poziomach [97]. Ponadto, synteza nukleotydów



jest regulowana przez kilka krytycznych czynników transkrypcyjnych, w szczególności MYC (białko protoonkogenu Myc, ang. Myc protooncogene protein) i ścieżkę sygnalizacyjną Rb/E2F (białko supresorowe guza retinoblastoma/siatkówcza (Rb) regulujące czynnik transkrypcyjny E2F, ang. retinoblastoma tumor suppressor protein regulating E2F), które w przypadku mutacji lub nadekspresji są związane z transformacją i niekontrolowaną proliferacją, prowadzącą do powstania nowotworu [97, 102-104]. MYC bezpośrednio reguluje ekspresję genów, które kodują enzymy w szlakach biosyntezy nukleotydów, jak również koordynuje biosyntezę RNA i białek [97]. Oprócz tego, MYC wpływa na ekspresję specyficznych microRNA, które odpowiadają za regulację genów związanych z proliferacją komórek. Tempo wzrostu komórek jest ostatecznie ograniczone przez dostępność składników budulcowych oraz zasoby energii, a biosynteza kwasów nukleinowych, jak każdy złożony proces, wymaga ścisłej koordynacji. Przede wszystkim procesy te wymagają zwiększonej ekspresji genów związanych z syntezą nukleotydów w późnej fazie cyklu komórkowego G<sub>1</sub> [97, 105].

Synteza nukleotydów jest procesem wymagającym dużych nakładów energetycznych, który wykorzystuje wiele szlaków metabolicznych oraz różne źródła węgla i azotu (**Schemat 14**). Aby utrzymać energię i odpowiednią ilość prekursorów do biosyntezy RNA, stężenie ATP w komórkach jest zwykle utrzymywane powyżej 1 mM z wysokim stosunkiem ATP/ADP [97], co zapewnia dostępność wystarczającej ilości wolnej energii do napędzania reakcji. Podobnie, inne rNTPs (rybonukleotydy) są utrzymywane w takich stężeniach, aby aktywować i napędzać procesy anaboliczne, dostarczając jednocześnie materiałów do syntezy kwasów nukleinowych. Tak więc w komórkach zwykle obserwuje się następującą kolejność syntezy nukleotydów w zależności od stężenia: ATP > UTP > GTP > CTP z poziomem CTP utrzymywanym na poziomie ~1 mol/g [97].

Dlatego też, aby mogły powstawać kwasy nukleinowe niezbędne dla proliferacji, komórki muszą regulować zarówno metabolizm energetyczny, jak i szlaki biosyntezy nukleotydów. Progresja cyklu komórkowego jest ściśle regulowana przez liczne czynniki transkrypcyjne i jest związana ze zmianami w objętości, energii i anabolizmie w miarę przechodzenia komórki przez fazę S cyklu komórkowego [106].



**Schemat 14:** Szlaki metabolizmu puryn i ich wzajemne powiązania z innymi procesami metabolicznymi.

Schemat pochodzi z publikacji [100].

### 1.3.2. *Metabolizm nukleozydów purynowych w komórkach nowotworowych*

Komórki prawidłowe ulegają licznym, wysoce regulowanym procesom fizjologicznym, w celu dostarczenia niezbędnych substratów energetycznych. W przypadku komórek nowotworowych jest inaczej, ponieważ są one zaangażowane w złożoną przemianę metaboliczną charakteryzującą się zwiększoną ilością procesów biosyntezy i produkcją energii, w celu podtrzymania wzrostu i proliferacji komórek [56]. Puryny są najliczniej występującymi substratami metabolicznymi we wszystkich żywych organizmach, dostarczającymi niezbędne składniki do budowy DNA i RNA [107].

Tak więc, w komórkach nowotworowych stwierdza się wysokie stężenie metabolitów purynowych, które biorą udział w procesach biologicznych, uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej i interakcji gospodarz-nowotwór [107]. Odkrycie to przyczyniło się do opracowania pierwszych leków przeciwnowotworowych (antymetabolitów purynowych), których działanie polega na blokowaniu syntezy DNA i zatrzymaniu wzrostu komórek [28]. Również w ramach badań metabolizmu puryn, niedawno zidentyfikowano tzw. *purynosom*, którego powstawanie jest ściśle związane z cyklem komórkowym [100, 107] i który szczegółowo opiszę w dalszej części. Już teraz wiadomo, że odkrycie to dostarcza pomysł na nową strategię terapeutyczną, ukierunkowaną na tworzenie purynosomu i metabolizm puryn. Jest to ciekawe zagadnienie, również ze względu na to, iż purynosom może wejść w interakcję z mitochondriami oraz z kinazą mTOR (ssaczy cel rapamycyny, ang. mammalian target of rapamycin kinase), co może mieć związek z reprogramowaniem metabolizmu komórek nowotworowych [108].

### 1.3.3. *Szlak rezerwowy metabolizmu puryn*

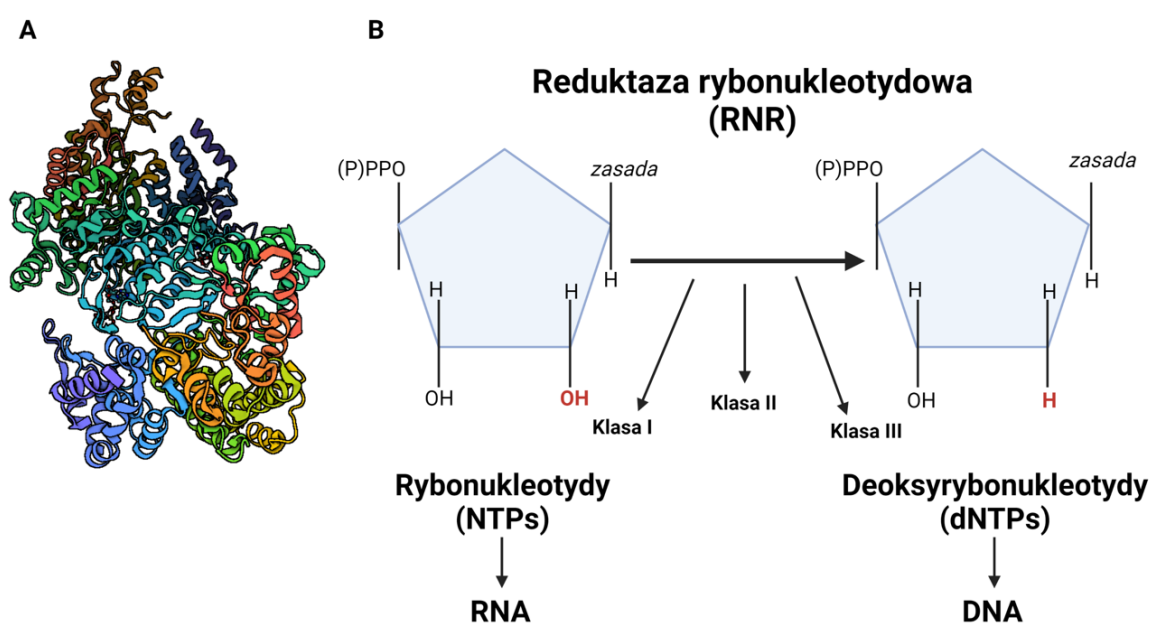
Metabolizm puryn utrzymuje komórkową pulę adenylanu i guanylanu poprzez syntezę i degradację nukleotydów purynowych. W komórkach ssaków nukleotydy purynowe są syntetyzowane w dwóch różnych szlakach: komplementarnym szlaku rezerwowym (ang. *salvage pathway*) i szlaku biosyntezy *de novo* [97].

Aby utrzymać homeostazę, dzielące się komórki muszą uzupełniać pulę nukleotydów, a progresja cyklu komórkowego musi być ściśle powiązana ze zdolnością komórki do pozyskiwania składników odżywczych, generowania energii oraz do napędzania anabolizmu, w tym biosyntezy kwasów nukleinowych. Chociaż istnieją szlaki rezerwowe, większość proliferujących komórek syntetyzuje nukleotydy i kwasy nukleinowe *de novo*, głównie z glukozy, glutaminy i CO<sub>2</sub> [97, 107].



liczby mutacji, anomalii replikacyjnych, a także niestabilności genomu. Ponadto, enzym ten może być uważany za idealny cel dla związków antyproliferacyjnych, zaprojektowanych w celu hamowania replikacji w komórkach eukariotycznych (komórki nowotworowe), pasożytach, wirusach i bakteriach [111].

Wszystkie organizmy wymagają aktywnej syntezy DNA przed podziałem komórki, a RNR jest enzymem limitującym tempo metabolizmu nukleotydów [112], który funkcjonuje jako łącznik pomiędzy dwoma światami: RNA i DNA. Jest enzymem zaangażowanym zarówno w szlaki rezerwowy, jak i syntezy DNA *de novo*, w których katalizuje kluczowy etap: konwersję difosforanów nukleozydów do difosforanów 2'-deoksynukleozydów [113]. Powstałe w ten sposób dNDPs są następnie przekształcane do dNTPs (trójfosforany dezoksynukleotydów) za pośrednictwem m.in. kinaz i ATP [97]. Dotychczas opisano trzy różne klasy RNR (I, II, i III), a klasa I dzieli się dodatkowo na Ia, Ib i Ic. Wszystkie trzy klasy RNR wykazują wspólną strukturę białka w podjednostce katalitycznej. Ze względu na to, że reduktaza rybonuklotydowa katalizuje kluczowy etap syntezy *de novo* DNA, musi być allosterycznie regulowana przez utrzymanie zrównoważonej puli trójfosforanów deoksynukleotydów w komórce [111].



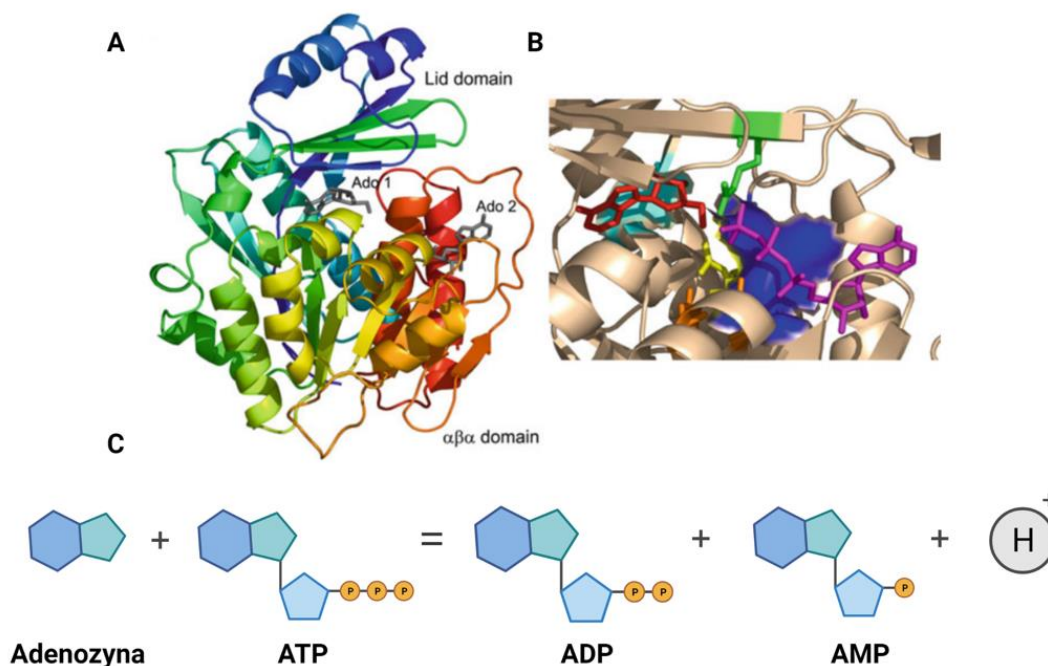
**Schemat 16:** (A) Podjednostka R1 ludzkiej reduktazy rybonukleotydu (RRM1) w kompleksie z dATP i Mg. Struktura pochodzi z Protein Data Bank (doi:10.2210/pdb2WGH/pdb). (B) Schemat mechanizmu działania RNR prowadzący do utworzenia deoksyrybonukleotydów. Schemat powstał w programie BioRender.com.

Szlak rezerwowy puryn wykorzystuje purynowe zasady takie jak guanina, hipoksantyna i adenozyne, które są dostarczane wraz z przyjmowanym pokarmem lub za pośrednictwem

szlaku katabolicznego i przekształca je odpowiednio w GMP, IMP i AMP, w efekcie czego powstaje kwas moczowy [114]. Ścieżka ta jest również aktywowana poprzez fosforylację nukleozydów, takich jak adenozyne, co odgrywa kluczową rolę w przypadku rybozydu kinetyny, a także innych pochodnych adenozyne, w tym innych cytokinin.

#### *1.3.4. Kinaza adenozyne jako kluczowy enzym szlaku rezerwowego*

Wszystkie systemy żywe potrzebują skutecznych mechanizmów samoregulacyjnych, dostosowujących zapotrzebowanie metaboliczne do dostępnych źródeł energii [51]. Kinaza adenozyne (ADK, EC 2.7.1.20) jest kluczowym enzymem uczestniczącym w regulacji zewnątrzkomórkowego i wewnątrzkomórkowego poziomu adenozyne, z zachowaniem wewnątrzkomórkowej puli adenylanów [115]. Wykazano, że ADK jest najczęściej występującą u ssaków kinazą nukleozydową, a poziom jej ekspresji u ludzi jest najwyższy w wątrobie, nerkach i płucach [115]. ADK jest pierwszym enzymem w rezerwowym szlaku adenozyne, a powstały w wyniku katalizowanej przez nią reakcji monofosforan, w wielu przypadkach jest następnie przekształcany przez inne kinazy do trójfosforanu, który funkcjonuje jako aktywny metabolit. Tym samym jest ona również odpowiedzialna za fosforylację analogów nukleozydów, wykazujących szeroką aktywność biologiczną [43]. ADK wykazuje również niezwykle szeroką specyficzność i selektywność substratową, co w konsekwencji może przyczynić się do aktywacji dużej liczby antymetabolitów i inhibitorów (**Schemat 18**). Analogi adenozyne, takie jak fludarabina, są łatwo transportowane do wnętrza komórki i po fosforylacji wywołują cytotoksyczne działanie poprzez zakłócanie syntezy DNA [116]. Fosforylacja rybozydów cytokinininy przez kinazę adenozynową (ADK) jest warunkiem cytotoksycznego działania rybozydów cytokininowych zarówno w komórkach zwierzęcych [65], jak i roślinnych [80]. RK jest w stanie zaburzyć równowagę energetyczną w komórkach poprzez fosforylację przez kinazę adenozyne, co jest kluczowe dla jego toksyczności [68, 81, 82, 117].



**Schemat 17:** (A) Struktura krystaliczna ludzkiej kinazy adenozyny (doi: 10.2210/pdb1BX4/pdb) z dwiema związanymi cząsteczkami adenozyny (kolor szary). (B) Struktura kinazy adenozyny *Toxoplasma gondii* (doi: 10.2210/pdb1LII/pdb). Obie te struktury ADK umożliwiły poznanie mechanizmu reakcji enzymatycznej przeprowadzanej przez enzym (C) Unikalny mechanizm reakcji fosforylacji katalizowanej przez kinazę adenozyny; jest to uporządkowany mechanizm Bi-Bi, w którym adenozyna jest pierwszym związanym substratem, a AMP jest ostatnim produktem dysocjacji. Struktury pochodzą z książki [43], schemat powstał w programie BioRender.com.

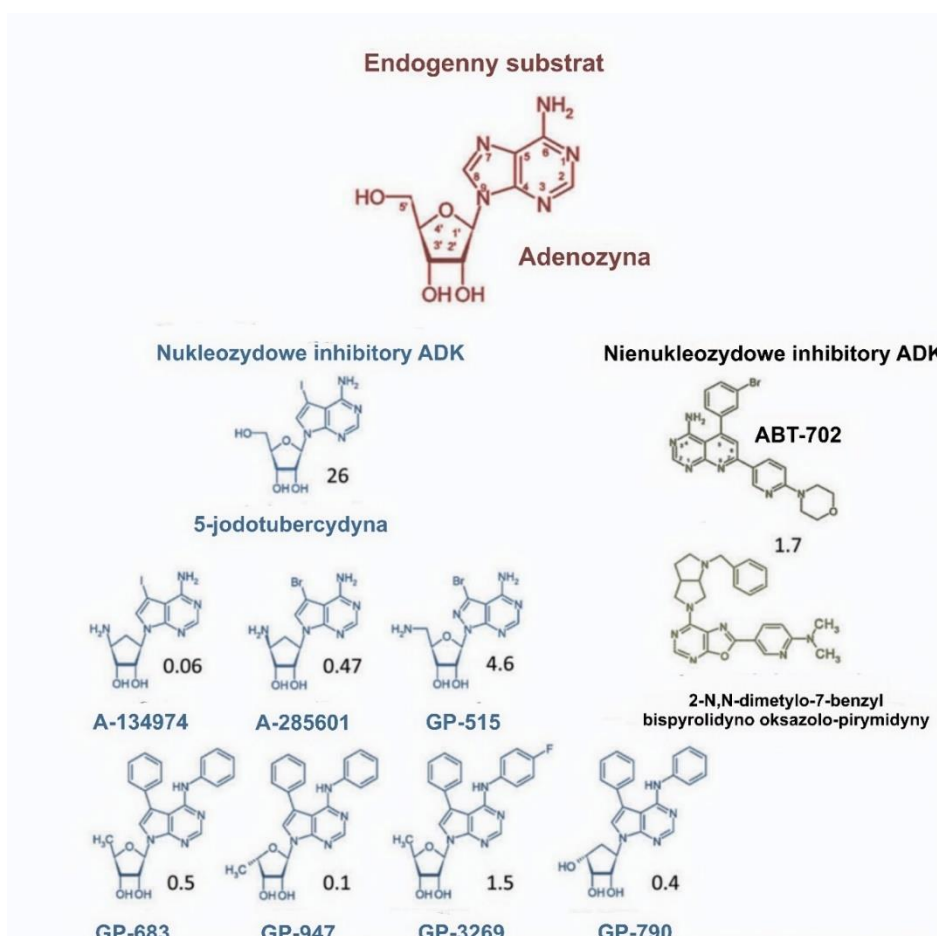
ADK ponadto pełni istotną rolę w reakcji metylacji komórkowej, a jej niedobór u transgenicznym myszy ADK *-/-* prowadzi do rozwoju ostrego, stłuszczenia wątroby, co powoduje wczesną śmiertelność poporodową [51]. Reakcja katalizowana przez ADK, tj. adenozyna + ATP → AMP + ADP, jest unikalna, bo stanowi rzadko spotykany typ reakcji, w którym donor (ATP) i akceptor (adenozyna) fosforanu, mają ten sam motyw strukturalny (pierścień adeninowy) (Schemat 17). ADK zawiera dwa miejsca katalityczne: miejsce o wysokim powinowactwie, które selektywnie wiąże adenozynę i AMP, oraz miejsce dla ATP i ADP [118]. Te unikalne cechy reakcji katalizowanej przez ADK komplikowały interpretację danych kinetycznych i zaproponowano dwumiejscowy mechanizm reakcji ping-pong oraz uporządkowany mechanizm Bi-Bi [115].



Dokładny wgląd w mechanizm działania ADK był możliwy dopiero, dzięki uzyskanym strukturom krystalicznym enzymu (**Schemat 17**). Ludzki enzym był pierwszym, który został skryształizowany i scharakteryzowany [115]. Wykazano, że struktura ADK to monomer, który składa się z dwóch odrębnych domen,  $\alpha\beta$  trójwarstwowej domeny kanapkowej (ang. sandwich domain) i mniejszej domeny pokrywowej (ang. lid-like domain).

W komórkach ssaków można obecnie wyróżnić dwie izoformy ADK (ADK długa lub ADK-L i ADK krótka lub ADK-S). Obie izoformy są identyczne z wyjątkiem aminokwasów kodowanych przez ich pierwsze egzony (egzon 1 i egzon 1A). Początkowo spekulowano, że obie izoformy ADK znajdują się w cytoplazmie. Obecnie zidentyfikowano lokalizację obu subkomórkowych izoform ADK [51].

Aktywność ADK jest regulowana przez jej własne substraty i produkty, jak również przez czynniki, które odzwierciedlają stan energetyczny i dobrostan komórki. Kinaza adenozyne spełnia rolę czujnika równowagi bioenergetycznej komórki, określając poziom zasobów energii [51].



**Schemat 18:** Struktury chemiczne endogennego substratu ADK - adenozyne oraz wybranych nukleozydowych i nienukleozydowych inhibitorów ADK. Cyfry w kolorze czarnym oznaczają  $IC_{50}$  inhibitora w stężeniach nanomolarnych. Schemat pochodzi z publikacji [51].



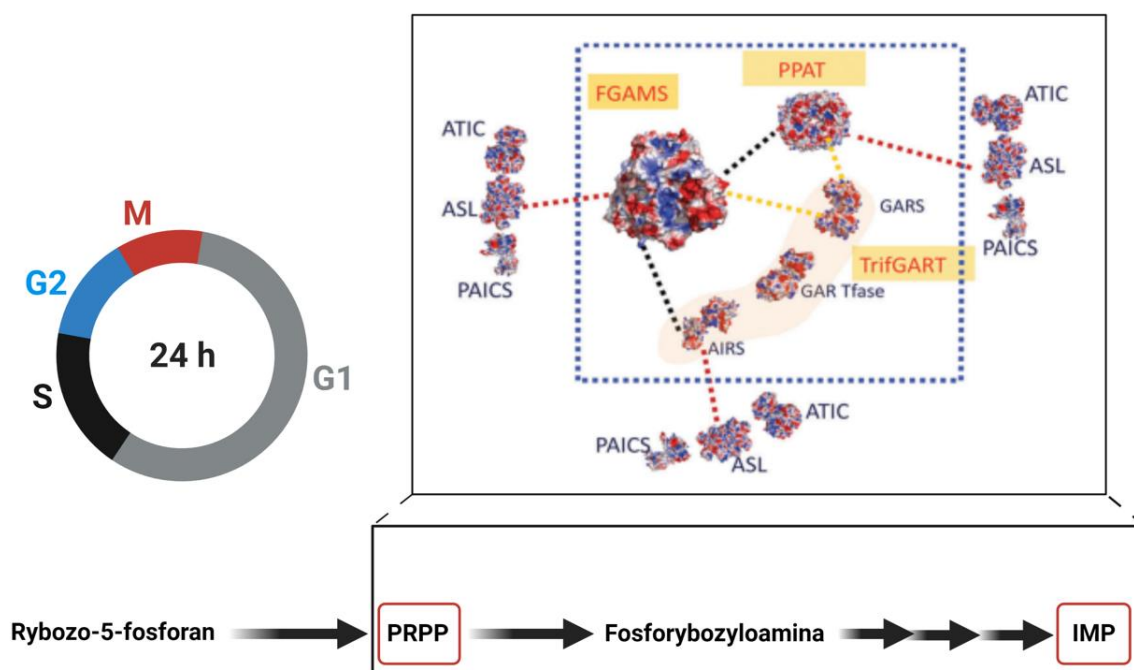
### 1.3.5. Szlak *de novo* biosyntezy puryn

W warunkach zwiększonego zapotrzebowania na nukleotydy purynowe takich jak intensywnie dzielące się komórki, w tym także nowotworowe, to szlak biosyntezy *de novo*, ma zasadnicze znaczenie dla uzupełnienia puli puryn. U ludzi zidentyfikowano, sześć enzymów katalizujących 5- fosforybozylo-1-pirofosforan (PRPP) do postaci monofosforanu inozyny (IMP). Na proces ten składa się 10 wysoce regulowanych etapów (**Schemat 19**). Enzymy biorące udział w tych reakcjach to: jeden enzym trójfunkcyjny (TrifGART: GARS, GART, i AIRS), dwa enzymy dwufunkcyjne (PAICS: domeny CAIRS i SAICARS; ATIC: domeny AICART i IMPCH), oraz trzy enzymy jednofunkcyjne (PPAT, FGAMS i ASL) (**Tabela 1**) [100, 109].

**Tabela 1:** Sześć enzymów zidentyfikowanych jako kluczowe elementy dziesięciostopniowego szlaku biosyntezy puryn *de novo*, przekształcających pirofosforan fosforybozylu (PRPP) w monofosforan inozyny i odpowiedzialne za asocjację purynosomów w komórkach. Tabela na podstawie [100].

Etapy syntezy <i>de novo</i>	Symbol enzymu	Nazwa
1	PPAT	Amidofosforofibosylotransferaza
2, 3, 5	TrifGART: 1. GARS 2. GART 3. AIRS	Trójfunkcyjne biosyntetyczne białko purynowe adenozylna-3: 1. ligaza fosforybozyloaminowo-glicynowa 2. Formiotransferaza fosforybozyloglicynamidu 3. Syntetaza AIR
4	PFAS/FGAMS	Syntaza fosforybozyloformyloglicynoamidyny
6, 7	PAICS	Karboksylaza fosforybozyloaminoimidazolu
8	ADSL	Liaza adenylobursztynianowa
9,10	ATIC	Dwufunkcyjne białko biosyntezy puryn PURH (syntaza monofosforanu inozyny)

Powstały w wyniku tego procesu IMP, przyczynia się następnie do produkcji różnych produktów pośrednich, takich jak AMP, GMP, adenozyzna i inozyna. Inozyna jest dalej przekształcana do hipoksantyny przez fosforylaze nukleozydów purynowych (PNP), a oksydaza ksantynowa (XO) katalizuje utlenianie hipoksantyny do ksantyny [119]. Szlak biosyntezy *de novo* jest energochłonny, a liczne substraty aminokwasowe i jednostki jednowęglowe, takie jak glutamina (2 cząsteczki), ATP (5 cząsteczek) i mrówczan (2 cząsteczki) oraz po jednej cząsteczce cząsteczki glicyny, asparaginianu i dwutlenku węgla, są niezbędne do zajścia 10-etapowego procesu enzymatycznego i wytworzenia jednej cząsteczki IMP. Dlatego substraty te odgrywają krytyczną rolę w metabolizmie puryn, szczególnie w szybko proliferujących komórkach nowotworowych, dla których niezbędna jest wydajna biosynteza puryn, ATP i NADPH [109].



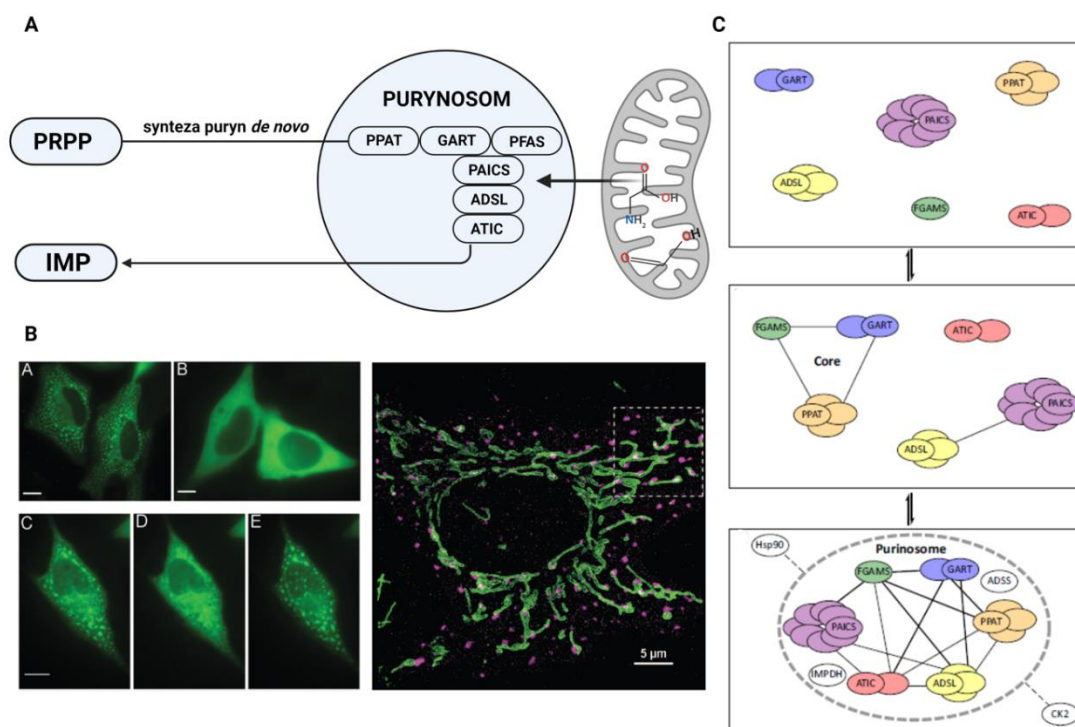
**Schemat 19:** Przebieg syntezy *de novo* puryn, który obejmuje dziesięć reakcji enzymatycznych, prowadzących do utworzenia IMP. Proces ten jest wysoce energochłonny i ściśle powiązany z cyklem komórkowym. Schemat powstał w programie BioRender.com, na podstawie publikacji [100].

### 1.3.6. Purynosom

Ścieżka metaboliczna składa się zwykle z sekwencji kilku enzymów, które wspólnie tworzą strukturę białkową wyższego rzędu, tak aby mógł być zapewniony przepływ metaboliczny. Taki kompleks białkowy jest znany jako metabolon [120], a jego główną funkcją jest poprawa wydajności szlaku metabolicznego. Jego celem jest zwiększenie stężenia

metabolitów i substratów pośrednich, zmniejszając tym samym stężenie enzymów potrzebnych do utrzymania przepływu, kierując produkty reakcji do określonej lokalizacji subkomórkowej lub minimalizując „ucieczkę” reaktywnych intermedatów [109].

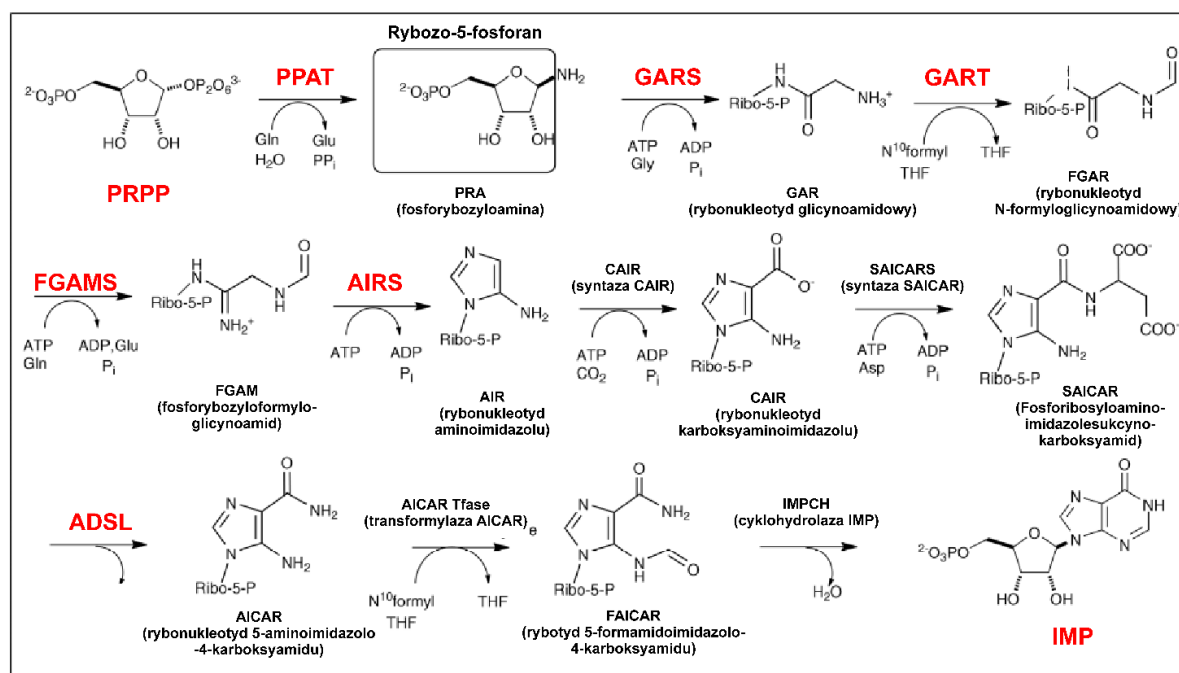
Metabolizm puryn jest badany od dziesięcioleci, co zrodziło wiele spekulacji, w tym jedną wskazującą na to, że enzymy biorące udział w biosyntezie puryn *de novo* są zorganizowane w metabolon, w celu utrzymania puli puryn w komórce (**Schemat 20**). W 2008 roku purynosom został zidentyfikowany po raz pierwszy w żywych komórkach, poprzez odkrycie, że wszystkie enzymy tworzące szlak biosyntezy *de novo* (**Tabela 1**), zlokalizowane są w cytoplazmie komórkowej (**Schemat 20**) [121]. Zarówno powstawanie, jak rozkład purynosomu to procesy dynamiczne, regulowane przez komórkowy poziom puryn, co bezpośrednio aktywuje szlak biosyntezy puryn *de novo* [100, 121].



**Schemat 20:** (A) Synteza *de novo* puryn obejmująca powstanie metabolonu- purynosomu, w skład którego wchodzi 6 enzymów (3 z nich, tj. PPAT, GART oraz PFAS, tworzą tzw. rdzeń purynosomu, a pozostałe: PAICS, ADSL, ATIC, działają obwodowo). Biosynteza puryn *de novo* nie tylko dostarcza prekursorów nukleotydów niezbędnych do mitochondrialnej produkcji ATP, ale również odwrotnie, wymaga ATP do swojego działania, co wskazuje na istnienie synergicznej relacji pomiędzy purynosomami i mitochondriami. (B) Purynosomy powstające w komórkach HeLa transfekowanych FGAMS-GFP w podłożu ubogim w puryny (zdjęcie po lewej stronie) oraz kolokalizacja purynosomów (kolor różowy) z mitochondriami (zdjęcie po prawej stronie). (C) Stopniowy proces formowania purynosomu. Zdjęcia purynosomu (B) oraz schemat (C) pochodzą z publikacji [100, 108]. Schemat powstał w programie BioRender.com.

Cykl komórkowy ssaków jest wysoce zorganizowanym i regulowanym procesem, który zapewnia powielanie materiału genetycznego i podział komórek. Regulacja obejmuje sygnały kontrolujące wzrost, a także sygnały pochodzące od białek monitorujących integralność genetyczną, w celu ustalenia braku jakichkolwiek uszkodzeń genetycznych. Proliferacja zależy od przejścia przez cztery odrębne fazy cyklu komórkowego (G0/G1, S, G2 i M) (**Schemat 19**), regulowanego przez kilka kinaz zależnych od cyklin (CDK). CDK po związaniu się z cyklinami ulegają aktywacji i przeprowadzają reakcje fosforylacji białek docelowych, które przez to zostają zaktywowane lub inaktywowane. Powoduje to skoordynowane wejście komórki w następną fazę cyklu. Aktywność CDK zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego jest ściśle kontrolowana, a cykl komórkowy może być indukowany przez sygnały mitogenne i hamowany przez aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenie DNA [122]. Jak się okazało cykl komórkowy jest też ściśle powiązany z biosyntezą puryn na drodze *de novo* (**Schemat 19**), ponieważ właśnie podczas wzrostu lub podziału komórki, biosynteza puryn *de novo* jest aktywowana w celu dostarczenia nukleotydów purynowych do wzrostu (faza G1 cyklu komórkowego), powielania materiału genetycznego (faza S), fazy poprzedzającej mitozę (faza G2), i podziału (faza M) [122]. Zastosowanie mikroskopii fluorescencyjnej w różnych przedziałach czasowych, wykazało, że, wysoki procent komórek zawierających ukształtowany purynosom, znajduje się w fazie G1 cyklu komórkowego, kiedy zapotrzebowanie na puryny jest najwyższe, a maleje wraz z progresją komórek do faz S i G2/M [123].

Ponadto, metoda mapowania interakcji białko-białko w obrębie purynosomu, potwierdziła, że pierwsze trzy enzymy w szlaku, tj. PPAT, GART i FGAMS stanowią tzw. rdzeń purynosomu, podczas gdy PAICS, ADSL i ATIC wydają się oddziaływać peryferyjnie (**Schemat 20 i 21**) [109]. Niedobór lub mutacja któregośkolwiek z tych enzymów w obrębie purynosomu, upośledza jego tworzenie i stabilność kompleksu [124, 125]. Interesującym jest fakt, iż „komórki purynosomowe” różnią się między fazami G1 i G2/M, ale ekspresja enzymów szlaku biosyntezy puryn *de novo* nie ulega zmianie w całym cyklu komórkowym [123].



**Schemat 21:** Reakcje enzymatyczne zachodzące w obrębie purynosomu, prowadzące do powstania IMP w wyniku konwersji PRPP. Schemat pochodzi z publikacji [100]. Na czerwono zaznaczono podstawowe enzymy tworzące purynosom, ich pełne nazwy podano w tabeli nr 1, w podrozdziale 1.3.5.

Cechą charakterystyczną nowotworów jest zaburzenie cyklu komórkowego i niekontrolowana proliferacja komórek [122]. Tak jak wspomniano powyżej, stężenie puryn i ekspresja enzymów szlaku *de novo* są zwiększone w komórkach nowotworowych, ponieważ są one niezbędne dla proliferacji komórek nowotworowych [57, 109]. Antymetabolity purynowe stanowią jedne z najwcześniej opracowanych leków chemioterapeutycznych i są szeroko stosowane w leczeniu nowotworów [116].

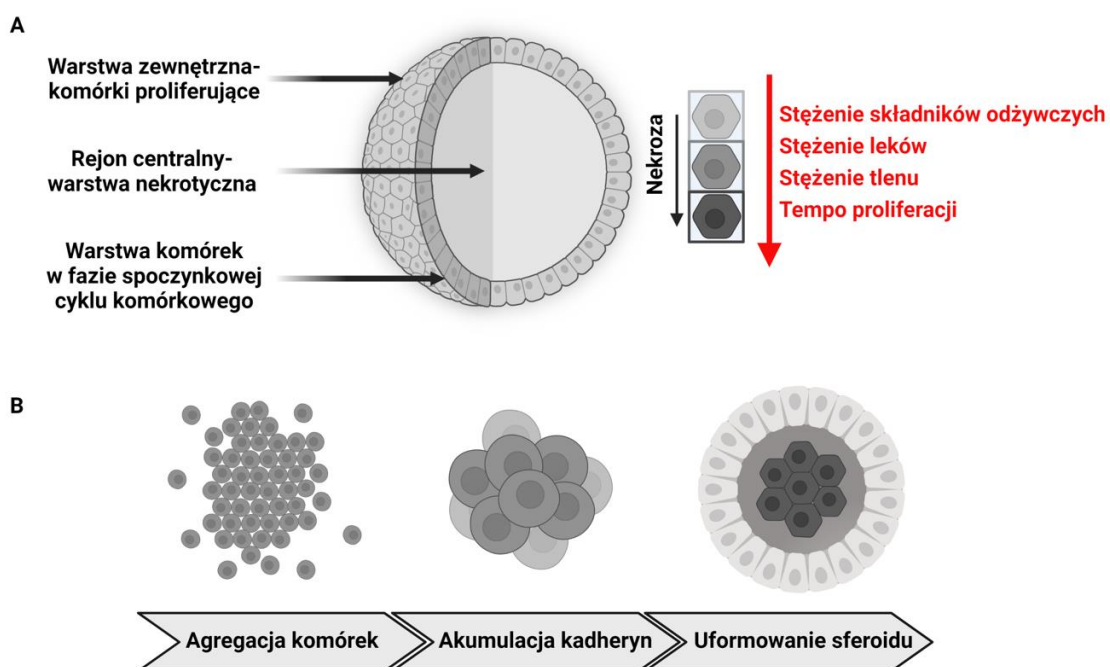
W przypadku antymetabolitów, często obserwuje się lekooporność, a różne geny są zaangażowane w ich nietolerancję [109]. Ponadto, antymetabolity purynowe również wpływają na proliferację zdrowych komórek i tym samym powodują potencjalną toksyczność dla komórek prawidłowych. Dlatego też pilnie potrzebna jest identyfikacja nowych celów regulacyjnych w obrębie metabolizmu puryn, które hamowałyby progresję nowotworów bez zjawiska lekooporności i szkody dla komórek prawidłowych.

#### 1.4. Rodzaje hodowli komórkowych

Hodowle komórkowe to powszechnie stosowane narzędzie do badań *in vitro*, którego zadaniem jest lepsze zrozumienie biologii komórki, morfologii tkanek i mechanizmów

chorób, a także działania leków, produkcji białek oraz rozwój inżynierii tkankowej. Testy oparte na komórkach są ważnym filarem procesu odkrywania leków, ponieważ stanowią proste, szybkie i efektywne narzędzie pozwalające uniknąć kosztownych badań na zwierzętach [126].

Większość badań dotyczących biologii nowotworów opiera się na eksperymentach z wykorzystaniem tradycyjnych dwuwymiarowych kultur komórkowych *in vitro* (2D), w których komórki hodowane są na płaskim i sztywnym podłożu, tworząc monowarstwę [126]. Choć tradycyjna hodowla komórek 2D okazała się być wartościową metodą do badań opartych na komórkach, nadal jednak wykazuje szereg ograniczeń, takich jak zakłócenie interakcji między komórką a środowiskiem zewnątrzkomórkowym, zmiany w morfologii komórki, polarności i metodzie podziału, a także ograniczona jest ona do pojedynczych typów komórek. W związku z tym, wiele obecnie stosowanych metod wykorzystujących hodowlę komórek 2D nadal daje niezadowalające, nieprzewidywalne, a czasami mylące wyniki w badaniach *in vivo* [127, 128]. Wady te doprowadziły do stworzenia modeli, które są bardziej zdolne do naśladowania warunków *in vivo*, a jedną z nich są kultury trójwymiarowe (3D), tzw. sferoidy. Kultury 3D wykazują cechy guza w jego wczesnej fazie wzrostu ze względu na wielokomórkową budowę oraz możliwości kontaktów między komórkami (**Schemat 22 i 23**) [129].

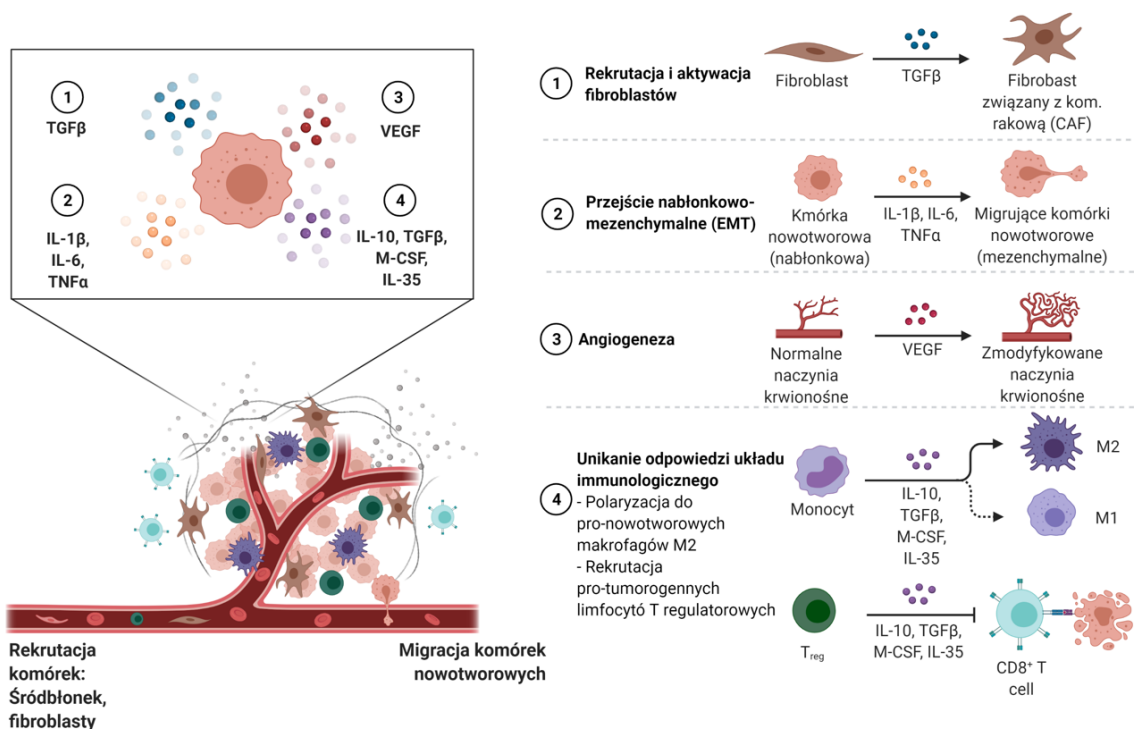


**Schemat 22:** (A) Struktura wielokomórkowego sferoidu, w obrębie którego wyróżnia się zewnętrzny obszar proliferujących komórek, wewnętrzną strefę spoczynkową, otaczającą nekrotyczny rejon centralny. W strukturze wielowarstwowej następuje zaburzenie dystrybucji składników odżywczych, tlenu oraz zmniejsza się tempo

proliferaacji. Komórki nowotworowe wchodzące w skład sferoidu, oddziałują między sobą, tworząc dobrze zorganizowaną strukturę przestrzenną, charakteryzującą się różnicami w fenotypie, stanie funkcjonalnym i metabolicznym. **(B)** Trzyetapowy proces formowania sferoidu w warunkach *in vitro*. Schemat powstał w programie BioRender.com na podstawie publikacji [130].

Komórki nowotworowe w słabo unaczynionych regionach guza muszą przystosować się do niekorzystnego mikrośrodowiska metabolicznego. W miarę jak zwiększa się odległość od zaopatrujących je naczyń krwionośnych, zmniejsza się stężenie tlenu i składników odżywczych, a komórki nowotworowe reagują zatrzymaniem cyklu komórkowego (**Schemat 22**) [131]. Ponieważ leki cytostatyczne są głównie wymierzone w komórki proliferujące, takie „uśpienie” komórek nowotworowych jest uważane jako główny mechanizm oporności na tę klasę leków przeciwnowotworowych.

Dzięki trójwymiarowym warunkom wzrostu, wielokomórkowe sferoidy nowotworowe odtwarzają i mimikują kilka parametrów mikrośrodowiska, w tym stężenie tlenu i składników odżywczych (**Schemat 23**) [131]. Struktura 3D odgrywa ważną rolę w określaniu losów komórek, gdy ulegają proliferacji, różnicowaniu lub apoptozie, ponadto sferoidy wykazują wyższą wrażliwość na działanie leków. Wpływa to nie tylko na przestrzenną organizację receptorów powierzchniowych komórek zaangażowanych w interakcje z otaczającymi komórkami. „Efekt trójwymiarowości” prowadzi także do różnic w odpowiedzi komórek w hodowlach 3D w porównaniu z hodowlami 2D na działanie określonych związków [126].



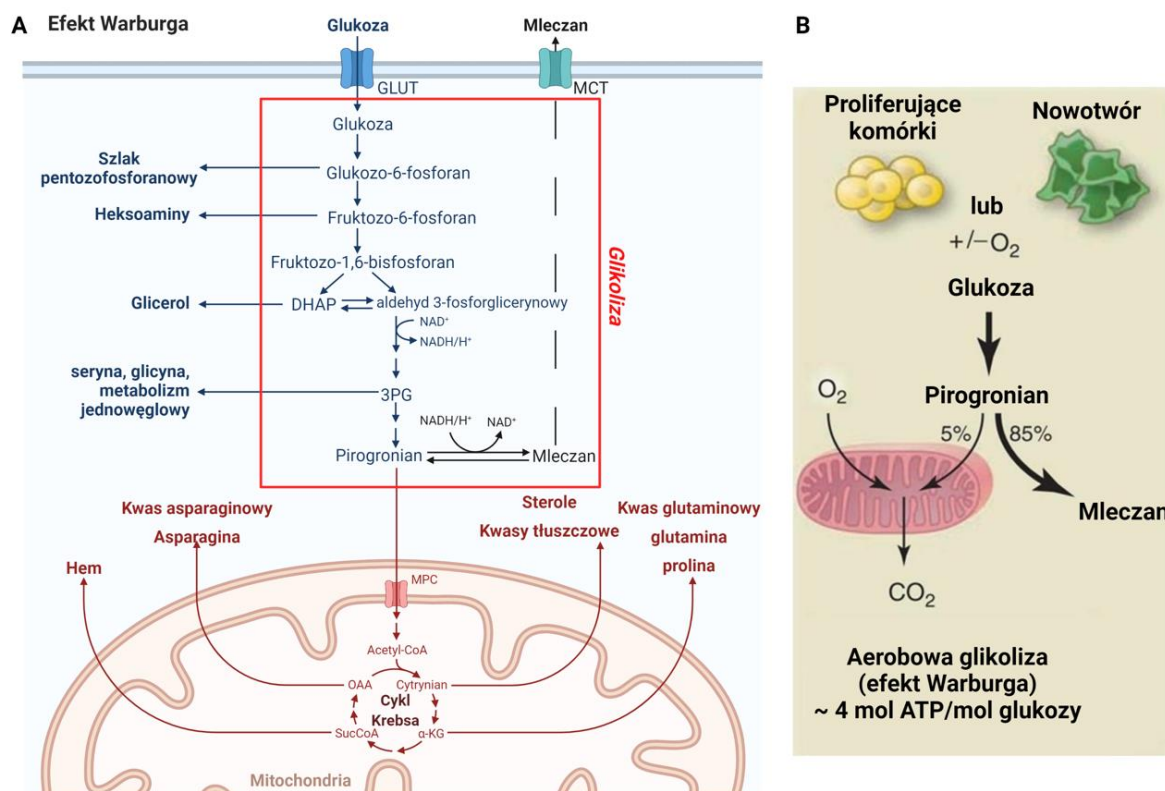
**Schemat 23:** Komponenty mikrośrodowiska guza, które stanowi złożony ekosystemem heterogennych komórek nowotworowych, komórek zrębu i różnorodnych komórek odpornościowych, otoczonych przez sieć naczyń krwionośnych i kolagenu. Schemat pochodzi z programu BioRender.com, powstał w oparciu o publikację [132]

Jednakże, pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach, technologia hodowli komórkowych 3D jest wciąż dziedziną rozwijającą się. Mając na uwadze to, że sferoidy umożliwią lepsze zrozumienie biologii nowotworów, ułatwiają poszukiwania biomarkerów oraz rozwój terapii celowanych, wciąż dąży się do optymalizacji warunków ich hodowli, co stanowi obecnie bardzo złożony proces.

### 1.5. Metabolizm i bioenergetyka komórek nowotworowych

Metabolizm większości komórek nowotworowych opiera się na beztlenowej glikolizie. Nawet w obecności tlenu, oddychanie mitochondrialne jest tłumione i jest to prawdopodobny mechanizm, dzięki któremu komórki unikają apoptozy [133]. Komórki nowotworowe są również w stanie „przełączyć się” na wykorzystanie glukozy i w ten sposób promować zwiększoną produkcję mleczanu do mitochondriów, zamiast transportu pirogronianu, co zostało zaobserwowane i opisane po raz pierwszy przez Otto Warburga (**Schemat 24**) [134, 135].





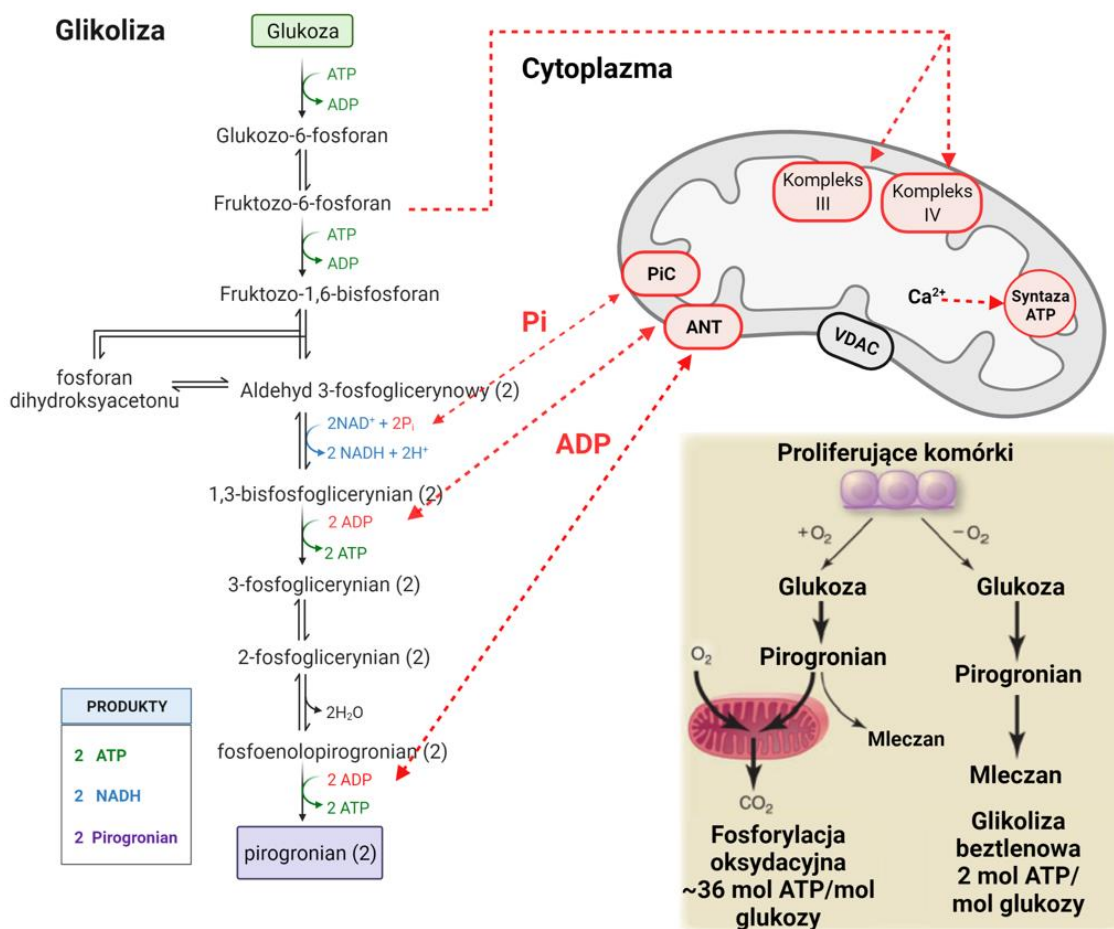
**Schemat 24:** (A) Glikoliza i metabolizm cyklu Krebsa stanowiące szlaki anaboliczne. Oba procesy wspierają wzrost komórek poprzez zasilanie szlaków wymaganych do anabolizmu. (B) W efekcie Warburga, glikoliza kończy się produkcją i wydzielaniem mleczanu, pomimo obecności tlenu. Schemat powstał w programie BioRender.com w oparciu o publikacje [136, 137].

Metabolizm glukozy, głównego makroskładnika odżywczego, umożliwia pozyskiwanie energii w postaci ATP poprzez utlenianie jej wiązań węglowych. Proces ten jest niezbędny do podtrzymania życia wszystkich ssaków. U ssaków produktem końcowym może być mleczan lub po pełnym utlenieniu glukozy w procesie oddychania w mitochondriach, CO<sub>2</sub>. W nowotworach i innych proliferujących lub rozwijających się komórkach, tempo wychwytu glukozy gwałtownie wzrasta i wytwarzany jest mleczan, nawet w obecności tlenu i w pełni funkcjonujących mitochondriów.

W przeliczeniu na jednostkę glukozy, glikoliza tlenowa jest nieefektywnym sposobem generowania ATP, w porównaniu z ilością uzyskiwaną w procesie oddychania mitochondrialnego [138]. Jednakże tempo metabolizmu glukozy w glikolizie tlenowej jest większe, tak że produkcja mleczanu z glukozy zachodzi 10-100 razy szybciej niż całkowite utlenienie glukozy w mitochondriach. W rzeczywistości, ilość ATP syntetyzowanego w danym okresie czasu jest porównywalna, gdy wykorzystywana jest jedna z form metabolizmu

glukozy [138]. Ponadto efekt Warburga pełni ważną funkcję biosyntetyczną, którą jest regeneracja NAD<sup>+</sup> z NADH w etapie przekształcania pirogronianu w mleczan, który kończy glikolizę tlenową (**Schemat 24**) [136].

Mimo to, ten nieefektywny fermentacyjny mechanizm wytwarzania ATP, dostarcza prekursorów dla wielu szlaków biosyntezy i wspomaga proliferację komórek nowotworowych, co jest głównie efektem "fenotypu glikolitycznego" [139, 140] związanego z aktywacją szlaków onkogennych [134]. Jednakże, jak większość komórek organizmu [141], linie komórkowe raka wątroby, raka piersi i glejaka posiadają funkcjonalnie sprawne mitochondria, w których większość ATP pochodzi z fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) [142, 143]. Ostatnie badania nad lekami indukującymi dysfunkcję mitochondriów wykazały, że komórki te są również zdolne do alternatywnego przełączania strategii metabolicznej, z fermentacyjnej na oksydacyjną, a zjawisko to określane jest jako efekt Crabtree [143, 144]. Efekt ten często towarzyszy efektowi Warburga, jednak w przeciwieństwie do niego, efekt Crabtree jest zwykle określany jako odwracalny, krótkotrwały mechanizm adaptacyjny komórek nowotworowych, polegający na indukowanym glukozą zahamowaniu oddychania. W związku z czym OXPHOS jest obserwowany nie tylko w proliferujących komórkach nowotworowych, ale może występować również w komórkach prawidłowych [145]. Wzrost komórkowego ATP/ADP, wspólnego pośrednika zarówno dla glikolizy, jak i OXPHOS, zmniejsza zapotrzebowanie na strumień oddechowy w celu wytworzenia ATP (**Schemat 25**) [146].

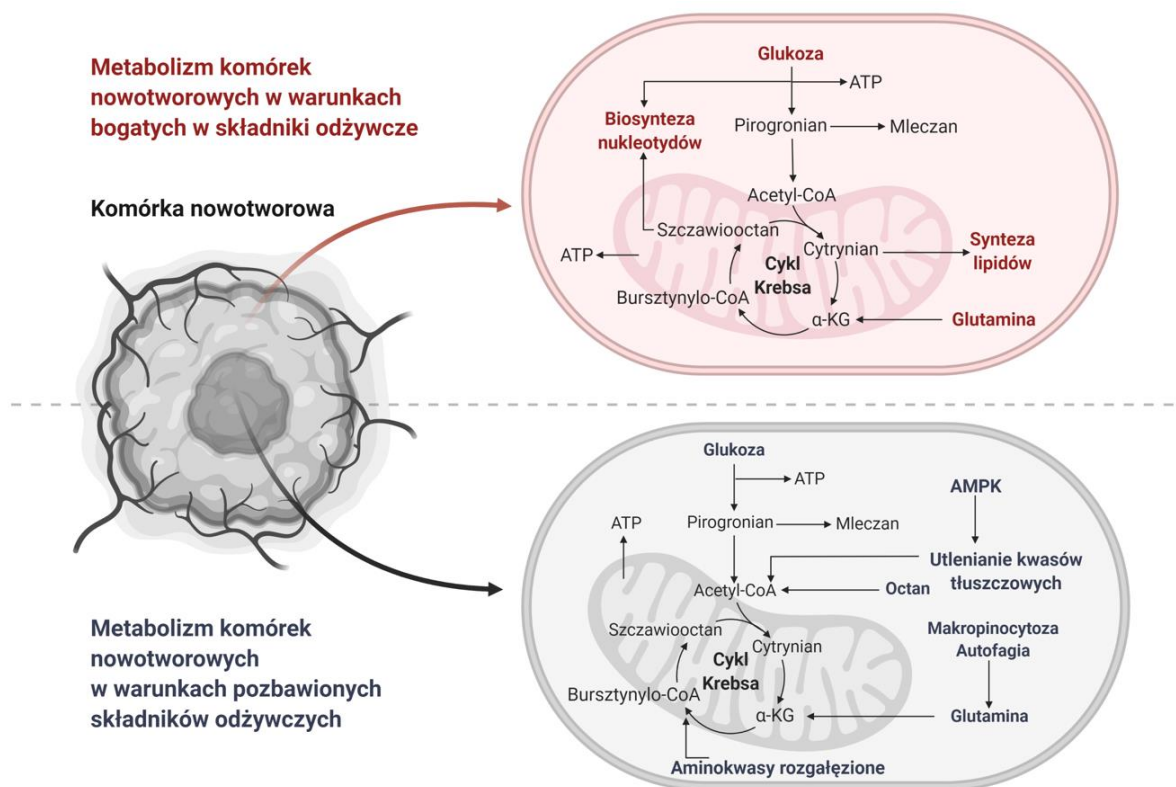


**Schemat 25:** Aktywacja efektu Crabtree w komórce, zachodząca w obecności wysokiego stężenia wewnątrzkomórkowej glukozy, prowadząca do zahamowania fosforylacji oksydacyjnej i indukująca produkcję ATP na drodze glikolizy. Przedstawienie różnic pomiędzy fosforylacją oksydacyjną a glikolizą beztlenową (schemat pochodzi z publikacji [137]). Potencjalne mechanizmy, które mogą indukować efekt Crabtree: dehydrogenaza gliceraldehydu 3-fosforanowego (GAPDH) i mitochondrialny transporter fosforanów (PiC) konkurują o wolną pulę cytoplazmatycznego fosforanu (Pi). Podobna rywalizacja o wolny ADP zachodzi pomiędzy mitochondrialnym ANT (translokator nukleotydów adeniny) a dwoma enzymami glikolizy: kinazą fosfoglicerynianową (PGK) i kinazą pirogronianową (PK). Fruktozo-1,6-bisfosforan hamuje mitochondrialne kompleksy oddechowe III i IV. Zwiększona akumulacja Ca<sup>2+</sup> w macierzy mitochondrialnej prowadzi do zahamowania syntazy ATP. Innym możliwym mechanizmem jest zaburzona dyfuzja ADP przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Schemat powstał w programie BioRender.com na podstawie publikacji [140].

Plastyczność metaboliczna jest korzystna dla komórek nowotworowych, ponieważ zapewnia mikrośrodowisko sprzyjające wzrostowi komórek, zwłaszcza w warunkach *in vivo*. Może to powodować lekooporność mitochondrialną i utrudniać testowanie chemioterapeutyków [147]. Mitochondria odgrywają kluczową rolę w regulacji metabolizmu energetycznego komórki, a także są odpowiedzialne za wiele innych ważnych funkcji, takich jak indukcja apoptozy, status redoks wapnia czy homeostaza. Określenie szlaku

metabolicznego, który ulega zaburzeniu, może być ściśle związane z odpowiedzią mitochondriów na leczenie.

W warunkach hipoksji i kwasowości, glukoza w podłożu hodowlanym zmusza rosnące komórki do polegania na glikolizie zamiast na OXPHOS (**Schemat 26**) [148].



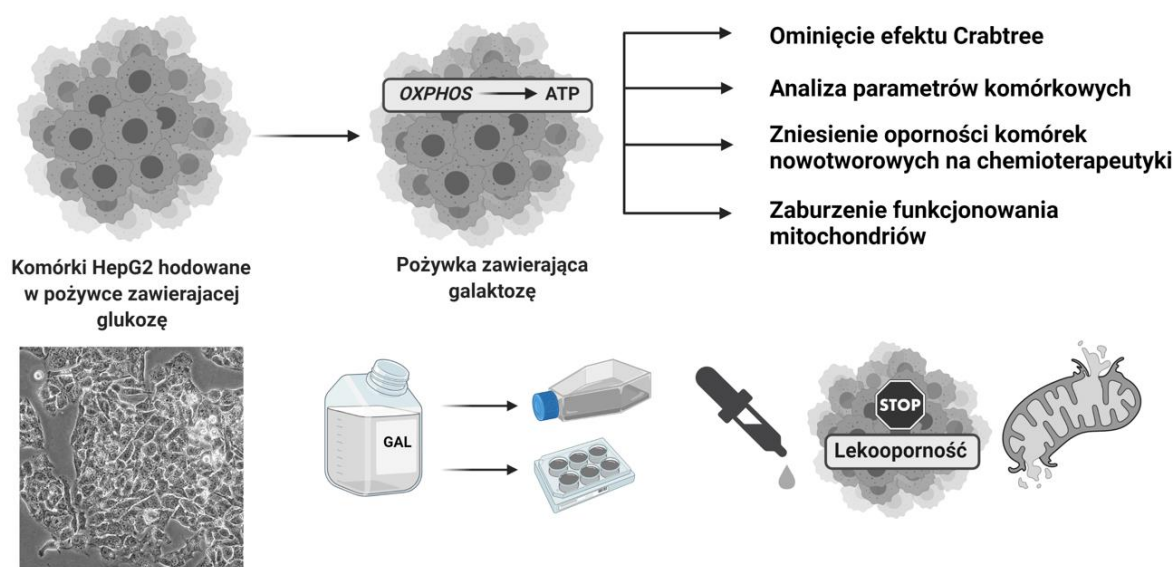
**Schemat 26:** Przebieg metabolizmu komórek nowotworowych w zależności od dostępności składników odżywczych. Schemat pochodzi z programu BioRender.com.

Nawet w obecności wydajnych i funkcjonalnych mitochondriów [141], efekt Crabtree występuje, wspomagając komórki nowotworowe w przetrwaniu w warunkach stresu metabolicznego. Aby uniknąć tego zjawiska i zwiększyć znaczenie zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów, w badaniach *in vitro* bardzo przydatne jest stworzenie środowiska hodowli komórkowej, w którym komórki nowotworowe ulegają nasilonej fosforylacji oksydacyjnej, na przykład poprzez zastąpienie glukozy galaktozą (**Schemat 27**) [148].

Galaktoza powoduje wtedy znacznie wolniejszą i mniej wydajną oksydację pirogronianu na drodze glikolizy, co prowadzi do remodelingu metabolizmu komórek nowotworowych [141]. Wiele nowotworowych jak i prawidłowych linii komórkowych może łatwo przystosować się do nowych warunków hodowli w obecności galaktozy i zacząć

wykorzystywać OXPHOS do wytwarzania wystarczającej ilości ATP [149]. Model wycofania glukozy ma szeroki zakres zastosowań, a szczególnie obiecujący jest w badaniach szlaków bioenergetycznych i procesów związanych z mitochondriami. Chociaż „glikolityczna natura” komórek nowotworowych jest krytycznym ograniczeniem, strategia utylizacji galaktozy uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie potencjalnych toksyn mitochondrialnych [147]. Wcześniejsze badania wykazały, że kilka mechanizmów może prowadzić do śmierci komórek nowotworowych po deprywacji glukozy. Głównymi szlakami zaangażowanymi w aktywację apoptozy są: wyczerpanie ATP [150, 151], indukcja stresu oksydacyjnego [152, 153] lub oba te czynniki jednocześnie [150, 154].

Powszechnie stosowanym modelem komórkowym służącym do identyfikacji dysfunkcji mitochondrialnej jest linia komórkowa nowotworu wątrobowo-komórkowego (ang. hepatocellular carcinoma, HepG2) (**Schemat 27**). Jest on szeroko stosowany jako podstawowy model do badania zaburzeń mitochondrialnych oraz do badania toksyczności ze względu na dużą liczbę mitochondriów i zdolność do łatwego wyzwalania metabolizmu w zależności od warunków środowiskowych [147].



**Schemat 27:** Komórki Hepg2 jako model *in vitro* służący identyfikacji dysfunkcji mitochondrialnych oraz zastąpienie glukozy galaktozą w pożywce hodowlanej, w celu uniknięcia indukcji efektu Crabtree w komórkach.

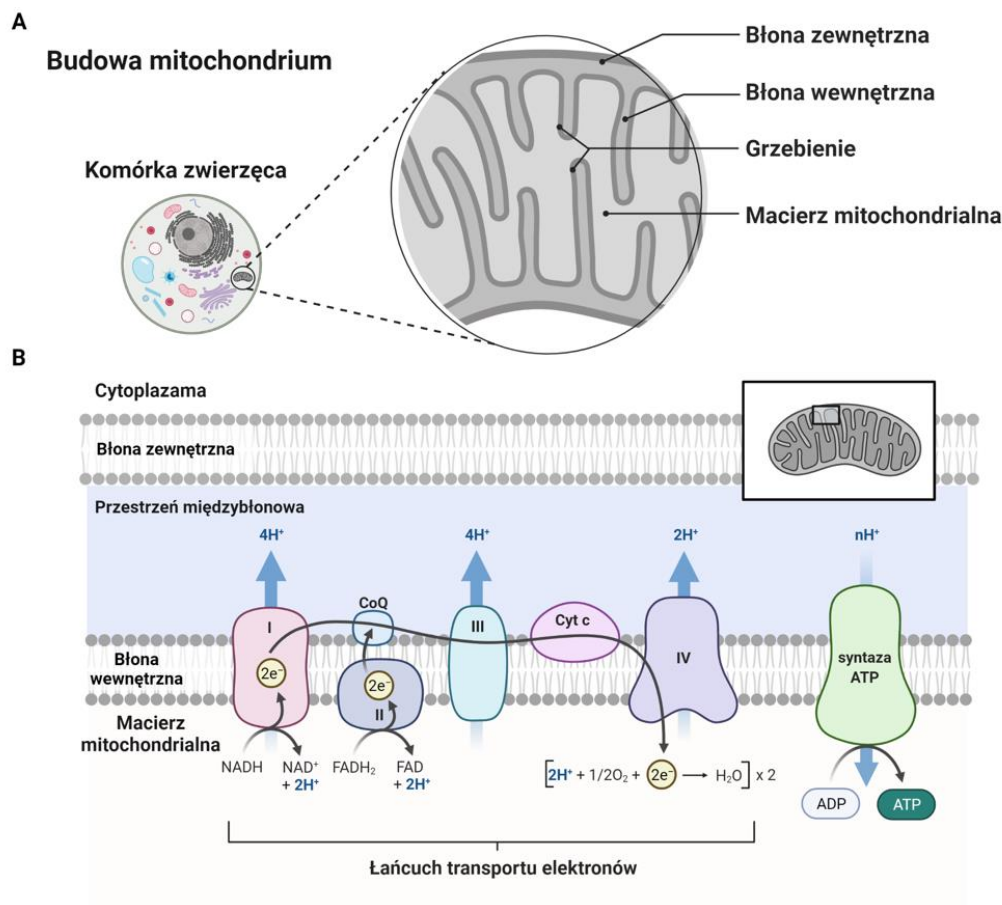
Schemat powstał w programie BioRender.com.

### *1.5.1. Mitochondria- więcej niż fabryka energii*

Mitochondria są niezbędne dla życia komórki, jej aktywności, oddziaływania ze środowiskiem, adaptacji czy tolerancji na czynniki środowiska. W komórce zwierzęcej organelle te są głównym miejscem produkcji ATP niezbędnego dla potrzeb energetycznych, a zatem prawidłowego przebiegu podstawowych funkcji życiowych [4]. Ponadto są one również zaangażowane w procesy starzenia, podziały komórkowe oraz odgrywają kluczową rolę w inicjowaniu wszystkich rodzajów śmierci komórkowej (przypadkowej, regulowanej i programowanej) [155, 156]. Mitochondria regulują poziom metabolitów kluczowych dla różnych procesów komórkowych, takich jak fosforylacja oksydacyjna, cykl Krebsa, czy  $\beta$ -oksydacja [157]. Stanowią główne źródło reaktywnych form tlenu (RFT), które w warunkach prawidłowych powstają jako produkt uboczny wieloetapowego procesu fosforylacji oksydacyjnej, prowadzącej do syntezy ATP (**Schemat 28B**) [158]. Ponadto pojawiły się dowody świadczące o współzależności mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej (ER), a dokładnie dotyczące zaburzenia homeostazy wapnia podczas stresu ER, co może znacząco przyczyniać się do powstawania zaburzeń metabolicznych i dysfunkcji bioenergetycznych [159].

Pojedyncze mitochondrium zawiera dwie błony, które wydzielają cztery odrębne przedziały: błonę zewnętrzną, przestrzeń międzybłonową, błonę wewnętrzną i macierz. Błona wewnętrzna jest silnie pofałdowana i tworzy tzw. grzebień, który zawiera kompleksy łańcucha transportu elektronów i syntazy ATP, kontrolujące podstawowe tempo metabolizmu komórkowego (**Schemat 28A**) [160]. Dotychczas mitochondria uważane były za niezależne struktury, które pracują, jedynie aby dostarczyć energię niezbędną do życia. W ciągu ostatnich lat, pogląd ten uległ zmianie, ponieważ nowsze metody umożliwiły badanie dynamicznej funkcji mitochondriów i ich zachowania w odpowiedzi na sygnały komórkowe. Obecnie uważa się, że morfologia mitochondriów regulowana jest przez dynamiczne procesy rozszczepienia (fizji), fuzji oraz ich „ruchliwość” [161], co wiąże się również z procesem mitofagii, która wydaje się być uniwersalną drogą degradacji dysfunkcyjnych mitochondriów [162].





**Schemat 28:** (A) Budowa mitochondrium komórki zwierzęcej. (B) Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów. Schematy pochodzą z programu BioRender.com.

W ciągu ostatnich dziesięcioleci ujawniła się również ich rola jako głównych regulatorów kontrolujących odpowiedź na stres i śmierć komórek [5].

Istnieją związki małowcząsteczkowe, które wykazują bezpośrednie działanie na mitochondria poprzez hamowanie aktywności enzymów (katalizatorów reakcji zaangażowanych w oddychanie komórkowe) lub całych szlaków metabolicznych (takich jak fosforylacja oksydacyjna), aktywację stresu oksydacyjnego i wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) [5].

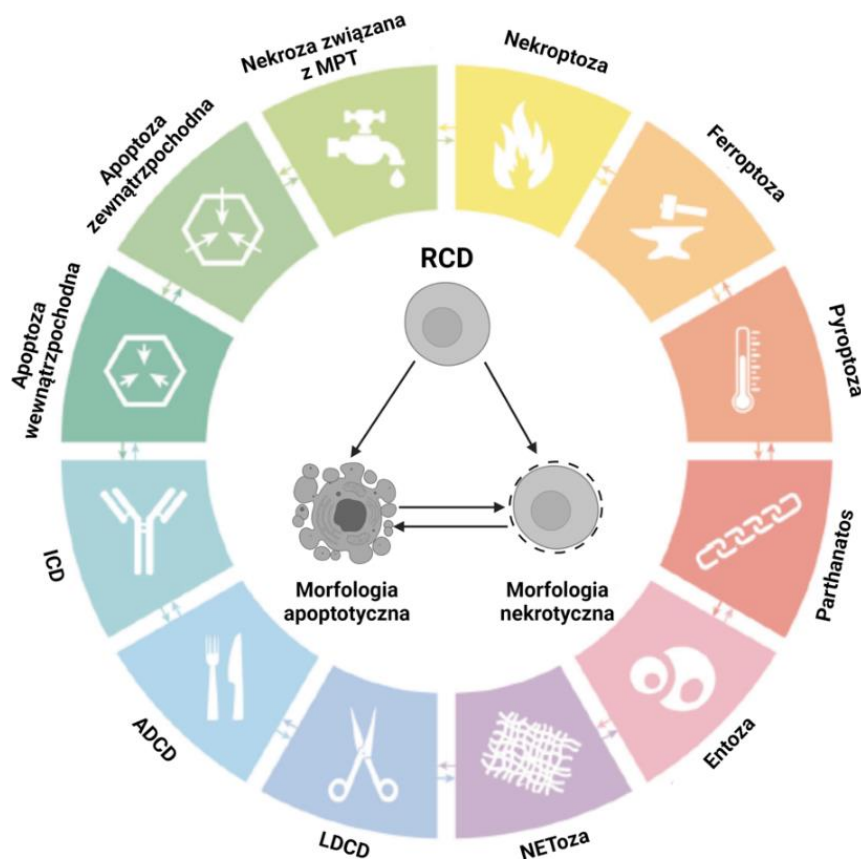
### 1.5.2. Regulowana śmierć komórkowa

Śmierć komórki może występować w wielu formach w odpowiedzi na różne stesy, zwłaszcza stres oksydacyjny. Utrata kontroli nad pojedynczymi lub mieszanymi typami śmierci komórkowej, przyczynia się do powstawania chorób człowieka takich jak nowotwory, choroby neurodegeneracyjne, autoimmunologiczne i zakaźne [163].

Obecny system klasyfikacji śmierci komórkowej został uaktualniony przez komitet ds. Nazewnictwa Śmierci Komórkowej (ang. Nomenclature Committee on Cell Death – NCCD), który formułuje wytyczne dotyczące definicji i interpretacji wszystkich aspektów śmierci komórki od 2005 roku. Aktualnie śmierć komórki można zasadniczo podzielić na przypadkową śmierć komórki, przypominającą pod względem morfologicznym nekrozę, która stanowi proces niekontrolowany, wywołany przez czynniki fizyczne i chemiczne (ang. accidental cell death; ACD), i regulowaną śmierć komórkową (ang. regulated cell death; RCD). Ta druga wykazuje natomiast cechy nekrozy i apoptozy oraz podlega modulacji przez czynniki farmakologiczne i genetyczne. ACD może być wywołana przez niespodziewany atak i uraz, który przerasta możliwe mechanizmy kontrolne komórki. W przeciwieństwie do niej, RCD wiąże się z precyzyjną aktywacją kaskad sygnałowych, jest realizowana przez zestaw określonych cząsteczek efektorowych i ma unikalne biochemiczne, funkcjonalne i immunologiczne konsekwencje. RCD jest również znana jako fizjologiczna śmierć komórkowa (ang. physiological cell death; PCD), gdy występuje w warunkach fizjologicznych i zachodzi ona wówczas w ramach procesów rozwojowych w celu utrzymania homeostazy wewnątrzkomórkowej [156, 163]. Niemniej, niezależnie od tego jakiej śmierci ulega komórka, uważa się, że to właśnie mitochondria biorą aktywny udział w każdym z jej rodzajów [163].

Ponadto w przypadku RCD, uwzględniono dodatkowy podział na śmierć zależną od kaspaz, która obejmuje apoptozę oraz pyroptozę, związaną również z aktywacją interleukin. Drugą grupę stanowią śmierci komórkowe niezwiązane z aktywacją kaspaz i wśród nich wyróżnić można: nekroptozę, ferroptozę (zostanie opisana w kolejnym podrozdziale), partanatos (związana z oksydacyjnym uszkodzeniem DNA), entozę (pochłanianie jednej komórki przez drugą), NETozę (związaną z tworzeniem zewnątrzkomórkowych „pułapek” przez neutrofile), śmierć związaną z lizosomami oraz autofagię (**Schemat 29**) [163].





**Schemat 29:** Klasyfikacja regulowanych śmierci komórkowych. Schemat pochodzi z publikacji [164] oraz został przekształcony w programie BioRender.com.

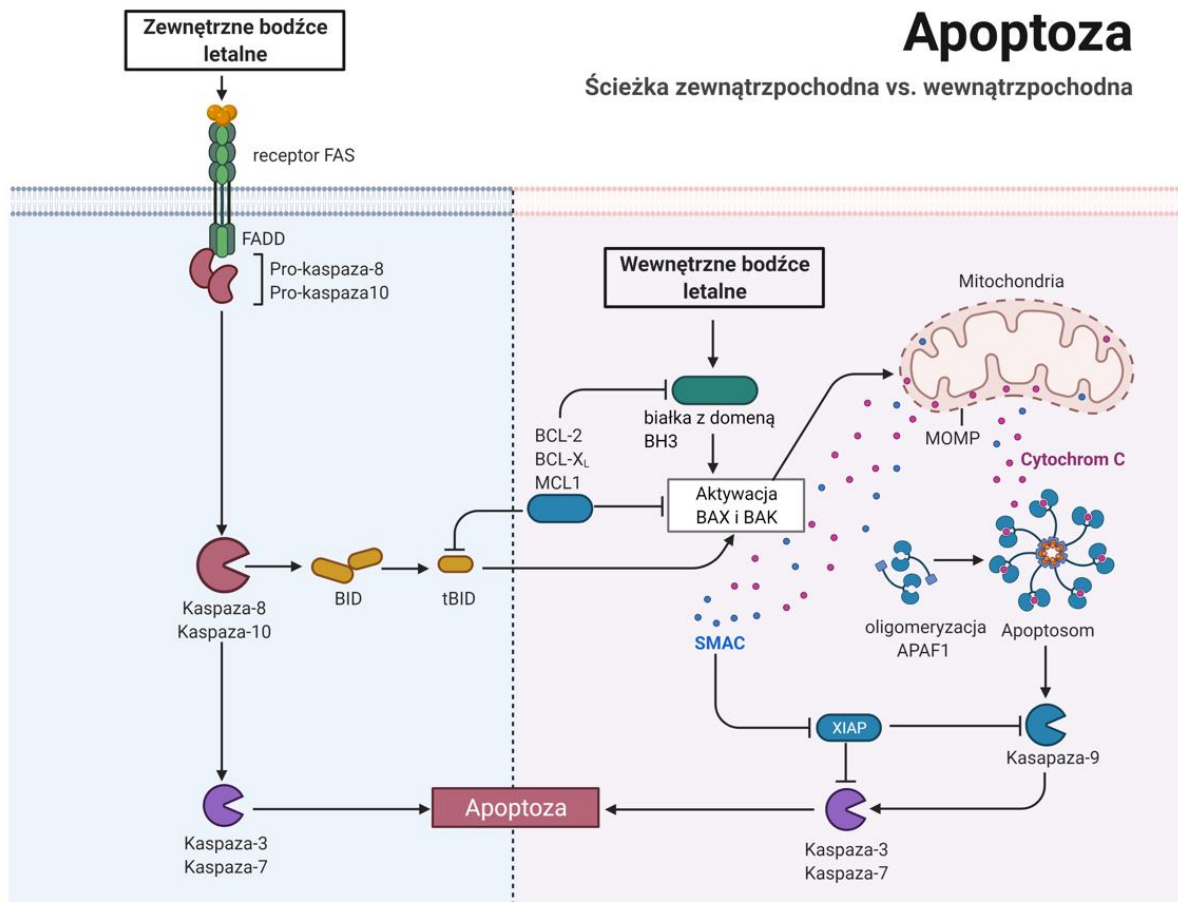
### 1.5.3. Apoptoza związana z mitochondriami

Wewnątrzpochodna (związana z mitochondriami) apoptoza jest formą RCD inicjowaną przez czynniki zewnętrzne oraz różne zakłócenia ze strony mikrośrodowiska, w tym ograniczenie czynników wzrostu, uszkodzenie DNA, stres retikulum endoplazmatycznego (ER), reaktywne formy tlenu (RFT) lub zmiany mikrotubularne. Komórki apoptotyczne zachowują integralność błony plazmatycznej i aktywność metaboliczną (do pewnego stopnia) w miarę postępu procesu, co pozwala na szybkie ich usunięcie przez makrofagi lub inne komórki o aktywności fagocytarnej [164]. W warunkach *in vitro*, apoptozę na końcowym etapie charakteryzuje całkowity rozpad błony plazmatycznej i nabycie morfotypu nekrotycznego (nekroza wtórna). Krytycznym etapem wewnątrzpochodnej apoptozy jest nieodwracalna i rozległa permeabilizacja zewnętrznej błony mitochondrialnej (MOMP) [164], która jest kontrolowana przez proapoptotycznych i antyapoptotycznych członków rodziny białek BCl-2. Białka proapoptotyczne (BID i BAX) wbudowują się w wewnętrzną błonę mitochondrialną i tworzą w niej pory, przez które następnie następuje przeciek protonów do wnętrza mitochondriów. Za powiększanie porów

odpowiada kolejne białko - BAK. Ostatecznie procesy te doprowadzają do obniżenia potencjału błony mitochondrialnej, upośledzenia łańcucha oddechowego, co prowadzi do uwolnienia białek mitochondrialnych (np. cytochrom C, somatyczny CYCS, białko mitochondrialne wiążące- diablo IAP, znane również jako Smac) [163]. W konsekwencji cytochrom c dociera do retikulum śródplazmatycznego i w ten sposób doprowadza do uwolnienia depozytu  $Ca^{2+}$ , zgromadzonego w tym organellum. Ponadto cytochrom c, tworzy kompleks z ATP, czynnikiem Apaf1 i kaspazą 9, zwany apoptosomem, co prowadzi do aktywacji kaspaz wykonawczych (CASP3, CASP6 i CASP7), które są uważane za kluczowe ze względu na ich funkcje prowadzące do nabycia apoptotycznego morfotypu. Do innych czynników regulujących wewnątrzpochodny szlak apoptozy należy również czynnik indukujący apoptozę (AIF), a także białko p53, które zwiększa przepuszczalność błony i przyczynia się w ten sposób do uwolnienia cytochromu c [163]. Cechy morfologiczne świadczące o indukcji apoptozy, to przede wszystkim kondensacja chromatyny, a następnie obkurczenie jądra komórkowego i jego fragmentacja. Wraz z rozwojem procesu na powierzchni komórki zaczynają tworzyć się pęcherzyki, prowadząc do powstania ciałek apoptoczących, zawierających między innymi fragmenty cytoplazmy organelli (**Schemat 30**) [156].

# Apoptoza

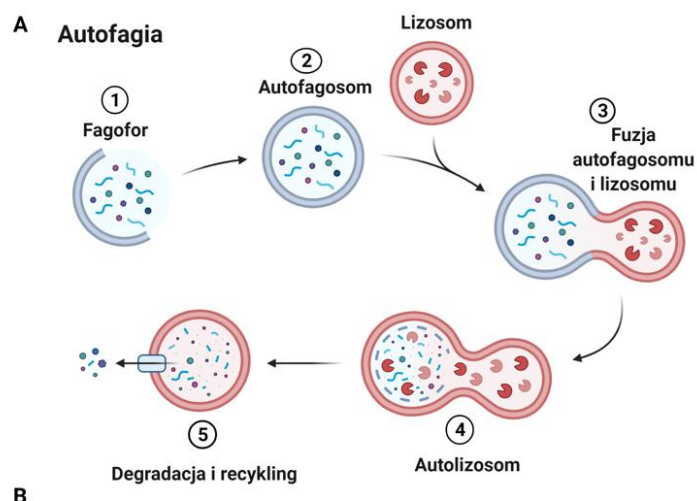
Ścieżka zewnątrzpochodna vs. wewnątrzpochodna



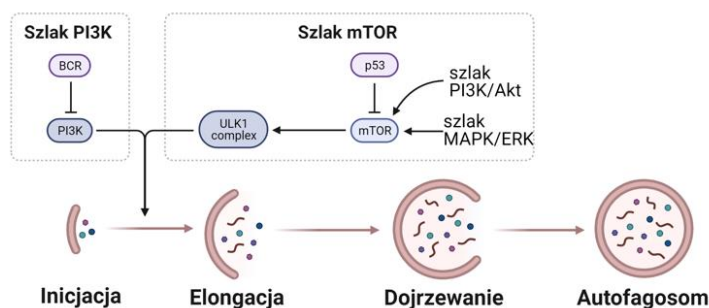
**Schemat 30:** Porównanie apoptozy zewnątrzpochodnej i wewnątrzpochodnej, która jest bezpośrednio związana z mitochondriami. Schemat pochodzi z programu BioRender.com.

## 1.5.4. Autofagia i mitofagia

Autofagia to wewnątrzkomórkowy proces degradacji uszkodzonych lub zbędnych elementów komórki, który zachodzi w stresujących warunkach, takich jak uszkodzenie organelli, obecność nieprawidłowych białek, niedotlenienie czy niedobór składników odżywczych [165]. Mechanizm autofagii inicjowany jest poprzez powstawanie autofagosomów, które wychwytyją zdegradowane składniki, a następnie łączą się z lizosomami w celu ich recyklingu (**Schemat 31A**). Mimo, że głównym zadaniem autofagii jest utrzymanie homeostazy wewnątrzkomórkowej między wytwarzaniem a degradacją składników komórkowych, jest ona także określana jako programowana śmierć komórki typu II [163]. Do indukcji autofagii przyczyniać się mogą różne czynniki, m.in.: brak pożywienia, niedotlenienie, cytokiny, hormony, uszkodzenie struktury DNA. Modulacja autofagii pełni również podwójną funkcję w supresji i promocji guza w wielu nowotworach (**Schemat 31B**) [165].



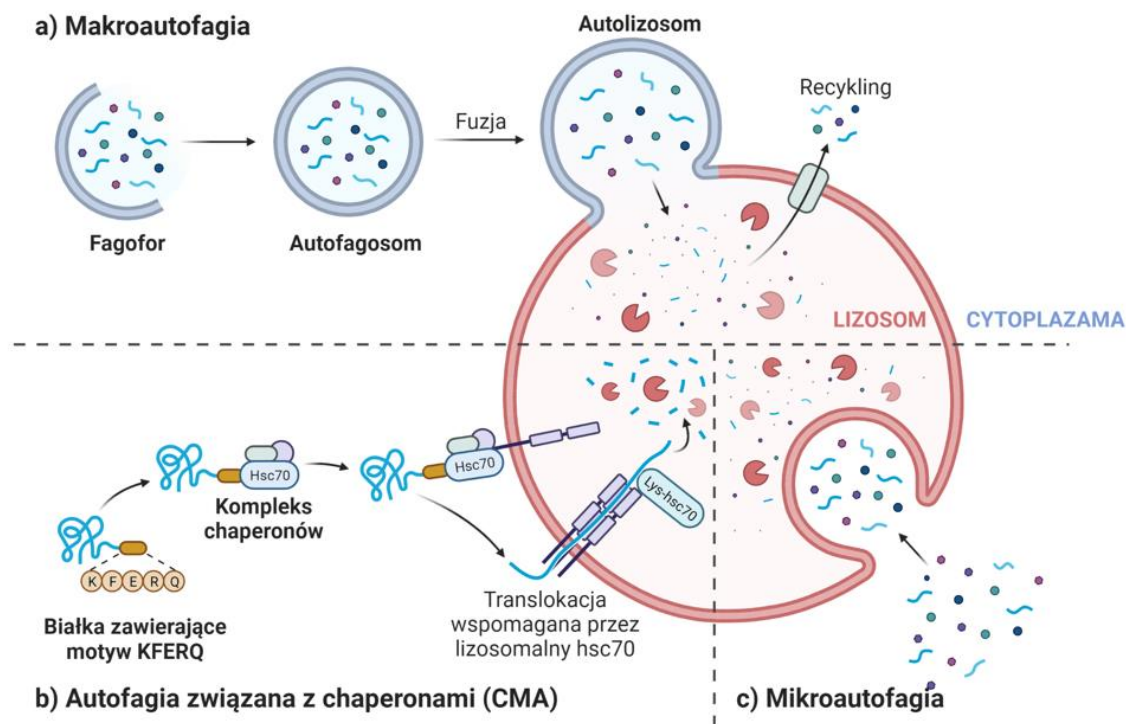
### B AUTOFAGIA W SZLAKACH NOWOTWOROWYCH



**Schemat 31:** (A) Przebieg procesu autofagii prowadzący do rozkładu cząsteczek chemicznych, fragmentów komórki i organelli komórkowych. (B) Główne szlaki zaangażowane w proces autofagii w komórkach nowotworowych. Spadek dostępności składników odżywczych indukuje autofagię w komórkach eukariotycznych poprzez inhibicję mTOR (target of rapamycin). Blokowanie sygnalizacji PI3K/Akt jest znane jako kanoniczny szlak indukujący autofagię. Schemat pochodzi z programu BioRender.com.

Kluczową rolę podczas aktywacji autofagii odgrywa Beclin 1, która uczestniczy w formowaniu fagoforu i jego powiększaniu [163]. Ponadto wykazano, że pozytywnymi regulatorami autofagii, są znane geny supresorowe (m. in. AMPK i PTEN); podczas gdy wiele onkogenów, w tym PI3K klasy I, Akt i antyapoptotyczne białka rodziny Bcl-2, hamują autofagię [163, 165, 166], co dodatkowo potwierdza tezę, że autofagia hamuje nowotworzenie. Obecnie przyjmuje się, że istnieją dwa rodzaje autofagii: nieselektywna i selektywna (Schemat 32). W odpowiedzi na np. niedobór składników odżywczych, nieselektywna autofagia jest aktywowana w celu dostarczenia komórkom niezbędnych aminokwasów i składników odżywczych potrzebnych do przeżycia. Natomiast autofagia selektywna ma na celu specyficzne usunięcie uszkodzonych lub nadmiernych organelli lub agregatów białkowych, nawet w warunkach bogatych w składniki odżywcze. Dobrze

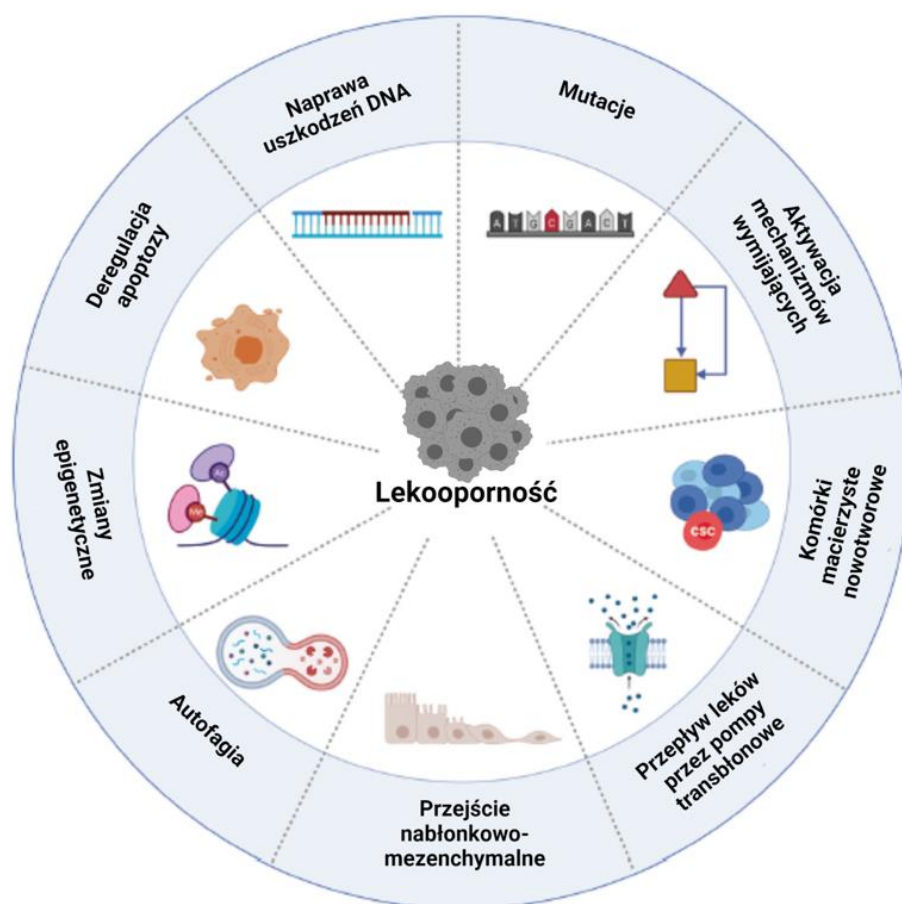
zbadanym rodzajem selektywnej autofagii jest mitofagia, która wybiórczo usuwa uszkodzone lub występujące w nadmiarze mitochondria [167]. Mitofagia wraz z procesami odpowiedzialnymi za dynamikę mitochondriów, odgrywa kluczową rolę w wyrównaniu poziomu metabolitów[167].



Schemat 32: Rodzaje autofagii. Schemat pochodzi z programu BioRender.com.

## 1.6. Wpływ związków małowcząsteczkowych na status oksydacyjny komórek glejaka wielopostaciowego

Glejak wielopostaciowy (GBM) jest najbardziej powszechnym i inwazyjnym, dużym guzem mózgu u dorosłych [168]. Pozostaje on jednak poza zasięgiem dotychczasowych terapii, co daje pacjentom krótkie okno terapeutyczne [169]. Większość pacjentów z GBM umiera w ciągu 15 miesięcy od rozpoznania [170]. Jest spowodowane głównie ograniczonym działaniem leków w komórkach guza oraz opornością guza na chemioterapię pod wpływem różnych mechanizmów zachodzących w komórce nowotworowej (**Schemat 33**) [171]. Dlatego też istnieje ogromna potrzeba opracowania bardziej skutecznych terapii celowanych, które wpływają na metabolizm energetyczny komórek GBM, aby zwiększyć ich reaktywność na leki [168, 172].



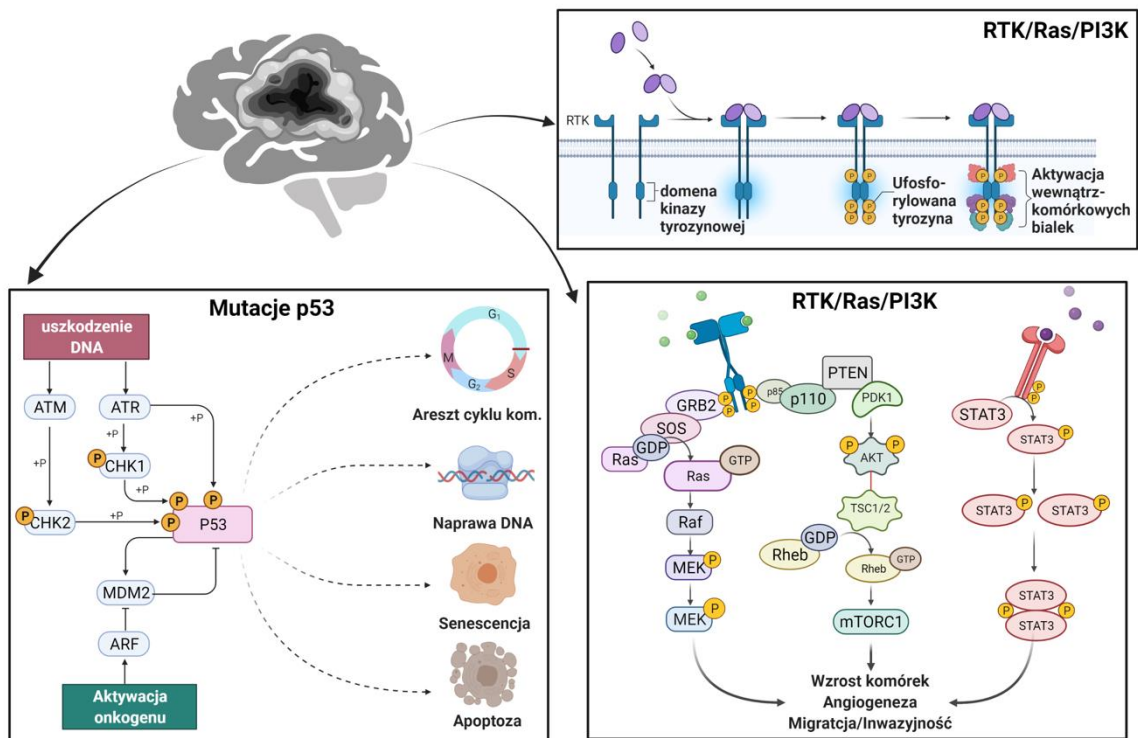
**Schemat 33:** Mechanizmy wpływające na lekooporność komórek nowotworowych. Schemat pochodzi z publikacji [173] i powstał w programie BioRender.com.

Obecne metody leczenia glejaka wielopostaciowego to przede wszystkim połączenie chirurgicznego wycięcia guza, następnie radioterapii i w ostateczności chemioterapii adjuwantowej [168].

Ponadto, GBM wykazuje wysoką heterogenność wewnątrz guza [174], a szybka jego progresja jest związana przede wszystkim z molekularną charakterystyką tego nowotworu. Do tej pory zidentyfikowano trzy główne szlaki sygnałowe, które ulegają największej deregulacji w glejaku, a mianowicie aktywację szlaku receptora kinazy tyrozynowej (RTK)/Ras/kinazy 3-fosfoinozytowej (PI3K), mutacje p53 (**Schemat 34**) oraz indukcję szlaków sygnałowych białka retinoblastoma (Rb) (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; [168]). Konieczna jest zatem identyfikacja nowych leków potencjalnie zdolnych do wykorzystania wrażliwości metabolicznej komórek nowotworowych i ich wpływu na molekularne markery GBM [172, 174-176].



## Deregulacja szlaków sygnałowych w GBM



**Schemat 34:** Podstawowe ścieżki sygnałowe ulegające deregulacji w glejaku wielopostaciowym. Schemat powstał w programie BioRender.com, na podstawie [168].

Dotychczas zbadano szereg małych związków o potencjalnym działaniu hamującym kluczowe szlaki sygnałowe w komórkach glejaka i oceniano ich skuteczność [172, 177]. Obecnie, nie jest jasne czy wspomniane powyżej nieprawidłowości w funkcjonowaniu maszyny molekularnej komórek glejaka mogą wynikać głównie z podwyższonego podstawowego poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w tych komórkach, czy też składają się na to inne czynniki. Jednak brak równowagi pomiędzy dostarczaniem tlenu, jego wydajnością i zużyciem, powoduje powstawanie środowiska prozapalnego, migrację i proliferację komórek nowotworowych, oporność na leki, a w końcu ucieczkę przed śmiercią komórkową [178, 179]. Stres oksydacyjny (SO) może uszkadzać i modyfikować białka, lipidy i DNA, jednak komórki glejaka mogą przetrwać i adaptować się w takim hipoksyjnym środowisku, co umożliwia im oporność na leczenie [179].

Dlatego też istnieje pilna potrzeba zaprojektowania nowych terapeutycznych związków o małej masie cząsteczkowej, które mogłyby modulować status redoks komórek GBM i indukować śmierć komórek poprzez stres oksydacyjny i szlak apoptozy. Chlorochina, temozolomid, kannabidiol, berberyna i bromopirogronian są dobrze znanymi lekami przeciwnowotworowymi, które wpływają na status redoks komórek GBM. Większość z tych

związków to antymetabolity, które strukturalnie upodabniają się do naturalnych substratów i wpływają na funkcjonowanie mitochondriów poprzez zwiększoną produkcję RFT [177]. Wydaje się więc, że są to obiecujące i poszukiwane narzędzia terapeutyczne. Związki małowczątkowe mogą mieć duży potencjał w zakresie leczenia GBM, ze względu na swoją biodostępność i aktywność proapoptotyczną.

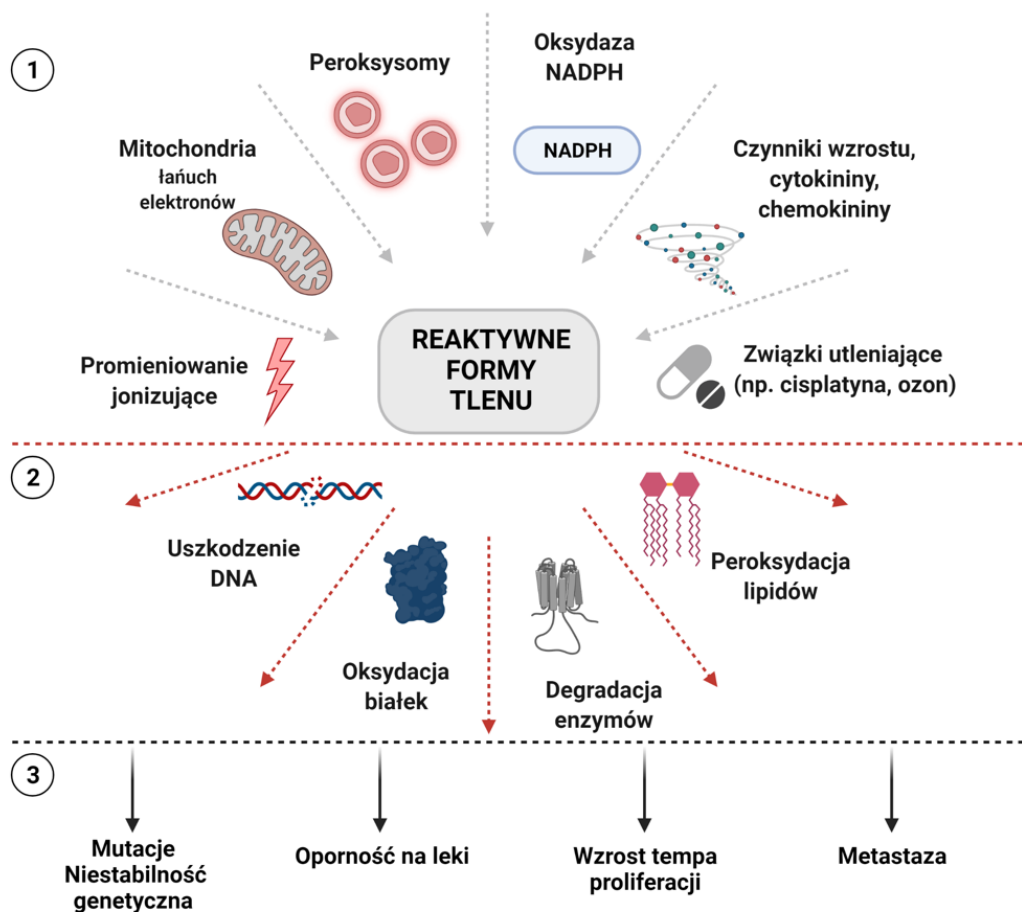
### 1.6.1. *Reaktywne formy tlenu*

Reaktywne formy tlenu (RFT) wytwarzane są w komórkach eukariotycznych w procesie metabolizmu tlenowego, w wyniku działania mitochondrialnego łańcucha oddechowego i są regulatorami ważnych szlaków sygnałowych. Fosforylacja oksydacyjna w mitochondriach obejmuje cztery kompleksy transportujące elektrony (pochodzące z początkowego utleniania NADPH i FADH<sub>2</sub>) i syntazę ATP, a proces ten kończy się wypompowaniem protonów poza mitochondria (**Schemat 35**) [180].

RFT to cząsteczki zawierające tlen o wysokiej reaktywności, tworzące dużą grupę, do której należą: wolne rodniki hydroksylowe (HO\*) i ponadtlenkowe (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) oraz cząsteczki nierodnikowe, takie jak nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), który jest mniej reaktywny niż większość RFT, ale jest w stanie dotrzeć do każdego przedziału komórkowego zanim zostanie przekształcony przez peroksydoksyny i peroksydazy glutationowe w wodę i tlen. Ponadto, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odgrywa rolę przekaźnika w niektórych szlakach, które obejmują transdukcję sygnałów zewnątrzkomórkowych i kontrolę ekspresji genów, przyczyniając się do tzw. *sygnalizacji redoks* [180, 181].

RFT oprócz tego, że są produkowane w mitochondriach (~1-2% O<sub>2</sub> jest redukowane do postaci anionów ponadtlenkowych), powstają również w peroksysomach (poprzez β-oksydację kwasów tłuszczowych) oraz w retikulum endoplazmatycznym (poprzez utlenianie białek). Oprócz tego są generowane w wyniku działania czynników fizycznych (promieniowanie ultrafioletowe i ciepło) oraz po chemioterapii i radioterapii w chorobach nowotworowych (**Schemat 35**) [179].



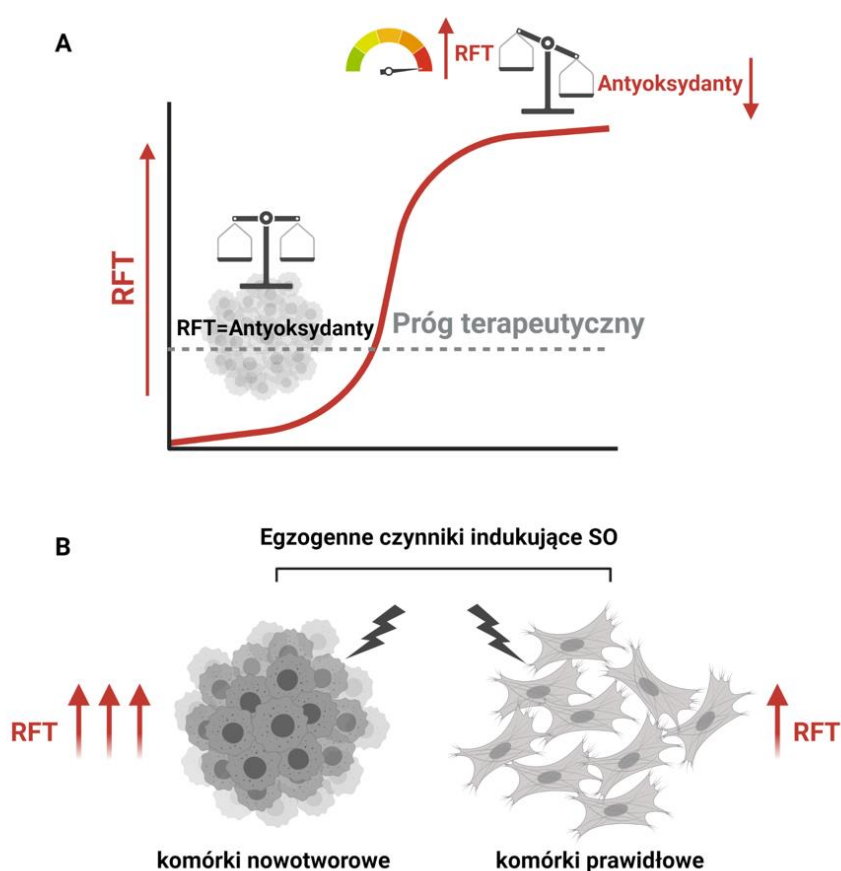


**Schemat 35:** Endogenne i egzogenne czynniki indukujące powstawanie reaktywnych form tlenu (1), co prowadzi do uszkodzenia struktur wewnątrzkomórkowych (2) oraz aktywacji mechanizmów sprzyjających nowotworzeniu (3). Schemat powstał w programie BioRender.com, na podstawie [180].

Ścisła regulacja poziomu RFT jest kluczowa dla życia komórkowego, ponieważ umiarkowany ich poziom przyczynia się do kontroli proliferacji i różnicowania komórek. W komórkach eukariotycznych homeostaza RFT zapewniona jest dzięki działaniu systemów antyoksydacyjnych, do których zaliczają się dysmutaza nadtlenkowa (SOD), zlokalizowana w cytoplazmie, mitochondriach i macierzy pozakomórkowej; peroksydaza glutationowa (GPX), reduktaza glutationowa (GR), peroksyredoksyna, tioredoksyna i katalaza. Zaburzenie równowagi między wytwarzaniem RFT a wydajnością systemów antyoksydacyjnych prowadzi do indukcji stresu oksydacyjnego [179, 180],

Istnieją dwie hipotezy opisujące efekty działania RFT w komórkach nowotworowych. Pierwsza z nich to koncepcja „progu dla terapii nowotworowej”, która mówi, że wraz ze wzrostem ilości RFT w komórkach nowotworowych, stosunek pomiędzy RFT i

antyoksydantami jest utrzymywany w dobrze kontrolowanej stałej równowadze, po której każdy dalszy wzrost RFT lub redukcja antyoksydantów, spowoduje śmierć komórki lub zwiększoną wrażliwość na terapię (**Schemat 36A**) [182, 183]. Druga hipoteza sugeruje, że kiedy zarówno komórki nowotworowe i prawidłowe są poddane działaniu porównywalnych poziomów egzogennych czynników wytwarzających RFT, wewnątrzkomórkowy poziom RFT w komórkach nowotworowych wzrasta szybciej niż w komórkach prawidłowych, aby osiągnąć próg i indukować śmierć komórki (**Schemat 36B**) [184]. Zmiany indukowane podczas nowotworzenia prowadzą do zmian stanu redoks w komórkach nowotworowych, aktywując SO.



**Schemat 36:** Hipotezy opisujące efekty działania RFT w komórkach nowotworowych. **(A)** Koncepcja tzw. „progu dla terapii przeciwnowotworowej. **(B)** Indukcja SO ma miejsce zarówno w komórkach nowotworowych, jak i prawidłowych, ale u tych pierwszych poziom RFT wzrasta szybciej. Liczba czerwonych strzałek obrazuje nasilenie tego procesu. Schemat powstał w programie BioRender.com, na podstawie publikacji [183, 184].

W wyniku działania reaktywnych form tlenu dochodzi do uszkodzeń wewnątrzkomórkowych, między innymi lipidów, białek, DNA [185] czy RNA [186]

(Schemat 35). Oddziałując z lipidami, RFT mogą wywoływać stres oksydacyjny poprzez peroksydację kwasów tłuszczowych, która zmienia dwuwarstwę lipidową błon komórkowych i generuje wolne rodniki. Proces ten jest potencjalnie niebezpieczny dla komórek, ponieważ peroksydacja mitochondrialnych fosfolipidów może wpływać na integralność porów odpowiedzialnych za przenikalność (mitochondrialne kanały jonowe) i dezagregować kompleksy: I i III łańcucha oddechowego, tym samym zwiększając ucieczkę elektronów w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Jednakże, wolne rodniki wytwarzane w wyniku peroksydacji lipidów są krótkotrwałe. Poprzez oddziaływanie z białkami, RFT mają wpływ na kilka szlaków sygnałowych zaangażowanych w kontrolę proliferacji i apoptozy komórek [176, 180, 183].

Ponadto, tak zwiększony poziom RFT prowadzi do wytworzenia oporności komórek nowotworowych wobec leków, co powoduje rozwój nowotworu i powstawanie przerzutów w trakcie lub po chemioterapii [180, 187].

#### 1.6.2. *RFT a śmierć komórkowa*

RFT przyczyniają się do aktywacji programowanej śmierci komórkowej (PCD). Wywołane przez zewnętrzną lub wewnętrzną ścieżkę, a następnie indukowane przez kaspazy, PCD kończy się powstaniem ciałek apoptotycznych, które następnie są eliminowane przez przylegające fagocyty [188]. W szlaku zewnątrzpo pochodnym pośredniczą ligandy indukujące śmierć, takie jak TNF $\alpha$  (czynnik martwicy nowotworów, ang. tumor necrosis factor  $\alpha$ ) i ligand Fas (białko transbłonowe typu II), które wiążą się z odpowiednimi receptorami, które z kolei rekrutują białka adaptorowe i prokaspazy, co prowadzi do utworzenia kompleksu sygnałowego śmierci (DISC) i aktywacji kaspaz efektorowych [184]. Jednak w przypadku większości leków przeciwnowotworowych związanych z RFT, apoptoza zależy od aktywacji wewnętrznej ścieżki, która obejmuje kanały mitochondrialne PTP (ang. permeability transition pore), których przepuszczalność zwiększa się wraz z cytoplazmatycznym uwalnianiem czynników proapoptotycznych, takich jak cytochrom c [180].

Interesującym podejściem terapeutycznym okazuje się być również indukcja programowanej śmierci komórkowej typu II- autofagii, przez reaktywne formy tlenu. Wykazano między innymi, że H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukuje autofagię poprzez inaktywację genu związanego z autofagią- ATG4, co prowadzi do zwiększenia ilości autofagosomów związanych z białkiem LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) [189, 190]. Ponadto, RFT generowane np. po zwiększeniu metabolizmu energetycznego, są również zdolne do

indukowania nekrozy, która początkowo była uważana za nieuregulowaną formę śmierci komórki, ale obecnie jest uznawana za programowaną śmierć komórki typu III [191].

Ostatnio coraz częściej wspomina się o RFT w kontekście ferroptozy. Proces ten jest nowo odkrytym typem programowanej śmierci komórki, która zachodzi w wyniku dużej akumulacji żelaza i peroksydacji lipidów. Czynniki indukujące ferroptozę mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na peroksydazę glutationową (GPX), w wyniku czego dochodzi do zmniejszenia zdolności antyoksydacyjnej i akumulacji lipidowych reaktywnych form tlenu w komórkach. Ostatnie badania wykazały, że ferroptoza jest ściśle związana z procesami patofizjologicznymi wielu chorób, takich jak nowotwory, choroby układu nerwowego, uszkodzenia nerek i choroby krwi [192, 193].

## 2. CEL PRACY

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej jest analiza mechanizmu działania i właściwości proapoptotycznych N<sup>6</sup>-furfuryloadenozyny (rybozyd kinetyny, RK) oraz jej pochodnych w komórkach nowotworowych.

Dotychczas wykazano, że rybozyd kinetyny wywiera modulujący wpływ na komórki poprzez selektywne działanie na różne etapy sygnalizacji wewnątrzkomórkowej oraz kaskadę zdarzeń istotnych dla funkcjonowania komórek, takich jak proliferacja czy apoptoza.

Dlatego kluczowe było znalezienie powiązania pomiędzy gwałtowną redukcją ilości ATP w komórkach w obecności RK oraz reakcjami enzymatycznymi, w które jest zaangażowany, takich jak szlaki: rezerwowy, kataboliczny i *de novo*. Aby poznać proapoptotyczny wpływ związków niskocząsteczkowych na komórki nowotworowe, przeanalizowałam także serię pochodnych RK na wybranych liniach komórkowych. Stosowane przeze mnie pochodne mają wprowadzone modyfikacje zarówno w pierścieniu purynowym i/lub w obrębie reszty cukrowej.

W moich badaniach podjęłam próbę potwierdzenia złożoności mechanizmu działania RK oraz ustalenia, czy mitochondrialna śmierć komórki, jest wynikiem kaskady powiązanych ze sobą zdarzeń. W tym celu stworzyłam między innymi schemat postępowania eksperymentalnego, wykorzystujący galaktozę jako podstawowe źródło węglowodanów w pożywce, aby porównać efekt działania tego związku w dwóch różnych środowiskach hodowlanych i potwierdzić jego wpływ na zaburzenie funkcjonowania mitochondriów. Pozwoliło to na przeprowadzenie eksperymentów związanych z zaburzeniem równowagi energetycznej indukacją stresu oksydacyjnego po traktowaniu RK, a później jego pochodnymi.

**Badania realizowane były w trzech głównych etapach (zobrazowane na załączonym schemacie):**

1. Udział rybozydu kinetyny w metabolizmie nukleozydów purynowych (szlaki: *de novo*, rezerwowy i kataboliczny) i jego wpływ na dynamikę purynomu, proteomu i metabolomu (formowanie purynosomu),
2. Wpływ rybozydu kinetyny na funkcjonowanie i bioenergetykę mitochondriów oraz indukację stresu oksydacyjnego komórek nowotworu wątrobowokomórkowego oraz aktywację różnych procesów komórkowych z nimi związanych (apoptoza/nekroza, autofagia, mitofagia, ferroptoza),

3. Wpływ rybozydu kinetyny i jego pochodnych na status redoks komórek glejaka wielopostaciowego. Potencjalne wykorzystanie związków w terapiach oksydacyjnych.

Część zagadnień omawianych w niniejszej pracy została zawarta w publikacjach:

1. *Circumventing the Crabtree effect: forcing oxidative phosphorylation (OXPHOS) via galactose medium increases sensitivity of HepG2 cells to the purine derivative kinetin riboside*

Orlicka-Płocka Marta, Gurda-Woźna Dorota, Fedoruk-Wyszomirska Agnieszka, Wyszko Eliza.

Apoptosis. 2020 Sep 21. doi: 10.1007/s10495-020-01637-x

2. *Implications of Oxidative Stress in Glioblastoma Multiforme Following Treatment with Purine Derivatives*

Orlicka-Płocka Marta, Fedoruk-Wyszomirska Agnieszka, Gurda-Woźna Dorota, Pawelczak Paweł, Krawczyk Patrycja, Giel-Pietraszuk Małgorzata, Framski Grzegorz, Ostrowski Tomasz, Wyszko Eliza

Antioxidants (Basel). 2021 Jun 12;10(6):950. doi: 10.3390/antiox10060950.

Pozostałe wyniki zostaną opublikowane w późniejszym terminie (w przygotowaniu dwie publikacje: 1. *Involvement of kinetin riboside as an adenosine derivative in the metabolic flux determining the serious cellular consequences leading to apoptosis* oraz 2. *Autophagy and lysosomal cell death in kinetin riboside toxicity during cancer therapy*).

Rezultaty uzyskane w trakcie realizacji badań prezentowane były również podczas konferencji naukowych:

1. Wystąpienie ustne (język polski): *Zmiana potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem działania rybozydu kinetyny*

Autor prezentacji: Marta Orlicka-Płocka

VII wykłady otwarte z cyklu: Spotkania Młodych z Nauką w Poznaniu. Konferencja organizowana przez Studenckie Koło Naukowe „Biosfera” 9.04.2016r. w Centrum Biologii Medycznej w Poznaniu

2. Poster: *Effect of kinetin riboside on proapoptotic activities in human cancer and normal cell lines*

Autorzy: Orlicka-Płocka M., Gurda D., Fedoruk-Wyszomirska A., Barciszewski J., Wyszko E.

XVII Europejski Kongres Biotechnologiczny (17th European Congress of Biotechnology), Kraków, 3-6.07.2016r.

3. Poster: *Kinetin riboside acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics*

Autorzy: Orlicka-Płocka M., Fedoruk-Wyszomirska A., Gurda D., Grobys D., Kmita H., Wyszko E.

8th World Congress on Targeting Mitochondria, Berlin, 23-4.10.2017r.

4. Poster: *Kinetin riboside – potential anticancer agent acting via rapid cellular ATP depletion leading to mitochondrial electron transport chain disruption*

Autorzy: Orlicka-Płocka M., Fedoruk-Wyszomirska A., Gurda D., Kmita H., Wyszko E.

6th Mitochondrion, Poznań, 8.12.2017r.

5. Wystąpienie ustne: *Circumventing the Crabtree effect forcing oxidative phosphorylation (OXPHOS) via galactose medium increases sensitivity of HepG2 cells to the purine derivative kinetin riboside*

Autor prezentacji: Marta Orlicka-Płocka

7th Edition - Webinar on “Cancer Research & Therapy”; Innovinc International Conferences, 17-18.03.2021r.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Linie komórkowe wykorzystane w badaniach

**HepG2 (ECACC)** – ludzka linia komórek nowotworu wątroby, która została wyprowadzona w 1975 roku z tkanki wątroby 15-letniego mężczyzny, z dobrze zróżnicowanym nowotworem wątrobowokomórkowym. Pożywka EMEM (ATCC; Corning®)

**T98G (ATCC)** – ludzka nowotworowa linia komórkowa glejaka wielopostaciowego wykorzystywana w badaniach nad nowotworem mózgu i opracowywaniu leków. Pożywka EMEM (ATCC; Corning®)

**T47D (ECACC)** – ludzka linia komórek raka piersi, powszechnie stosowana w badaniach biomedycznych obejmujących hormonalną ekspresję komórek rakowych. Pożywka RPMI 1640 (Corning®)

**A172 (ATCC)** – ludzka nowotworowa linia komórkowa glejaka wielopostaciowego, często stosowana podczas testowania leków z wykorzystaniem sferoidów. Pożywka EMEM (ATCC; Corning®)

**MRC-5 (ATCC)** – linia komórkowa prawidłowych, nienowotworowych, ludzkich fibroblastów, pierwotnie uzyskanych z tkanki płucnej; stanowiącą nienowotworową kontrolę. Pożywka EMEM (ATCC; Corning®)

#### 3.2. Utrzymywanie i przechowywanie linii komórkowych

Do namnożenia wszystkich rodzajów komórek, w celu przygotowania odpowiedniej ilości materiału, wykorzystywane były butelki T75 do hodowli linii komórkowych (75 cm<sup>3</sup>, Corning®). Komórki wysiewano w ilości 1,5 x 10<sup>7</sup>. Hodowlę prowadzono w 10 ml pożywki uzupełnionej 10% surowicą bydlęcą (FBS, Corning®) i 1% antybiotykami (roztwór penicyliny i streptomycyny, ATCC; Corning®), dedykowanej dla konkretnej linii komórkowej (wskazane w podrozdziale 3.1.), w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> do osiągnięcia 80% konfluencji. Co 24 h pożywkę wymieniano na świeżą. W celu odklejenia komórek od podłoża, butelki hodowlane przemywano dwukrotnie buforem PBS, a następnie dodawano 3 ml roztworu trypsyny 1x (0,05% trypsyny, 0,53 mM EDTA, Corning®) i inkubowano 2 min. w 37°C. Do uzyskanej zawiesiny dodawano 6 ml odpowiedniej pożywki i całość wirowano 3 min. z prędkością 1500 rpm w temperaturze 22-25°C. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w świeżej pożywce. Następnie, część komórek wysiewano



ponownie na butelki T75, a część przygotowywano do przechowywania w ciekłym azocie. W tym celu, supernatant usuwano, a osad zawieszano w 1 ml pożywki uzupełnionej 20% FBS z dodatkiem 10% DMSO. Całość przenoszono do probówki przystosowanej do przechowywania w ciekłym azocie i poddawano powolnemu zamrażaniu (1°C/min) w temperaturze -80°C. Po upływie 24 h probówki przenoszono do ciekłego azotu w celu dalszego przechowywania.

### 3.3. Spis związków chemicznych wykorzystywanych w eksperymentach

Odczynnik	Producent
Rybozyd kinetyny	Sigma-Aldrich
3-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu (CCCP)	Sigma-Aldrich
2-deoksy-D-glukoza (2-DG)	Sigma-Aldrich
2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino)-2-deoksyglukoza (2-NBDG)	ThermoFisher Scientific
Menadion	Sigma-Aldrich

*Odczynniki chemiczne (i ich producenci) wykorzystane w eksperymentach oraz hodowli komórek, zostały opisane w poniższym tekście oraz w podrozdziałach 3.1. i 3.2.*

### 3.4. Udział rybozydu kinetyny w metabolizmie puryn

#### 3.4.1. Synteza N<sup>6</sup>-furfurylo-(1'-<sup>13</sup>C)adenozyny

N<sup>6</sup>-furfurylo-[1'-<sup>13</sup>C]adenozyna została zsyntetyzowana w Zakładzie Chemii Komponentów Kwasów Nukleinowych IChB PAN, począwszy od [1'-<sup>13</sup>C]adenozyny (Omicron Biochemicals, Inc.) zgodnie z metodą opisaną wcześniej dla N<sup>6</sup>-furfuryladenozyny w publikacji [194]. Otrzymany związek został ostatecznie oczyszczony poprzez krystalizację z metanolu. Jego strukturę i czystość potwierdzono za pomocą widm <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, zarejestrowanych na spektrometrze Bruker 400, odpowiednio przy częstotliwościach 400,1 MHz i 100,6 MHz.

### **3.4.2. Hodowla komórek**

Komórki ludzkiego raka wątrobowokomórkowego (HepG2) hodowano w pożywce Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) zawierającej niezbędne aminokwasy, 2 mM L-glutaminę, 1 mM pirogronian sodu i 1500 mg/L wodorowęglanu sodu, uzupełnionej 10% FBS (Corning®) i 1% antybiotykami (roztwór penicyliny i streptomycyny). Komórki hodowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Do analiz związanych z metabolizmem puryn wykorzystano linię komórkową HepG2, ze względu na to, że rybozyd kinetyny indukuje apoptozę poprzez aktywację szlaku wewnątrzpochodnego, bezpośrednio związanego z mitochondriami. W badaniach zdecydowano się na linię komórkową HepG2, ze względu posiadane przez nią właściwości. Między innymi cechuje ją wysoka liczba mitochondriów oraz jest ona częstym modelem wykorzystywanym podczas testowania potencjalnych leków, zaburzających prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów.

### **3.4.3. Analiza proliferacji komórek w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu xCELLigence**

Analizę proliferacji komórek w czasie rzeczywistym przeprowadzono przy użyciu systemu xCELLigence (Roche), który dynamicznie monitoruje wzrost komórek w oparciu o pomiar impedancji wyrażany jako indeks komórkowy (CI, cell index), który odzwierciedla zmiany w liczbie komórek, ich wielkości, morfologii lub zdolności do adhezji. Analizę uzyskanych w trakcie pomiaru wartości indeksu komórkowego (CI) oraz ich normalizację przeprowadzono przy użyciu oprogramowania RTCA 1.2.1. W celu pomiaru wartości tła i kalibracji, do 16-dołkowych E-płytek (Roche), pokrytych mikroczipami zintegrowanymi z dnem płytki, dodawano porcje 100 µl uzupełnionego medium. Następnie komórki HepG2 wysiewano w dodatkowych 50 µl pożywki, w ilości 5 x 10<sup>3</sup> komórek na dołek i pozostawiono je na 30 min w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, w celu przytwierdzenia do podłoża, zanim rozpoczęto pomiar. Optymalizacja gęstości komórek została zapewniona przez wstępne eksperymenty. Po 24 h komórki poddawano działaniu RK w końcowych stężeniach 40, 80 i 200 µM i jednocześnie 1 µM 5-jodotubercydyny (inhibitor kinazy adenylozy- ADK). Końcowa objętość podłoża wzrostowego w każdym dołku E-płytki wynosiła 200 µl. Komórki kontrolne były hodowane tylko w podłożu uzupełnionym. Proliferacja komórek HepG2 w czasie rzeczywistym była monitorowana w 30 min. odstępach czasowych od momentu posiewu przez 96 h.

#### ***3.4.4. Oznaczanie poziomu apoptozy/nekrozy metodą cytometrii przepływowej***

Oznaczanie poziomu apoptozy/nekrozy przeprowadzono stosując podwójne barwienie znacznikami fluorescencyjnymi CellEvent™ Caspase 3/7- FITC (ThermoFisher Scientific) i 7-AAD (BD-Pharmigen) o wzbudzeniu/emisji odpowiednio przy długości fali 503/530 nm i 535/617 nm. Komórki HepG2 ( $4 \times 10^5$ ) wysiano na płytce 6-dołkowej w pożywce EMEM i inkubowano do momentu osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie komórki traktowano rybozydem kinetyny (RK) w stężeniu końcowym 40, 80 i 200  $\mu\text{M}$  oraz jednocześnie z 1  $\mu\text{M}$  5-jodotubercydyną. Po 24h komórki poddano trypsynizacji, przemywano dwukrotnie 1 ml DPBS i barwiono CellEvent™ Caspase 3/7-FITC (10  $\mu\text{M}/1 \text{ ml}$ ) i 7-AAD (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zgodnie z protokołem producenta przez 30 min., w 37°C, w ciemności. Po wybarwieniu komórki analizowano przy wzbudzeniu 488 nm za pomocą cytometru przepływowego Accuri C6 (Becton Dickinson).

#### ***3.4.5. Pomiary stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2 metodą cytometrii przepływowej***

Komórki HepG2 wysiano na płytkach 6-dołkowych, w ilości  $4 \times 10^5$ / dołek, hodowano do uzyskania 70-80% konfluencji. Następnie komórki inkubowano przez 24 h w obecności RK w stężeniu końcowym 80 i 200  $\mu\text{M}$ . W kolejnym etapie komórki odklejano od podłoża za pomocą trypsyny i przemywano dwukrotnie 1 ml DPBS, a poziom wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT) analizowano poprzez barwienie dwuocetanem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) (ex/em: ~492-495/517-527 nm) zgodnie z protokołem producenta. Po zwirowaniu komórek, odrzucano supernatant, a osady komórkowe zawieszano w 0,5 ml DPBS zawierającego  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  w końcowym stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ . Następnie komórki inkubowano w temperaturze 37°C, przez 30 min., w ciemności. Dwuocetan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) jest chemicznie zredukowaną formą fluoresceiny stosowaną jako wskaźnik reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach. Po deacetylacji w wyniku aktywności enzymatycznej wewnątrzkomórkowych esteraz i dalszemu utlenieniu w obecności RFT, niefluorescencyjna  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  jest przekształcana w wysoce fluorescencyjną 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF). Fluorescencję mierzono przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson), a uzyskane dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.

### **3.4.6. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej**

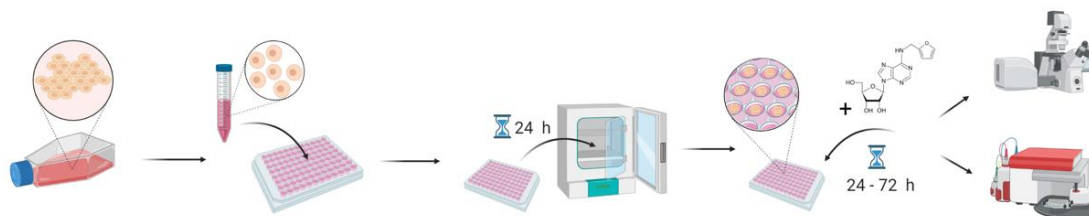
Komórki przed eksperymentem zsynchronizowano za pomocą podwójnego bloku tymidynowego. Synchronizacja komórek jest procesem, w którym komórki w hodowli, znajdujące się w różnych fazach cyklu komórkowego są doprowadzane do tej samej fazy. Synchronizacja komórek jest istotnym procesem w badaniach nad zaburzeniami cyklu komórkowego, ponieważ pozwala na zebranie danych dotyczących całej populacji, zamiast polegać wyłącznie na eksperymentach z pojedynczymi komórkami.

Komórki HepG2 ( $4 \times 10^5$ ) wysiewano na 6-dołkowe płytki i inkubowano z tymidyną w stężeniu końcowym 2 mM. Po 18 h, komórki przemywano PBS i uwalniano z pierwszego bloku tymidynowego na 9 h w medium wzrostowym. Drugi blok inicjowano przez dodanie tymidyny również w stężeniu końcowym 2 mM, po czym inkubowano przez 15 h. Następnie komórki przemywano PBS i uwalniano w medium wzrostowym. Po uwolnieniu z bloku tymidynowego, komórki traktowano 80  $\mu$ M RK przez 24 h, a następnie zawartość DNA oznaczano metodą cytometrii przepływowej z barwieniem jodkiem propidyny (PI), który wiąże się stechiometrycznie do DNA. Na tej podstawie można określić jego zawartość w poszczególnych komórkach, a tym samym oznaczyć wielkość populacji komórek w danej fazie cyklu życiowego. W tym celu komórki trypsynizowano i przemywano dwukrotnie 1 ml DPBS, a następnie utrwalano zimnym, 80% etanolem przez 1 h w 4°C. Tak przygotowany materiał wykorzystywany był bezpośrednio do barwienia lub przechowywany w -20°C do dalszej analizy w późniejszym czasie. W następnym etapie utrwalone komórki, po dwukrotnym przepłukaniu PBS, barwiono jodkiem propidyny (50  $\mu$ g/ml) przez 30 min. w 37°C, w ciemności, z równoczesnym trawieniem RNazą A (100  $\mu$ g/ml) w celu usunięcia RNA, do którego również wiąże się PI, aby zapobiec zafałszowaniu wyniku. Fluorescencję PI mierzono przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson), a uzyskane dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.

### **3.4.7. Tworzenie sferoidów komórek HepG2 i analiza mitochondrialnego potencjału błonowego ( $\Delta\Psi_m$ ) za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej**

Komórki HepG2 wysiano na U-dennych 96-dołkowych płytkach (Thermo Scientific NunclonSphera), w ilości 1500 komórek/ dołek, w 200  $\mu$ l pożywki EMEM. Płytki były krótko (1 min.) wirowane przy 250 x g (zgodnie z instrukcją producenta), a następnie komórki inkubowano w temperaturze 37°C, w warunkach 5% CO<sub>2</sub>. Po 24 h wzrostu, sferoidy komórkowe poddawano działaniu rybozydu kinetyny w stężeniu końcowym 80 lub 200  $\mu$ M

przez 24 i 48 h. Co 24 h, sferoidom wymieniano pożywkę na świeżą zawierającą odpowiednie stężenie RK. Po upływie odpowiedniego czasu inkubacji (24, 48 h) przeprowadzono analizę zmian potencjału błonowego mitochondriów przy użyciu technik cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej (**Schemat 37**).



**Schemat 37:** Procedura formowania sferoidów oraz przygotowania do analizy cytometrycznej i wizualizacji mikroskopowej. Schemat powstał w programie BioRender.com.

W celu obrazowania sferoidów, komórki płukano buforem PBS, przenoszono do świeżej pożywki zawierającej 100 nM barwnika MitoStatus TMRE (ester etylowy tetrametylodaminy, BD Pharmingen™) i inkubowano przez 30 min. w warunkach wzrostowych, po czym dodawano 5 µg/ml barwnika Hoechst 33342, w celu wyznakowania jąder komórkowych i barwiono kolejne 5 min. Następnie sferoidy przemywano dwukrotnie PBS w celu usunięcia resztek barwnika, po czym przenoszono na szalki ze szklanym dnem do analizy w mikroskopie konfokalnym i umieszczano w pożywce FluoroBrite DMEM (ThermoFisher Scientific). Obrazowanie żywych komórek przeprowadzono przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 II z laserem światła białego (470-670 nm), obiektywem immersyjnym 20x i komorą środowiskową do hodowli komórek, umożliwiającą przyżyciową analizę w warunkach wzrostu. Sekwencyjnie skanowane obrazy wykonywano przy długości fali 549/574 nm (ex/em) dla barwienia mitochondriów przy użyciu TMRE i 405/460 nm (ex/em) dla jąder komórkowych znakowanych Hoechst 33342. Do przetwarzania obrazów i analizy fluorescencji wykorzystano oprogramowanie Leica LAS AF 2.7.3 i Leica LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D.

Do analizy cytometrycznej, sferoidy zebrano, przepłukano dwukrotnie DPBS (ThermoFisher Scientific), następnie rozdzielono na pojedyncze komórki za pomocą pipety i barwiono 80 nM TMRE przez 30 min., w 37°C w ciemności. Natychmiast po barwieniu komórki przemywano dwukrotnie DPBS w celu usunięcia barwnika pozakomórkowego. Intensywność fluorescencji TMRE analizowano za pomocą cytometru przepływowego Accuri

C6 (Becton Dickinson) przy wzbudzeniu 488 nm. Traktowanie 50  $\mu\text{M}$  CCCP (m-chlorofenilo hydrazon cyjanku karbonylu), przez 5 min., było stosowane w celu wygenerowania silnego, pojedynczego pozytywnego sygnału zielonej fluorescencji. CCCP jest inhibitorem fosforylacji oksydacyjnej, powodującym rozprzęgnięcie przepływu protonów, co prowadzi do obniżenia potencjału błony mitochondrialnej i śmierci komórki.

#### **3.4.8. Izolacja i hydroliza DNA**

Komórki HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) wysiano na butelki T25 (powierzchnia 25  $\text{cm}^2$ ) i hodowano w uzupełnionym podłożu wzrostowym przez 16 h. Następnie do komórek dodawano [ $^{13}\text{C}$ ]RK w stężeniu końcowym 80  $\mu\text{M}$ . Po 24h inkubacji komórki poddano trypsynizacji, płukano dwukrotnie PBS i wirowano ( $200\times\text{g}$ , 3 min.).

Izolację DNA z komórek HepG2 przeprowadzono przy użyciu zestawu QIAamp DNA Mini Kit, zgodnie z protokołem producenta. Następnie do 1  $\mu\text{g}$  DNA dodano 200  $\mu\text{l}$  buforu reakcyjnego (40 mM octan sodu, 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , pH 5,3) i zmieszano z 3  $\mu\text{l}$  roztworu nukleazy P1 (3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Próbki inkubowano przez 3 h w temperaturze 37°C. Następnie do każdej próbki dodawano 30  $\mu\text{l}$  1 M Tris HCl, pH 8,0, oraz 5  $\mu\text{l}$  roztworu fosfatazy alkalicznej zawierającego 1,5 U enzymu, po czym inkubowano przez 1 h w 37°C. Wszystkie hydrolizaty DNA filtrowano przy użyciu filtrów o punkcie odcięcia 10 kDa jednostek filtracyjnych (Amicon®, Merck Millipore). Uzyskaną mieszaninę nukleozydów wykorzystano do analizy HPLC-DAD-ESI/MS.

#### **3.4.9. Izolacja całkowitego RNA**

Komórki T98G wysiano w ilości  $1,5 \times 10^5$  komórek/dolek, na płytce 12-dolek i hodowano do osiągnięcia 70-80% konfluencji komórek. Następnie komórki traktowano przez 24 h badanymi związkami: RK w końcowym stężeniu 80  $\mu\text{M}$  i adenozyna 300  $\mu\text{M}$ .

Całkowite RNA z komórek HepG2, izolowano przy użyciu odczynnika TRIzol® (Invitrogen) zgodnie z protokołem producenta. Pozostałości DNA usuwano za pomocą DNase I (DNA-free DNase Treatment and Removal Reagent, Ambion). Stężenie całkowitego RNA mierzono przy użyciu spektrofotometru Nano Drop 2000 UV/Vis (Thermo Scientific) przy długości fali 260 nm.

#### **3.4.10. Transkrypcja RNA *in vitro***

Oligo RNA (198 nt) zawierające KMP, syntetyzowano *in vitro* jako produkt transkrypcji uzyskany z wzorcowego DNA z promotorem T7. Transkrypcję prowadzono

przez 15 h w 37°C przy użyciu zestawu AmpliScribe T7 High Yield Transcription Kit (Epicentre). Mieszanina reakcyjna zawierała 7,5 mM GTP, CTP i UTP zgodnie z protokołem producenta oraz 1,75 mM KTP. Ilość ATP została zredukowana do 1,75 mM w stosunku do zalecanego stężenia. Następnie RNA oczyszczano na kolumnach NucAway Spin Columns (Ambion) zgodnie z instrukcją producenta. Kwantyfikację RNA przeprowadzono za pomocą pomiaru absorbancji UV przy 260 nm.

#### **3.4.11. Hydroliza RNA i znakowanie [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP hydrolizatu RNA**

W celu otrzymania 3'-monofosforanów rybonukleozydów, 1  $\mu$ g RNA hydrolizowano enzymatycznie przy użyciu 0,2 U RNazy T2 (BOC Sciences) w 10  $\mu$ l 50 mM octanu amonu (pH 4,5) przez 15 h w 37°C. Hydrolizowane RNA znakowano w 10  $\mu$ l standardowego buforu T4 PNK (USB Corporation), za pomocą 2  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (aktywność właściwa >5000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) i 2 U kinazy polinukleotydomowej T4 (USB Corporation), w obecności 150  $\mu$ M nieradioaktywnego ATP. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 30 min., w temp. 37°C. W celu rozłożenia nieprzereagowanego [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP dodawano 4-6 mU apyrazy i kontynuowano inkubację przez dodatkowe 30 min., w temp. 37°C. W kolejnym etapie dodawano 0,25  $\mu$ g RNazy P1 w 25 mM octanie amonu (pH 4,5) w celu usunięcia grup fosforanowych w pozycji 3' nukleotydów. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 min., a następnie wykonywano chromatografię cienkowarstwową TLC.

#### **3.4.12. Chromatografia TLC**

Rozdzielanie i identyfikację [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-znakowanych rybonukleotydów przeprowadzono techniką dwuwymiarowej cieczonej chromatografii cienkowarstwowej na płytkach celulozowych o wymiarach 20 x 20 cm (Merck). W pierwszym kierunku rozdział prowadzono z użyciem fazy rozdzielającej o składzie kwas izomasłowy: NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O (50:1,1:28,9 v/v), po wysuszeniu materiał poddawano rozdziałowi w drugim kierunku w obecności fazy rozdzielającej o składzie 0,1 M fosforanu sodu, pH 6,8:siarczanu amonu:n-propanolu (100 ml/60 g/1,5 ml v/w/v). Po rozdziale, płytki zostały wysuszone. Detekcję produktów przeprowadzono za pomocą analizatora FLA-5100 Fluoro Image Analyzer przy użyciu oprogramowania Multi Gauge 3.0 (FujiFilm).

#### **3.4.13. Przygotowanie ekstraktów komórkowych zawierających mieszaninę dNTP i NTP**

Wewnątrzkomórkowe dNTP i NTP ekstrahowano z komórek HepG2 (1 x 10<sup>6</sup>) wysianych na butelki T25 w podłożu wzrostowym i inkubowanych do osiągnięcia 70-80%

konfluencji. W celu zbadania udziału enzymów związanych ze szlakami metabolizmu puryn, w następnym etapie komórki HepG2 traktowano inhibitorami wybranych enzymów: 5  $\mu\text{M}$  chlorowodorkiem forodezyny (inhibitor fosforylasy nukleozydów purynowych; PNP), 25  $\mu\text{M}$  chlorowodorkiem EHNA (inhibitor deaminazy adenozyiny i deaminazy AMP; ADA) oraz 1  $\mu\text{M}$  5-jodotubercydyną (inhibitor kinazy adenozyiny; ADK) przez 1 h, przed 24-godzinną inkubacją z [ $^{13}\text{C}$ ]RK. Po inkubacji przygotowano ekstrakty komórkowe zawierające mieszaninę dNTP i NTP, które następnie analizowano za pomocą techniki HPLC-ESI/MS. W tym celu komórki HepG2 trypsynizowano, a osad komórkowy przemywano czterokrotnie zimnym buforem PBS. Deproteinizację przeprowadzono poprzez dodanie 1 ml 60% metanolu. Następnie roztwór mieszano na wortexie przez 30 s, inkubowano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  przez 30 min. i poddawano sonikacji na lodzie (3 cykle przez 1 min, z 30 s przerwą, 75% amplituda drgań fal dźwiękowych). Ekstrakty komórkowe wirowano przez 5 min., z prędkością 1000 x g, w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ , a następnie supernatanty przenoszono do nowych probówek o pojemności 1,5 ml i suszono w koncentratorze próżniowym (Eppendorf 5301) przez 2 h w temp.  $30^{\circ}\text{C}$ . Następnie, zredukowane ekstrakty rozcieńczano w 500  $\mu\text{l}$  wody milliQ, a następnie umieszczano w filtrze wirówkowym Amicon® Ultra4, z membraną NMWL 5, z punktem odcięcia 30 kDa (Merck). W celu pozbycia się glicerolu obecnego w złożu przed rozpoczęciem procedury, filtry zostały odpowiednio przygotowywane zgodnie z instrukcją producenta. Tak przygotowane ekstrakty przenoszono do szklanych fiolek umieszczano w autosamplerze i poddawano analizie HPLC-DAD-ESI/MS.

#### **3.4.14. Procedura HPLC-DAD-ESI/MS**

Analizę wysokosprawnej chromatografii cieczowej badanych związków, przeprowadzono przy użyciu systemu HPLC (Agilent Technologies 1200 Infinity), wyposażonego w system wtórnego podawania rozpuszczalnika, odgazowywacz próżniowy, autosampler i piec kolumnowy, z dwoma detektorami pracującymi szeregowo: detektorem 1260 Diode Array Detector (DAD) i 6120 Quadropole LC/MS, i oprogramowanie Agilent ChemStation. Do rozdzielania chromatograficznego wykorzystano kolumnę Poroshell 120 C18 (150 mm  $\times$  3 mm I.D. 2,7  $\mu\text{m}$ ). Faza ruchoma składała się z A (10 mM kwas mrówkowy) i B (metanol), które stosowano w elucji gradientowej: 0 - 50 min., 3% (7%) do 20% B; 50 - 65 min, 20% B; 65 - 70 min, 20% do 3% (7%) B. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,3 lub 0,4 ml/min. Elucję izokratyczną prowadzono przez 0 - 30 min, stosując roztwór 97% A (10 mM kwasu mrówkowego): 3% B (metanol), a szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,1 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 25  $\mu\text{l}$  po ekstrakcji dNTP i NTP lub 40  $\mu\text{l}$



rozcieńczonego hydrolizatu (zawierającego 1 µg strawionego RNA/DNA). Elucję monitorowano przy 260 nm przy użyciu detektora z matrycą fotodiodową DAD (ang. Diode Array Detector), a kolumnę utrzymywano w temperaturze 37°C. Zoptymalizowane parametry ESI-MS w trybie jonów ujemnych lub dodatnich były następujące: temperatura gazu 350°C, przepływ gazu suszającego 12 l/min, ciśnienie nebulizatora 60 psig, napięcie kapilary 3000 V.

#### **3.4.15. Analiza formowania purynosomu za pomocą cytometrii przepływowej**

Komórki HepG2 ( $4 \times 10^5$ ) wysiano na 6-dołkowe płytki, w podłożu wzrostowym i inkubowano do uzyskania 70-80% konfluencji. Następnie komórki poddawano działaniu 250 lub 500 µM RK przez 3 h. W warunkach kontroli pozytywnej komórki inkubowano przez 1,5 h z 25 µM DMAT (2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol), aktywatorem tworzenia purynosomów, natomiast w przypadku kontroli negatywnej komórki inkubowano przez 2 h z 200 µM TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol), który odpowiada za dysocjację kompleksu, w podłożu hodowlanym bez FBS. Następnie komórki trypsynizowano i przemywano dwukrotnie PBS po czym płukano zimnym 3% roztworem BSA/PBS. Po odwirowaniu (3 min., 1500 rpm), komórki utrwalano za pomocą 1 ml zimnego 100% metanolu i inkubowano w temperaturze -20°C, przez 10 min. Utrwalone komórki odwirowywano (3 min., 100 x g) i przemywano 3% BSA/PBS. Osad komórkowy permabilizowano przy użyciu 100 µl 1% Triton X-100/PBS przez 15 min., w 4°C, a następnie przemywano 0,1% Triton X-100/PBS. Do oczyszczonych komórek dodawano przeciwciało pierwszorzędowe (1:50 w 3%BSA/PBS) dla PPAT (amidofosforofibosylotransferaza; Novusbio, nr katalogowy NBP2-38279) lub GART (trójfunkcyjne biosyntetyczne białko purynowe adenozyne-3; Novusbio), po czym inkubowano przez 2 h w 4°C. Następnie komórki przemywano 0,1% Tritonem X-100, a do osadu komórkowego dodawano przeciwciało drugorzędowe Alexa Fluor 488 (1:1000 w 3% BSA/PBS), po czym inkubowano przez 45 min w temp. 4°C w ciemności. Wybarwione komórki przemywano, zawieszano w 200 µl DPBS. Poziom intensywności fluorescencji analizowano przy wzbudzeniu o długości fali 488 nm za pomocą cytometru przepływowego Accuri C6 (Becton Dickinson).

Dodatkowo, komórki HepG2 wysiewano w ilości  $17,5 \times 10^4$  komórek/dołek, na płytce 24-dołkowej, w podłożu wzrostowym EMEM i inkubowano do uzyskania 70-80% konfluencji. Po 24 h, komórki umieszczano w świeżym medium bez suplementów i transfekowano 0,8 µg wektora ekspresyjnego hFGAMS-GFP (**Tabela 1**; pochodzący z zasobów Stephena Benkovica, Addgene plasmid # 99107; <http://n2t.net/addgene:99107>; RRID:Addgene\_99107), w obecności 1,5 µl odczynnika Lipofectamine 2000, zgodnie z

protokołem producenta. Po kolejnych 24 h komórki traktowano 250  $\mu\text{M}$  RK oraz 25  $\mu\text{M}$  DMAT i 200  $\mu\text{M}$  TBB (kontrola pozytywna) przez 3h. Jako kontrolę negatywną stosowano komórki niepoddane transfekcji. Następnie komórki poddano trypsynizacji, przemywano DPBS, a poziom fluorescencji białka FGAMS-GFP analizowano przy wzbudzeniu 488nm za pomocą cytometru przepływowego Accuri C6 (Becton Dickinson). Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania FlowJo.

#### **3.4.16. Immunofluorescencyjna detekcja inozyny i purynosomów**

Komórki HepG2 wysiewano w ilości 1 x 10<sup>5</sup> komórek/dołek, na szkiełka nakrywkowe ( $\varnothing$  12 mm), umieszczone w 24-dołkowych płytkach do hodowli komórkowych, w 500  $\mu\text{l}$  uzupełnionej pożywki EMEM. Po 24 h komórki poddawano działaniu 80  $\mu\text{M}$  lub 200  $\mu\text{M}$  RK i 300  $\mu\text{M}$  adenozyiny, i inkubowano przez kolejne 24 h. Następnie komórki płukano PBS i utrwalano 4% formaldehydem przez 10 min., w temperaturze pokojowej (RT), po czym permeabilizowano 0,5% Tritonem X-100 w PBS, przez 5 min., w RT i blokowano w 1% BSA w PBS, przez 1 h w RT. W kolejnym etapie komórki inkubowano z przeciwciałem skierowanym przeciwko inozynie, w rozcieńczeniu 1:200 (PM098 MBL), przez noc w 4°C, a następnie inkubowano w RT, przez 1 h z kozim przeciwciałem przeciw króliczemu Alexa Fluor 594 (A-11037, Life Technologies) lub z kozim przeciwciałem przeciwko króliczemu Alexa Fluor 488 (A-11034, Life Technologies) w rozcieńczeniu 1:500. Jądrowe DNA znakowano za pomocą 3  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Life Technologies) przez 5 min. Po każdym etapie procedury, komórki płukano trzykrotnie DPBS. Sygnał fluorescencji wykrywano za pomocą konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego Leica TCS SP5 II. Zdjęcia wykonywano przy użyciu obiektywu immersyjnego Plan Apo 63 $\times$ 1,4 NA, z widmami wzbudzenia/emisji przy 590/615-630 nm do detekcji inozyny (czerwona fluorescencja) i 405/460-500 nm do wizualizacji jąder (niebieska fluorescencja). Oprogramowanie Leica LAS AF 2.7.3 służyło do kontroli procesu skanowania i obrazowania, a oprogramowanie Leica LAS X 3.3.3 do dekonwolucji i przetwarzania obrazów.

W celu detekcji formujących się purynosomów zastosowano tę samą procedurę przygotowania komórek, a końcowe stężenia związków wynosiły 250 i 500  $\mu\text{M}$  dla RK, 50  $\mu\text{M}$  dla DMAT i 200  $\mu\text{M}$  dla TBB. Czas inkubacji po traktowaniu wynosił 3 h, 1,5 h i 2 h odpowiednio dla RK, DMAT i TBB. Następnie komórki utrwalono j.w. i inkubowano z przeciwciałem skierowanym przeciwko białku PPAT, w rozcieńczeniu 1:50 (celem detekcji powstałego purynosomu) (NBP2-38279, Novus). Widma wzbudzenia i emisji dla PPAT (zielona fluorescencja) wynoszą 498/510-560 nm.

### **3.4.17. Przyżyciowa analiza powstających purynosomów**

Komórki HepG2 wysiano na 10-dołkowe płytki CELLview Slide (34 mm<sup>2</sup>, Greiner) w ilości 1,2 x 10<sup>4</sup> komórek/dołek, i hodowano w 100 µl uzupełnionej pożywki EMEM w 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Po 24 h komórki umieszczano w świeżej, niesuplementowanej pożywce i transfekowano 0,2 µg wektora ekspresyjnego phFGAMS-GFP (pochodzący z zasobów Stephena Benkovic, Addgene plasmid #99107; <http://n2t.net/addgene:99107>; RRID:Addgene\_99107) w obecności 0,35 µl Lipofektaminy 2000, zgodnie z protokołem producenta. Po kolejnych 24 h komórki poddawano działaniu 250 µM RK i 50 µM DMAT (kontrola pozytywna) przez 3 h. Jako kontrolę negatywną stosowano komórki niepoddane transfekcji. Formujące się purynosomy obrazowano w czasie rzeczywistym poprzez detekcję fluorescencyjnego białka FGAMS-GFP. Analizę żywych komórek przeprowadzono w temperaturze 37°C z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 II wyposażonego w komorę środowiskową do hodowli komórkowych, przy użyciu obiektywu immersyjnego Plan Apo 63×1,4 NA. Do przetwarzania obrazów i analizy fluorescencji wykorzystano oprogramowanie LAS AF 2.7.3 i Leica LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D.

### **3.4.18. Analiza Western blot**

Poziom białek PPAT i GART w komórkach HepG2, po 3 h inkubacji z RK (80 i 200 µM), DMAT (50 µM) i TBB (200 µM), oceniono metodą Western blot, stosując specyficzne przeciwciała monoklonalne przeciwko PPAT (NBP2-38279, Novus Biologicals) i GART (H00002618-M01, Novus Biologicals) oraz GAPDH (sc-47724, Santa Cruz Biotechnology) jako przeciwciało referencyjne. Traktowane komórki przemywano PBS, następnie zdejmowano mechanicznie z szalek hodowlanych za pomocą skrobaczki i zawieszano w 10 mM buforze Tris, pH 7,5 zawierającym inhibitory proteaz (Roche). W kolejnym etapie komórki sonikowano na lodzie w 3 cyklach po 15 s, z 1 min. przerwami przy 75% amplitudzie drgań fal dźwiękowych), a następnie wirowano przez 10 min. w 4°C z prędkością 14 000 x g. Supernatant przenoszono do nowych probówek, a stężenie białka oznaczano metodą Bradford. Wyizolowane białko rozdzielano elektroforetycznie w 12% denaturującym żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE), w obecności markera masy cząsteczkowej białka (PageRuler 26619 ThermoFisher Scientific). Przed nałożeniem na żel każda próbka była

denaturowana poprzez ogrzewanie w 95°C, przez 10 min. w obecności buforu Laemmli'ego. Przenoszenie rozdzielonych białek na membranę PVDF o średnicy porów 0,45 µm (Perkin Elmer) wykonano metodą elektrotransferu mokrego (45 min., 200 mA, temp. 4°C) przy użyciu aparatu Western Unit (Bio-Rad Laboratories), w buforze Towbin (25 mM Tris, pH 7,5, 190 mM glicyny i 20% (v/v) metanolu). Następnie membranę blokowano w 10% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w 1× PBS/0,1% Tween 20 przez 1 h w 4°C i płukano trzykrotnie po 5 min. w 1 × PBS, następnie 1 × PBS/0,1% Tween 20 i 1 × PBS w temperaturze pokojowej, po czym inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem przeciwko PPAT lub GART w rozcieńczeniu 1:100 i GAPDH w rozcieńczeniu 1:1000, w 3% BSA/1× PBS/0,1% Tween 20, przez noc w 4°C z mieszaniem 70 rpm . Po przemyciu (1 × PBS, 1 × PBS/0,05% Tween 20 i 1 × PBS) membrany inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym (Cell Signaling Technology) sprzężonym z HRP (peroksydaza chrzanowa) w rozcieńczeniu 1:2000 przez 2 h w temperaturze pokojowej. Następnie membranę przemyto trzykrotnie (1 × PBS, 1 × PBS/0,05% Tween 20 i 1 × PBS). Chemiluminescencyjną detekcję białek przeprowadzono przy użyciu gotowego odczynnika SignalFire (Cell Signaling Technology) zgodnie z opisem producenta. Wizualizację sygnału wykonano przy użyciu urządzenia GeneGnome XRQ i oprogramowania GeneSys (Syngene).

#### **3.4.19. Pomiar zawartości ATP w komórkach HepG2**

Komórki HepG2 wysiewano na 8-dołkowych mikropłytkach do hodowli komórkowych XFp ( $7,5 \times 10^3$  komórki/100 µl podłoża/dołek), inkubowano przez noc, po czym poddawano je działaniu 40, 80 i 200 µM RK przez 6 h. Następnie, z każdego dołka usuwano podłoże hodowlane i zastępowano je 180 µl podłoża Seahorse XF Base Medium zawierającego 1 mM pirogronianu sodu i 2 mM glutaminy, uzupełnionego 10 mM glukozą i ogrzanego do temperatury 37°C. Komórki były inkubowane w cieplarni bez CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C, przez 1 h. Przed pomiarami zawartości ATP, analizator XFp delikatnie mieszał media testowe w każdym dołku przez 10 min., aby ciśnienie parcjalne tlenu osiągnęło stan równowagi. Poziom ATP mierzono jednocześnie dla dwóch warunków (aby uzyskać odpowiednią ilość powtórzeń technicznych, na pojedynczej płytce sprawdzano maksymalnie dwa warunki), trzykrotnie. Przed rozpoczęciem analizy przygotowano płytkę oraz kasetę dozującą według wytycznych producenta. Zestaw Agilent Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit zawierał związki niezbędnych do pomiaru poziomu komórkowego ATP (zarówno mitochondrialnego, jak i powstającego w wyniku glikolizy), w skład których wchodziły: 1,5 µM oligomycyna (inhibitor syntazy ATP) i 0,5 µM Rotenon + Antymycyna A (inhibitory

kompleksu I i III łańcucha oddechowego). Powyższe stężenia związków odpowiadały pojedynczemu nastrzykowi podczas pomiaru (uwalniane z kasety dozującej). Jednoczesne podanie związków stresorowych umożliwiło analizę deplecji ATP w komórkach HepG2 oraz umożliwiło przegląd fenotypu energetycznego komórek i pozwoliło na ilościowe porównanie mechanizmów energetycznych (mitochondria i glikoliza) w stanie podstawowym.

#### **3.4.20. Modelowanie i dokowanie ligandów**

Wzorcem, który posłużył do modelowania, była struktura drożdżowego RNR w kompleksie z dGTP i ADP (kod PDB: 3S87). Struktura krystaliczna ludzkiego RNR w kompleksie z dGTP i ADP nie jest dostępna. Sekwencja drożdżowej RNR została dopasowana do sekwencji ludzkiej RNR (kod PDB: 3HNC) za pomocą narzędzia do analizy sekwencji BLAST [195], a porównanie to wykazało 67% identyczności. Wszystkie reszty wykazujące kluczowe interakcje w miejscu katalitycznym zostały zachowane. Ogólne struktury globalne tych białek były podobne, a jedyną cechą różniącą był brak 75 N-końcowych reszt w strukturze 3S87 PDB. Ponieważ region ten w ludzkim RNR znajduje się daleko od miejsca katalitycznego, został on pominięty podczas modelowania, a do uzyskania ostatecznego modelu użyto tylko aminokwasów obecnych we wzorcu (numery reszt 76-746 z pliku PDB). Aby przygotować 3S87 do modelowania, usunięto obecne w strukturze cząsteczki wody i ligandy, a rekonstrukcję brakujących atomów przeprowadzono przy użyciu programu Swiss PDB Viewer (SPDBV) [196]. Następnie przygotowano wyrównanie i model homologiczny, przy użyciu programu Modeler 9.18 [197]. Ocenę modelu homologicznego przeprowadzono za pomocą PROCHECK, dostępnego poprzez serwer PDBsum [198], ProQ [199] oraz wbudowanego w Modeler profilowania wyników DOPE. Następnie, kompleks modelu i liganda referencyjnego z 3S87 został zminimalizowany w celu zapewnienia lepszej orientacji reszt w miejscu katalitycznym względem liganda, w szczególności Arg293, która tworzy planarne oddziaływanie stosowe z pierścieniem adeninowym. Dla liganda referencyjnego wykorzystano moduł Antechamber programu AmberTools [200] do przypisania typów atomów i obliczenia ładunków atomowych metodą AM1-BCC [201], po czym brakujące parametry zostały przygotowane za pomocą modułu parmchk programu AmberTools17. Pliki topologiczne i współrzędnościowe dla liganda referencyjnego i jego kompleksu z białkiem zostały wygenerowane przy użyciu modułu tleap programu AmberTools17. Dla związku zastosowano ogólne pole siłowe Amber [202], a dla białka pole siłowe ff99SB [203]. Podczas minimalizacji zastosowano ograniczenia pozycyjne atomów szkieletu o stałej sile utwierdzenia- 500 kcal/mol Å<sup>-2</sup>. Minimalizację przeprowadzono w

domyślnym rozpuszczalniku „implicite” (metoda ta jest często stosowana do szacowania energii swobodnej oddziaływań rozpuszczalnik-rozpuszczalnik w procesach strukturalnych) i zastosowano uogólniony model Borna [204], przy czym pierwsze 250 kroków stanowiło najbardziej strome zejście, a następnie 750 kroków gradientu sprzężonego. Zastosowano odcięcie 16 Å i okresową stałą objętość graniczną. Nie ma dostępnej struktury krystalicznej difosforanu RK w kompleksie z białkiem, dlatego jego strukturę 3D zbudowano w oparciu o strukturę krystaliczną ADP z 3S87 za pomocą programu GaussView z pakietu Gaussian 03 [205]. Podczas dokowania, pliki pdbqt dla modelu końcowego i ligandów generowane były przy użyciu programu AutoDockTools 1.5.6 [206].

Do obliczeń wykorzystano program AutoDock Vina [207]. Przestrzeń poszukiwań ustalono na 20 x 20 x 20 Å z domyślnym odstępem 0.375 Å, a współrzędne środka w wymiarach x, y, z wynosiły odpowiednio 22.9, 51.5 i 16.8. Rysunki przygotowano przy użyciu programu PyMOL 1.7.4 i AutoDockTools 1.5 [206].

#### **3.4.21. Analiza proteomiczna**

Komórki HepG2 wysiano w ilości 1 x 10<sup>6</sup> na butelki T25 i hodowano w pożywce EMEM w temperaturze 37°C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>, aż do osiągnięcia 70-80% konfluencji komórek. Następnie komórki traktowano przez 24 h badanym związkiem - RK, w końcowym stężeniu 40, 80 i 200 µM. Po inkubacji komórki trypsynizowano i po pierwszym wirowaniu, 8-krotnie przepłukano w 1 ml chłodnego PBS (wykorzystano autoklawowane probówki Eppendorf®). Następnie, po odwirowaniu (3 min., 1500 rpm), próby zamrażano poprzez zanurzenie w ciekłym azocie i do czasu analizy przechowywano w temp. -80°C. Analiza została wykonana w Zakładzie Proteomiki Biomedycznej IChB PAN.

#### **3.4.22. Metody uzupełniające- Synteza cDNA i PCR w czasie rzeczywistym**

Całkowite RNA (0,5 µg) wykorzystano do syntezy cDNA za pomocą zestawu Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) z użyciem starterów oligo(dT) zgodnie z protokołem producenta. Analizę PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w celu określenia poziomu ekspresji genów ADA, AMPD2, PNP, RRM1, ADK, AK1 i AK9. Każda próbka cDNA była analizowana przy użyciu sond fluorescencyjnych (UPL Probes, Roche), dobranych dla każdego genu, przy użyciu oprogramowania ProbeFinder (Roche). Mieszaniny reakcyjne PCR przygotowywano zgodnie z protokołem producenta. Warunki PCR dla wszystkich genów były następujące: wstępny etap inkubacji w 94°C przez 10 min, następnie 45 cykli amplifikacji (15 s w 94°C, 30 s w 60°C i 15 s w 72°C), z końcowym etapem

chłodzenia w 40°C przez 2 min. Analizę przeprowadzono przy użyciu aparatu LightCycler 480 II (Roche). Względny poziom ekspresji badanych genów został obliczony przy użyciu oprogramowania Roche LightCycler 480 Software i znormalizowana do genów referencyjnych (ACTB, TBP, PGK1, HPRT1 i G6PD). Wszystkie krzywe standardowe zostały uzyskane przez amplifikację serii dwukrotnych rozcieńczeń cDNA. Sekwencje primerów dla analizowanych genów i fluorescencyjnych sond UPL przedstawiono w Tabeli uzupełniającej S1.

**Tabela S1:** Lista starterów używanych do analizy PCR w czasie rzeczywistym

Skrócona nazwa genu	Pełna nazwa	Starter przedni (forward) 5'-3'	Starter wsteczny (reverse) 5'-3'	Nr sondy UPL	
Geny referencyjne	ACTB	Beta Aktyna	ATTGGCAATGAGCGGGTTC	CGTGATGCCACAGGACT	11
	TBP	TATA-Box Binding Protein	CGGCTGTTAACTTCGCTTC	CACACGCCAAGAAACAGTGA	3
	PGK1	Kinaza fosfoglicerynianowa 1	ACGCTACTGCATTCCTGCTT	ACTGTTTTGTGGGTGTTTTGTT	13
	HPRT1	Fosforybozylotransferaza 1 hipoksantyny	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	73
	G6PD	Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa	AACAGAGTGAGCCCTTCTTCA	GGAGGCTGCATCATCGTACT	5
Geny badane	ADA	Deaminaza adenozyne	GGCTGTGGACATACTCAAGACA	AGGGGCAGATCTCGAAGTG	28
	AMPD2	Deaminaza monofosforanu adenozyne 2	AGCTGCCATACCCTGACCT	GGCGGTAGCAGAATGACTTTAT	5
	PNP	Fosforylaza nukleozydów purynowych	ACTGTGGCAGAATGTCGTGT	GCCGTGCAACGATAACTTCT	33
	RRM1	Reduktaza rybonukleotydowa Podjednostka katalityczna M1	TCTGGTCTGGATGAGGTTT	TACAACCTTTCGGACGACGAC	55
	ADK	Kinaza adenozyne	GCTGCATGCATCACTGGT	TCTCCAGATCAAGATGTTTTTCC	74
	AK1	Kinaza adenylnowa 1	GCCACAGAACCCGTCATC	ACTTTAGGGCGTCCAGGTG	7
	AK9	Kinaza adenylnowa 9	AGCAGCTATTCTAACCAAACTTCAG	TGCAAGAGTACGAAATAGTCATC	6

### **3.5. Wpływ rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów komórek nowotworowych**

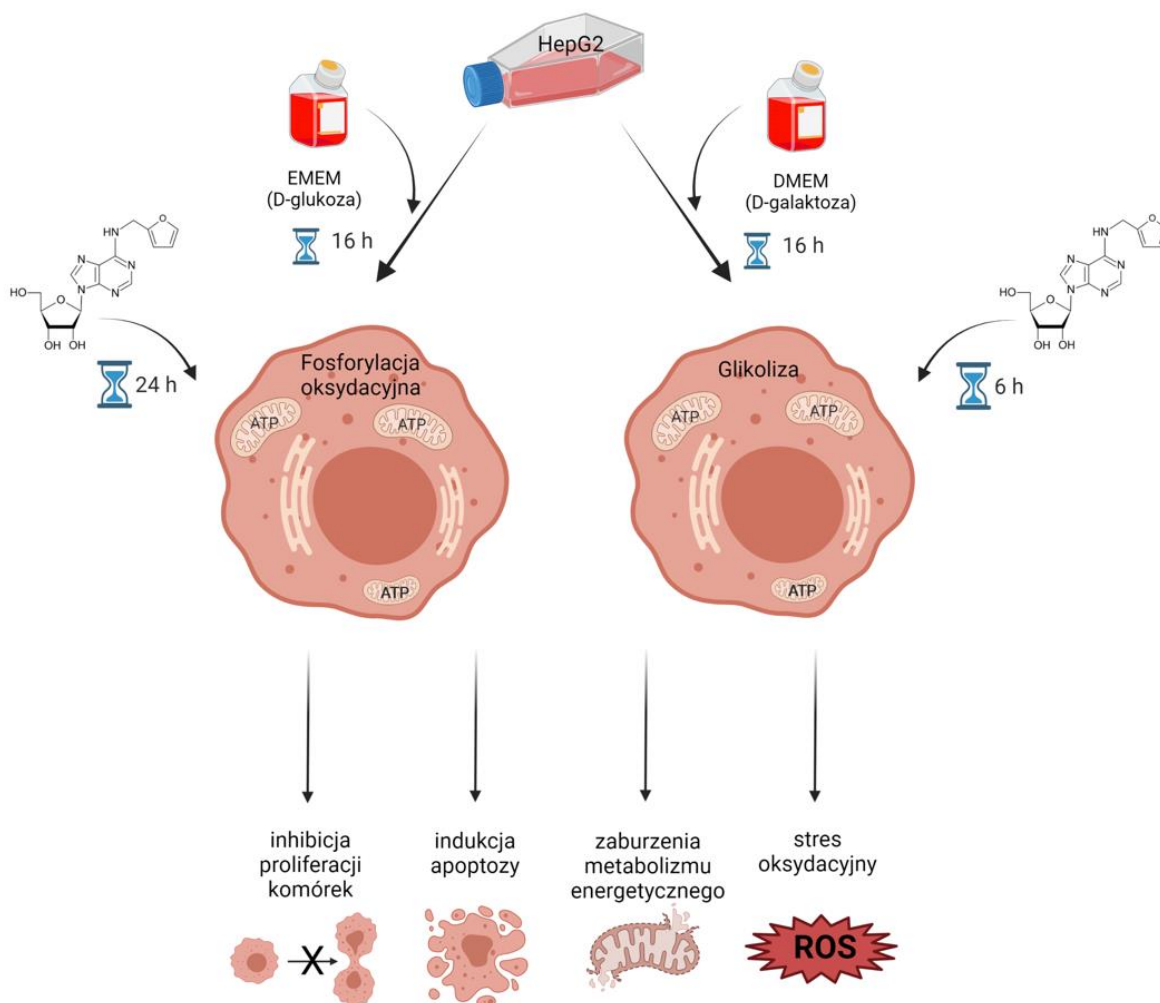
#### **3.5.1. Hodowla komórkowa**

Warunki hodowli komórkowych dla komórek HepG2, T47D i A172 zostały opisane w podrozdziałach 3.1., 3.2. oraz 3.4.1 Wszystkie linie komórkowe były hodowane w temperaturze 37 °C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Ponadto, obie pożywki wykorzystane w eksperymentach obejmujących wpływ rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów, tj. RPMI-1640 i EMEM, są określane jako pożywki nisko-glukozowe, ponieważ zawierają odpowiednio 2 i 1 g/l D-glukozy. Komórki hodowane w pożywkach bez dodatku RK były używane jako kontrola negatywna we wszystkich eksperymentach.

#### ***Podłoże galaktozowe wykorzystane w eksperymentach związanych z efektem Crabtree***

Podłoże eksperymentalne, określane jako galaktozowe, stanowiło podłoże Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; pozbawione glukozy; Thermo Fisher Scientific) uzupełnione 10 mM galaktozą jako jedynym źródłem węglowodanów, 2 mM glutaminą (Thermo Fisher Scientific), 5 mM buforem HEPES (Gibco), 1 mM pirogronianem sodu (Thermo Fisher Scientific), 10% FBS (Corning®) i antybiotykami (Corning®). Aby zmienić metabolizm komórkowy na tlenowy i zwiększyć fosforylację oksydacyjną (OXPHOS), na 16 h przed wybranymi eksperymentami zmieniano standardowe podłoże wzrostowe (zawierające glukozę) na galaktozowe. Czas ten był wystarczający do zwiększenia wydolności tlenowej. Następnie do pożywki dodawano RK w odpowiednim stężeniu i inkubowano przez 6 h (**Schemat 38**).





**Schemat 38:** Procedura przygotowania komórek do indukcji fosforylacji oksydacyjnej z wykorzystaniem pożywki zawierającej galaktozę. Czasowe porównanie eksperymentów po wymianie pożywek i indukcji RK, a także wykaz parametrów komórkowych, które zostały poddane ocenie. Schemat powstał w programie BioRender.com.

### 3.5.2. Analiza proliferacji komórek w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu xCELLigence

Podobnie jak w przypadku eksperymentów związanych z badaniem metabolizmu puryn, analizę proliferacji komórek w czasie rzeczywistym przeprowadzono przy użyciu systemu xCELLigence (Roche). Indeks komórkowy (CI) i wartości normalizacji rejestrowano przy użyciu oprogramowania RTCA Software 1.2.1.

Procedura przygotowania eksperymentu przebiegała tak jak opisano w podrozdziale 3.4.3. W przypadku części komórek podłoże glukozowe zastąpiono galaktozą na kolejne 16 h, celem indukcji zmiany metabolizmu z glikolizy na OXPHOS. Po inkubacji, komórki traktowano RK w końcowym stężeniu 20, 40 i 80  $\mu\text{M}$  w dodatkowych 50  $\mu\text{l}$  podłoża.

Komórki kontrolne hodowano w samej pożywce uzupełniającej. Proliferację komórek HepG2 traktowanych RK monitorowano w czasie rzeczywistym w 30-minutowych odstępach czasowych od momentu posiewu przez 120 h, rosnących zarówno w pożywce zawierającej glukozę i galaktozę.

### **3.5.3. Oznaczanie poziomu apoptozy/nekrozy za pomocą cytometrii przepływowej**

Oznaczanie apoptozy/nekrozy przeprowadzono w komórkach HepG2 ( $4 \times 10^5$ ), T47D ( $5 \times 10^5$ ) oraz A172 ( $3.5 \times 10^5$ ) według procedury opisanej w podrozdziale 3.4.4.

Zanim przeprowadzono właściwą analizę cytometryczną, komórki najpierw hodowano przez 16 h w pożywce zawierającej galaktozę lub w pożywce nisko-glukozowej, uzupełnionej 20 mM 2-DG, przez 24 h. Po upływie 16 h komórki hodowane w pożywce galaktozowej, traktowano RK w stężeniach 20, 40 i 80  $\mu\text{M}$  przez 6 h, a w pożywce zawierającej glukozę przez 24 h i 48 h. Komórki hodowane z 2-DG traktowano RK (stężenia jak powyższe) jeszcze przez kolejne 24 h. Czas hodowli komórek, wymiana pożywek i inkubacja ze związkami, zostały tak zaplanowane, aby dla wszystkich trzech warunków, eksperymenty kończyły się tego samego dnia i mogły zostać poddane symultanicznej analizie. Dla komórek T47D i A172 wykonano jedynie eksperyment porównawczy z wykorzystaniem pożywki galaktozowej.

### **3.5.4. Analiza LIVE/DEAD za pomocą mikroskopu konfokalnego**

Komórki HepG2 wysiano w gęstości  $3,5 \times 10^4$  komórek/dolek do 4-komorowych szalek ze szklanym dnem (Grenier Bio-One) i hodowano w pożywce EMEM w temperaturze 37 °C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>. Następnie pożywkę zmieniano na galaktozową na kolejne 16 h. Po upływie czasu związanego z przestawieniem się na OXPHOS, komórki traktowano przez 6 h 20, 40 i 80  $\mu\text{M}$  RK, a następnie analizowano za pomocą testu LIVE/DEAD (Thermo Fisher Scientific). Test ten pozwala na odróżnienie komórek żywych od martwych poprzez jednoczesne barwienie przy użyciu 2  $\mu\text{M}$  kalceiny-AM (zielona fluorescencja, komórki żywe) i 4  $\mu\text{M}$  homodimeru etydyny-1 (czerwona fluorescencja), co wskazuje na utratę integralności błony komórkowej. Dodatkowo jądra komórkowe znakowano za pomocą 5  $\mu\text{g/ml}$  barwnika Hoechst 33342. Następnie komórki inkubowano przez 15 min. w warunkach wzrostu, po czym przemywano trzykrotnie PBS w celu usunięcia wolnych barwników, a następnie umieszczano w pożywce FluoroBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific).

Obrazowanie żywych komórek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5. Sekwencyjnie skanowane obrazy były zbierane przy długości fali 494/515 nm ( $\pm 20$ ) i 517/602 nm ( $\pm 20$ ) przy użyciu obiektywu immersyjnego HC PL

APO 20x/0,75 z 2-krotnym zoomem cyfrowym. Do analizy fluorescencji i przetwarzania obrazów wykorzystano oprogramowanie Leica LAS AF 2.7.3 i LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D.

### ***3.5.5. Analiza potencjału błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ ) technikami cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej***

Komórki HepG2 wysiewano w ilości  $4 \times 10^5$  komórek/dolek, na 6-dolekowe płytki i hodowano w standardowej pożywce EMEM w temperaturze 37 °C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>, do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie pożywkę zmieniano na galaktozową na kolejne 16 h i po tym czasie komórki traktowano przez 6 h 20, 40 i 80  $\mu$ M RK. W przypadku komórek rosnących w pożywce glukozowej, czas inkubacji ze związkiem wynosił 24 h, a oba eksperymenty zakończyły się w tym samym czasie. Po inkubacji komórki trypsynizowano i przemywano dwukrotnie 1 ml DPBS (Thermo Fisher Scientific), a zmiany w  $\Delta\Psi_m$  analizowano przy użyciu wrażliwego na potencjał błony mitochondrialnej (MMP) kationowego barwnika 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolilokarbonocyjaninowego jodku (JC-1) (Thermo Fisher Scientific), który może selektywnie wnikać do mitochondriów i zmieniać barwę z czerwonej na zieloną w miarę obniżania się potencjału błony. Komórki barwiono 2,5  $\mu$ M JC-1 przez 30 min, w 37 °C w ciemności. Natychmiast po wybarwieniu komórki analizowano przy wzbudzeniu o długości fali 488 nm za pomocą cytometru przepływowego Accuri C6 (Becton Dickinson). Maksymalna długość fali emisji monomerów i agregatów J wynosiła odpowiednio  $\sim$  525 i  $\sim$  590 nm. Bezpośrednio przed zakończeniem inkubacji z RK, komórki kontrolne inkubowano z 50  $\mu$ M CCCP (m-chlorofenylo hydrazon cyjanku karbonylu) przez 5 min., w celu wytworzenia silnego, pozytywnego sygnału zielonej fluorescencji pochodzącej od monomerów JC-1.

Równocześnie dla komórek rosnących tylko w pożywce galaktozowej, analizowano MMP przy użyciu innego barwnika potencjometrycznego- TMRE (tetrametylodamina). Do analizy cytometrycznej komórki przygotowywano jak wyżej i barwiono 80 nM TMRE przez 30 min, w 37 °C w ciemności. Intensywność fluorescencji TMRE mierzono metodą cytometrii przepływowej w trybie tzw. dolnego wygaszania fluorescencji (ang. *lower quenching mode*), ze wzbudzeniem i emisją odpowiednio przy długości fali 549 i 574 nm. Średnią intensywność fluorescencji reprezentującą wewnątrzkomórkowy poziom MMP analizowano przy wzbudzeniu 488 nm za pomocą cytometru przepływowego Accuri C6 (Becton Dickinson).

W celu mikroskopowego obrazowania, komórki HepG2 wysiewano w ilości  $3,5 \times 10^4$  komórek/dołek do 4-komorowych szalek ze szklanym dnem (Grenier Bio-One) i hodowano w EMEM w temperaturze 37 °C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>. Po 24 h pożywkę zmieniano na galaktozową na kolejne 16 h, a w przypadku komórek rosnących w podłożu zawierającym glukozę, wymieniano na świeżą. Następnie komórki traktowano rybozydem kinetyny w stężeniu końcowym 20, 40 i 80 μM i inkubowano przez 6 h (podłoże z galaktozą) i 24h (podłoże z glukozą). W celu analizy zmian MMP komórki płukano PBS i umieszczano w podgrzonym (37°C) świeżym podłożu zawierającym 3 μM JC-1 w warunkach wzrostowych; po 15 min. komórki przemywano trzykrotnie PBS w celu usunięcia wolnego barwnika i umieszczano w FluoroBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific). Wizualizację żywych komórek przeprowadzono za pomocą mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 II używając obiektywu HC PL APO 20x/0,75. Sekwencyjnie skanowane obrazy zbierano przy wzbudzeniu/emisji 485/530 nm ( $\pm 20$ ) i 535/590 nm ( $\pm 20$ ) odpowiednio dla detekcji monomerów JC-1 emitujących zieloną fluorescencję oraz agregatów J emitujących czerwoną fluorescencję. Oprogramowanie Leica LAS AF 2.7.3 i LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D służyło odpowiednio do kontroli skanowania i przetwarzania obrazu.

### ***3.5.6. Pomiar masy mitochondriów za pomocą MitoTracker Green FM metodą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej***

Komórki HepG2 wysiewano w ilości  $4 \times 10^5$  komórek/dołek na 6-dołkowe płytki i hodowano w pożywce EMEM w temperaturze 37 °C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>, do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie pożywkę zmieniano na galaktozową na kolejne 16 h i poddawano działaniu 20, 40 i 80 μM RK przez 6 h. W celu określenia masy mitochondriów w podłożu glukozowym komórki inkubowano z 20, 40 i 80 μM RK przez 24 h. Następnie komórki odklejano od podłoża przy użyciu trypsyny, przemywano dwukrotnie 1 ml DPBS (Thermo Fisher Scientific) i inkubowano z 50 nM sondy MitoTracker Green FM (Life Technologies) w temperaturze 37 °C przez 30 min., w ciemności. MitoTracker Green FM (ex/em: 490/516 nm) jest zielonym fluorescencyjnym barwnikiem mitochondrialnym, który lokalizuje się do mitochondriów niezależnie od MMP. Po barwieniu komórki przemywano DPBS a emisję zielonej fluorescencji analizowano przy długości fali wzbudzenia 488 nm za pomocą cytometru przepływowego Accuri C6 (Becton Dickinson).

Dodatkowo, dla komórek hodowanych w obecności galaktozy i następnie traktowanych RK (te same stężenia co powyżej), przeprowadzono analizę mikroskopową, w celu wykazania fragmentacji mitochondriów.

Komórki HepG2 wysiano w ilości  $3,5 \times 10^4$  komórek/dołek do 4-komorowych szalek ze szklanym dnem (Grenier Bio-One) i hodowano w pożywce EMEM w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  i 5% nasyceniu  $\text{CO}_2$ . Następnie, w celu wymuszeniu na komórkach OXPHOS, postępowano według powyższego schematu, a morfologię mitochondriów oceniano również przy użyciu MitoTracker Green FM (MG FM). W tym celu komórki płukano PBS, umieszczano w podgrzanym ( $37^\circ\text{C}$ ) świeżym podłożu zawierającym 100 nM MG FM i inkubowano przez 15 min. w warunkach wzrostowych. Następnie komórki przemywano trzykrotnie PBS w celu usunięcia wolnego barwnika i umieszczano w FluoroBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific). Obrazowanie żywych komórek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 II używając obiektywu HC PL APO 20x/0,75. Sekwencyjnie skanowane obrazy zbierano przy długości fali wzbudzenia/emisji 490/516 ( $\pm 20$ ), Oprogramowanie Leica LAS AF 2.7.3 i LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D służyło odpowiednio do kontroli skanowania i przetwarzania obrazu.

### ***3.5.7. Pomiar stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2 metodą cytometrii przepływowej***

Komórki HepG2 wysiano w ilości  $4 \times 10^5$  komórek/dołek, na 6-dołkowe płytki, hodowano w pożywce EMEM w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  i 5% nasyceniu  $\text{CO}_2$  i inkubowano do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie pożywkę zmieniano na galaktozową na kolejne 16 h, po czym komórki poddawano działaniu 20, 40 i 80  $\mu\text{M}$  RK przez 6 lub 24 h dla pożywki z glukozą. Ponadto w celu wykazania wpływu RK na komórki nienowotworowe, poziom stresu oksydacyjnego został także zmierzony w ludzkich komórkach fibroblastów (MRC-5), a także w celu potwierdzenia roli ADK, w komórkach HepG2, które przed inkubacją z RK traktowane były 1  $\mu\text{M}$  5-jodotubercydyny (inhibitor kinazy adenozy- ADK) przez 1h. Komórki MRC-5 wysiano w ilości  $4 \times 10^5$  komórek/dołek, na 6-dołkowe płytki, hodowano w pożywce EMEM w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  i 5% nasyceniu  $\text{CO}_2$  i inkubowano do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu (RFT) analizowano poprzez barwienie  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , według procedury opisanej w podrozdziale 3.4.5.

Spadek stężenia zredukowanego glutationu (GSH) mierzono tylko w komórkach hodowanych w obecności galaktozy, przy użyciu barwnika Thiolite Green (AAT Bioquest), który emituje silną fluorescencję w reakcji z tiolami, ze wzbudzeniem i emisją przy długości fali 540 nm i 590 nm. Komórki traktowane RK, trypsynizowano i przemywano dwukrotnie, jak opisano powyżej, a następnie zawieszano w roztworze barwiącym i inkubowano w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , w 5%  $\text{CO}_2$  przez 30 min. Intensywność fluorescencji była analizowana przy wzbudzeniu długością fali 488 nm za pomocą cytometru przepływowego Accuri C6.

Powyższe warunki hodowli komórek wykorzystano również do pomiaru indukcji mitochondrialnego stresu oksydacyjnego (poziomu nadtlenu) metodą cytometrii przepływowej. Po inkubacji z RK, komórki trypsynizowano i płukano DPBS (1 ml). Osady komórkowe barwiono MitoSOX (2,5  $\mu$ M) przez 10 min w 37 °C w ciemności.

W celu przeprowadzenia analizy obecności anionorodnika ponadtlenkowego O<sub>2</sub><sup>-</sup>, za pomocą mikroskopii konfokalnej, komórki HepG2 wysiewano w ilości 6 × 10<sup>4</sup> komórek/dołek do 4-komorowych szalek ze szklanym dnem (Grenier Bio-One) i hodowano w temperaturze 37 °C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>. Pożywkę zmieniano na galaktozową na kolejne 16 h. Następnie komórki traktowano przez 6 h 20, 40 i 80  $\mu$ M RK. Komórki barwiono przez 30 min za pomocą MitoSOX w końcowym stężeniu 4  $\mu$ M, płukano PBS i umieszczano w ogrzanej (37 °C) FluoroBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific). Obrazy fluorescencyjne żywych komórek zbierano za pomocą mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 II przy użyciu obiektywu immersyjnego HC PL APO 20x/0,75. Sekwencyjnie skanowane obrazy zbierano przy długości fali wzbudzenia i zakresie emisji 510 i 570-600 nm. Do skanowania i przetwarzania obrazów wykorzystano oprogramowanie Leica LAS AF 2.7.3 i LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D.

*Szczegółowa analiza stresu oksydacyjnego zostanie opisana w kolejnej części niniejszej rozprawy doktorskiej (podrozdział 3.6.), która została poświęcona temu zagadnieniu.*

### **3.5.8. Pomiar zawartości ATP w komórkach HepG2 hodowanych w podłożu zawierającym galaktozę**

Komórki HepG2 wysiano w ilości 4 × 10<sup>5</sup> komórek/dołek na 6-dołkowych płytkach i hodowano do osiągnięcia 70-80% konfluencji w podłożu wzrostowym EMEM w temperaturze 37 °C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub> i inkubowano. Następnie komórki umieszczono w pożywce galaktozowej na 16 h, po czym poddawano je działaniu 40 i 80  $\mu$ M RK przez 2 h i jednocześnie 1  $\mu$ M 5-jodotubercydyny przed traktowaniem RK. Po inkubacji komórki trypsynizowano, przemywano dwukrotnie 1 ml DPBS i odwirowywano (3 min., 1500 rpm), a komórki ponownie zawieszano w 100  $\mu$ l PBS. Lizaty komórkowe przygotowywano poprzez kilkukrotne zamrażanie i rozmrażanie. W skrócie: komórki zamrażano w temperaturze -80°C przez 5 minut, a następnie rozmrażano w temperaturze 37 °C, w czasie 5 min. Etap ten powtarzano trzykrotnie, a między kolejnymi cyklami komórki wortexowano. Po odwirowaniu (3 min., 1500 rpm) supernatanty przenoszono do nowych probówek a stężenie białka całkowitego mierzono spektrofotometrycznie przy 280 nm. Ilościowe oznaczanie ATP

(z rekombinowaną lucyferazą firefly'a i jej substratem D-lucyferyną) przeprowadzono przy użyciu zestawu Molecular Probes® ATP Determination Kit (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z protokołem producenta. Luminescencję mierzono przy długości fali 560 nm za pomocą czytnika płytek Synergy2 BioTek.

W przypadku pomiaru ATP dla komórek rosnących w obecności glukozy, metodologia została opisana szczegółowo w podrozdziale 3.4.19.

### ***3.5.9. Monitorowanie wychwytu glukozy za pomocą 2-NBDG metodą cytometrii przepływowej***

Komórki HepG2 ( $4 \times 10^5$ ) wysiewano na 6-dołkowe płytki i inkubowano w uzupełnionej pożywce EMEM do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie komórki hodowano w pożywce galaktozowej przez 16 h i w pożywce nisko-glukozowej uzupełnionej 20 mM 2-DG przez 24 h z RK. Następnego dnia komórki w podłożu galaktozowym traktowano RK w stężeniu 20, 40 i 80  $\mu\text{M}$  przez 6 h, a następnie przemywano PBS, i wymieniano podłoże na pożywkę o niskiej zawartości glukozy, uzupełnioną 100  $\mu\text{M}$  2-NBDG, który wykazuje maksima wzbudzenia i emisji przy 465/540 nm (fluorescencyjny analog glukozy stosowany do monitorowania wychwytu glukozy w żywych komórkach jako wskaźnik żywotności komórek; Life Technologies) i inkubowano przez 1 h w 37 °C przy 5% CO<sub>2</sub>. Następnie komórki trypsynizowano, przemywano dwukrotnie 1 ml DPBS (a poziom fluorescencji analizowano przy wzbudzeniu o długości fali 488 nm za pomocą cytometru przepływowego Accuri C6 (Becton Dickinson).

### ***3.5.10. Analiza metabolizmu energetycznego w komórkach HepG2***

Szybkość zużycia tlenu (OCR) i szybkość zakwaszenia zewnątrzkomórkowego (ECAR) mierzono za pomocą zestawu Agilent Seahorse XFp Cell Energy Phenotype. Procedura przygotowania komórek oraz płytek została opisana w podrozdziale 3.4.19., a pomiarów dokonywano jednocześnie dla obu parametrów, trzykrotnie, aby ustalić szybkość podstawową oddychania.

Podczas analizy wykorzystano związki niezbędne do pomiaru fenotypów metabolicznych i potencjału metabolicznego żywych komórek, w skład których wchodziły: 10  $\mu\text{M}$  oligomycyny (inhibitor syntazy ATP) i 10  $\mu\text{M}$  FCCP (czynnik odspzęgający mitochondrium).

*Powyższe eksperymenty miały na celu potwierdzić wpływ rybozydu kinetyny na mitochondria, stąd ukierunkowanie komórek na metabolizm OXPHOS (porównanie efektu RK w dwóch*

rodzajach pożywki, tj. zawierającej galaktozę i glukozę). Pozostała część badań została wykonana, wykorzystując tylko pożywkę zawierającą glukozę.

### **3.5.11. Detekcja autofagii i mitofagii w komórkach HepG2 metodą cytometrii przepływowej**

Komórki HepG2 wysiano na 6-dolkowe płytki w ilości  $4 \times 10^5$  komórek/dolek i hodowano do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie komórki inkubowano w obecności 20, 40 i 80  $\mu\text{M}$  RK przez 24 h. Indukcję autofagii analizowano za pomocą zestawu odczynników do detekcji autofagii (Abcam Autophagy Detection Kit ab139484), zawierającego komercyjny barwnik- Green Detection Reagent (ex/em:  $\sim 463/534$  nm) i jodek propidyny (PI,ex/em:  $535/617$  nm). Analizę przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta (Abcam). Sygnał zielonej fluorescencji jest emitowany w obecności wytworzonych autofagosomów. Na 2 h przed zakończeniem eksperymentu, zastosowano dodatkowo kontrolę pozytywną w postaci induktora autofagii- rapamycynę w stężeniu 500 nM.

Komórki trypsynizowano i przemywano dwukrotnie 1 ml DPBS. Supernatant odrzucano, a komórki zawieszano w 500  $\mu\text{l}$  pożywki EMEM, pozbawionej FBS oraz czerwieni fenolowej i barwiono przy użyciu Green Detection Reagent (1  $\mu\text{l}$  barwnika/1 ml pożywki) w temperaturze 37 °C przez 30 min., w ciemności. Następnie komórki wirowano (1000 rpm, 5 min.), zawieszano w załączonym przez producenta buforze do analizy (Assay Buffer) a poziom intensywności fluorescencji mierzono przy użyciu cytometru przepływowego Accuri C6 przy długości fali wzbudzenia 488 nm.

Powyższe warunki hodowli komórek i stężenia RK, wykorzystano również do pomiaru indukcji mitofagii metodą cytometrii przepływowej za pomocą zestawu Mitophagy Detection Kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Zestaw ten składa się z barwnika Mitophagy Dye (em/ex:  $\sim 530/700$  nm), odczynnika do wykrywania mitofagii, który gromadząc się w nienaruszonych mitochondriach i wykazuje słabą fluorescencję. W przypadku indukcji mitofagii, dochodzi do wzmocnienia emitowanego sygnału czerwonej fluorescencji, powstałego w wyniku fuzji uszkodzonych mitochondriów z lizosomami.

Po inkubacji z barwnikiem (stężenie końcowe 100 nM) oraz RK, komórki trypsynizowano, płukano DPBS (1 ml) i natychmiast analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson), a dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.



### **3.5.12. Oznaczenie poziomu wapnia za pomocą cytometrii przepływowej**

Komórki HepG2 wysiano na 6-dołkowe płytki w ilości  $4 \times 10^5$  komórek na dołek i hodowano do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie komórki poddawano działaniu 250 i 500  $\mu\text{M}$  RK przez 3 h. W celu oznaczenia poziomu wapnia, uwalnianego z komórek, zastosowano barwnik Calcium Rhod-2 AM (Thermo Fisher Scientific). Znakowane wskaźniki wapnia to cząsteczki, które wykazują wzrost fluorescencji po związaniu  $\text{Ca}^{2+}$ . Przepuszczalna dla komórek pochodna estrowa Rod-2 AM ma ładunek dodatni. Ta właściwość promuje jej sekwestrację do mitochondriów, najprawdopodobniej poprzez wychwyt napędzany potencjałem membranowym. Reakcja polega na redukcji rhod-2 AM do dihydrorhod-2 AM. Komórki traktowane RK trypsynizowano i przepłukano 1 ml DPBS, a następnie zawieszono w pożywce EMEM zawierającej 2,5  $\mu\text{M}$  stężenie Rhod-2 i inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 min., w ciemności. Intensywność fluorescencji analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson), a uzyskane dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.

### **3.5.13. Oznaczanie wewnątrzkomórkowego poziomu NAD**

Komórki HepG2 wysiano w ilości  $4 \times 10^5$ , na 6-dołkowe płytki, w uzupełnionej pożywce EMEM i inkubowano do uzyskania 70-80% konfluencji, a następnie traktowano rybozydem kinetyny w stężeniu 20, 40 i 80  $\mu\text{M}$  przez 24 h. Po inkubacji komórki przemywano zimnym PBS, a wewnątrzkomórkowy poziom NAD oceniano kolorymetrycznie przy użyciu zestawu odczynników NAD/NADH Quantitation Colorimetric Kit (BioVision) zgodnie z protokołem producenta. Absorbancję przy długości fali 450 nm mierzono przy użyciu czytnika płytek Synergy2 BioTek.

### **3.5.14. Pomiary oddychania komórkowego i statusu sprzężenia mitochondrialnego w nienaruszonych komórkach**

Komórki HepG2 wysiano na butelki T150 w ilości  $3 \times 10^6$  komórek i hodowano w pożywce EMEM w temperaturze 37 °C i w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie komórki inkubowano w obecności 80  $\mu\text{M}$  RK przez 6 i 24 h. Po tym czasie komórki przemywano jednokrotnie PBS, zbierano przy użyciu skrobaczki i resuspendowano przy użyciu pipety automatycznej. Zebrane komórki liczone, odwirowywano (1000 rpm, 3 min.) i ponownie zawieszano w uzupełnionej pożywce EMEM. Następnie wykonano pomiar poboru tlenu w zawiesinie komórkowej o gęstości  $2\text{-}3 \times 10^6$  komórek/ml za pomocą elektrody tlenowej typu Clarka (system Oxygraph+, Hansatech Instruments). Analizę

proawodono w temperaturze 37°C w pożywce EMEM pozbawionej FBS i antybiotyków. Po ustabilizowaniu początkowego tempa zużycia tlenu, w celu wywołania stanu spoczynku (stan 4) i maksymalnego oddychania (stan U) oraz wykluczenia niemitochondrialnego zużycia tlenu, dodawano odpowiednio 1,5  $\mu\text{M}$  oligomycyny - inhibitor mitochondrialnej ATPazy (Sigma-Aldrich) oraz w porcjach 0,1  $\mu\text{M}$  cyjanku karbonylu p-trifluorometoksyfenylohydrazonu (FCCP, Sigma-Aldrich), w celu uniknięcia zahamowania oddychania. Aby oszacować status sprzężenia mitochondrialnego w nienaruszonych komórkach, obliczono oddychanie podstawowe, wkład stanu 3 do oddychania podstawowego i zdolność do rozprężania FCCP. Stan 3 obliczano przez odjęcie stanu 4 (wymuszony dodaniem oligomycyny) od podstawowego oddychania. Wkład stanu 3 do oddychania podstawowego obliczono jako stosunek stanu 3 do oddychania podstawowego i odpowiada on wydajności sprzężenia mitochondriów. Zdolność do rozprężania FCCP oznacza stosunek stanu U do stanu 4 i odpowiada zdolności sprzężenia mitochondrialnego. W celu oceny wpływu RK na komórki, obliczono wskaźnik zmiany parametrów pomiędzy komórkami traktowanymi związkiem, a komórkami kontrolnymi (hodowanymi w tym samym czasie). Po zakończeniu pomiaru, komórki były zbierane w celu oszacowania stężenia białka. Komórki odwirowywano (3 min, 1500 rpm), ponownie zawieszano w 50  $\mu\text{l}$  PBS i poddawano lizie w trzech cyklach zamrażania i rozmrażania (zamrażanie w -80°C przez 5 min, rozmrażanie w 37°C przez 5 min.). Uzyskane lizaty odwirowywano, usuwano resztki komórkowe, a stężenie białka całkowitego mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm. Uzyskane wyniki normalizowano dla 1 mg białka.

### ***3.5.15. Apoptoza/nekroza w czasie rzeczywistym- wizualizacja za pomocą holotomografii***

Komórki HepG2 wysiano w ilości  $2 \times 10^5$  na jedno dołkowe płytki ibidi®, posiadające szklane dno ( $\mu$ -Dish 35 mm, high Grid-500), w uzupełnionej pożywce EMEM i inkubowano do uzyskania 70-80% konfluencji. Następnego dnia komórki przepłukano PBS, pożywkę zmieniano na FluoroBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific) i traktowano 1mM RK. Efekt proapoptyczny związku obserwowano w czasie rzeczywistym (przez 30 min), za pomocą holotomografu 3D Cell Explorer (Nanolive). Analiza nie wymagała zastosowania barwników i dostarczyła informacji o trójwymiarowym rozkładzie współczynnika załamania światła w komórce (RI). Niska moc światła lasera, które generuje hologramy, pozwala na uniknięcie efektu fototoksyczności, umożliwiając jednocześnie uzyskanie właściwej rozdzielczości. Wizualizacja przyżyciowa była możliwa ze względu na obecność termostatu zapewniającego temp. 37°C i dostępność 5% CO<sub>2</sub>. Uzyskane serie hologramów, zostały przetworzone za

pomocą oprogramowania Steve® (Nanolive), które umożliwia interaktywne barwienie cyfrowe żywych komórek, a także przeprowadza analizę ilościową pomiarów komórek. Efektem działania oprogramowania są zdjęcia komórek.

### ***3.5.16. Tworzenie sferoidów, inkubacja z RK i przygotowanie do analizy cytometrycznej i wizualizacji mikroskopowej***

Procedura tworzenia sferoidów oraz ich przygotowanie do analizy cytometrycznej i wizualizacji mikroskopowej, zostały opisane w podrozdziale 3.4.7. W celu przeprowadzenia analizy za pomocą cytometrii przepływowej, sferoidy zbierano (po 6 sztuk na jedno powtórzenie techniczne), a następnie rozbijano je za pomocą intensywnego pipetowania. Komórki przepłukiwano w DPBS (1 ml) i zawieszano w świeżej pożywce EMEM zawierającej odpowiedni barwnik fluorescencyjny do analizy docelowej i inkubowano przez odpowiedni czas w warunkach wzrostu.

W celu mikroskopowego obrazowania sferoidy nie były rozbijane, natomiast po przepłukaniu buforem PBS były przenoszone do świeżego podłoża zawierającego odpowiedni barwnik fluorescencyjny i inkubowane przez odpowiedni czas w warunkach wzrostu:

#### Analiza apoptozy/nekrozy sferoidów HepG2

Oznaczanie apoptozy/nekrozy przeprowadzono poprzez podwójne znakowanie barwnikami fluorescencyjnymi CellEvent™ Caspase 3/7-FITC (Thermo Fisher Scientific) i 7-AAD (BD-Pharmingen) ze wzbudzeniem/emisją przy długości fali odpowiednio 503/530 nm i 535/617 nm. Inkubacja z barwnikami odbywała się w takich samych warunkach jak w przypadku komórek 2D (podrozdział 3.4.4.). Następnie komórki przemywano dwukrotnie DPBS, aby usunąć resztki barwnika, zawieszano w 500 µl DPBS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson). Uzyskane dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.

#### Analiza LIVE/DEAD sferoidów HepG2

Barwienie za pomocą testu LIVE/DEAD opisano w podrozdziale 3.5.4. Wybarwione sferoidy przemywano dwukrotnie PBS, aby usunąć resztki barwnika, po czym przenoszono je na szalki ze szklanym dnem do mikroskopii konfokalnej i umieszczano w pożywce FluoroBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific). Serie skrawków optycznych w osi Z sferoidów (ang. Z-stack) Z - były zbierane przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 II wyposażonego w laser światła białego (470-670 nm) i komorę środowiskową do analiz

przyżyciowych, która zapewniała kontrolowane warunki temperatury, nasycenia CO<sub>2</sub> i wilgotności. Sekwencyjnie skanowane obrazy były zbierane przy długości fali 490/505-550 nm (zielona fluorescencja) i 530/600-660 (czerwona fluorescencja) nm ( $\pm 20$ ) przy użyciu obiektywu immersyjnego HC PL APO 20x/0,75 i 1.5-krotnym zoomem cyfrowym. Do kontroli skanowania i przetwarzania obrazów użyto oprogramowania Leica LAS AF 2.7.3. i LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D.

#### Analiza potencjału błony mitochondrialnej komórek sferoidów HepG2

Oznaczanie tego parametru przeprowadzono poprzez barwienie z wykorzystaniem 2,5  $\mu$ M JC-1 (ex/em:  $\sim$  485/530 nm i 535/590 nm, odpowiednio dla monomerów i agregatów J) oraz 80 nM TMRE (ex/em:  $\sim$  549/574). Inkubacja z barwinkami odbywała się w takich samych warunkach jak w przypadku komórek 2D (podrozdział 3.5.5.). Następnie komórki przemywano dwukrotnie DPBS, aby usunąć resztki barwnika, zawieszano w 500  $\mu$ l DPBS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson), a dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo. Jako kontrolę pozytywną zastosowano 50  $\mu$ M CCCP, na 10 min. przed końcem inkubacji sferoidów z RK.

W celu obrazowania sferoidów, komórki płukano PBS, przenoszono do świeżej pożywki zawierającej 5  $\mu$ M JC-1 i inkubowano przez 30 min. w warunkach wzrostowych. Następnie sferoidy przemywano dwukrotnie PBS w celu usunięcia resztek barwnika, po czym przenoszono na szalki ze szklanym dnem do analizy w mikroskopii konfokalnej i umieszczano w pożywce FluoroBrite DMEM (ThermoFisher Scientific). Obrazowanie żywych komórek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 II, z laserem światła białego (470-670 nm), obiektywem immersyjnym Plan APO 20x/0,75 i komorą środowiskową do analiz przyżyciowych w warunkach wzrostu. Sekwencyjnie skanowane obrazy skrawków optycznych w osi Z zbierano przy wzbudzeniu/emisji 485/530 nm ( $\pm 20$ ) i 535/590 nm ( $\pm 20$ ) odpowiednio dla zielonej fluorescencji monomerów JC-1 i czerwonej fluorescencji agregatów J. Do przetwarzania obrazów i analizy fluorescencji wykorzystano oprogramowanie Leica LAS AF 2.7.3 i Leica LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D.

#### Analiza indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach sferoidów HepG2

Wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu (RFT) analizowano poprzez barwienie 0,5  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA (ex/em:  $\sim$  492-495/517-527 nm) oraz 1  $\mu$ g/ml 7-AAD (ex/em:  $\sim$  535/617 nm) zgodnie z protokołem producenta (Thermo Fisher Scientific).

Inkubacja z barwinkami odbywała się w takich samych warunkach jak w przypadku komórek 2D (podrozdział 3.4.5). Następnie komórki przemywano dwukrotnie DPBS, aby usunąć resztki barwnika, zawieszano w 500  $\mu$ l DPBS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson), a uzyskane dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.

W celu wykrycia metabolicznego stresu oksydacyjnego, sferoidy komórkowe płukano buforem PBS, przenoszono do świeżej pożywki zawierającej 5  $\mu$ M MitoSOX i barwiono przez 30 min. Dodatkowo, jądra komórkowe znakowano 5  $\mu$ g/ml barwnika Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) przez 5 min. Następnie sferoidy przemywano dwukrotnie PBS w celu usunięcia resztek barwnika, przenoszono na szalki ze szklanym dnem do analizy w mikroskopii konfokalnej i umieszczano w FluoroBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific). Obrazy żywych komórek w osi Z były zbierane przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 II z laserem światła białego (470-670 nm), obiektywem imersyjnym HC PL APO 20x/0,75 i komorą środowiskową do analizy przyżyciowej. Wizualizacje przeprowadzono przy długości fali wzbudzenia 498/505-550 nm (ex/em) dla H<sub>2</sub>DCFDA, 514/570-630 nm (ex/em) dla oznaczania nadtlenu i 405/430-480 nm (ex/em) dla barwienia jąder. Do kontroli skanowania i przetwarzania obrazów wykorzystano oprogramowanie Leica LAS AF 2.7.3 i LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D.

### **3.6. Wpływ rybozydu kinetyny i jego pochodnych na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach glejaka wielopostaciowego**

#### **3.6.1. Modelowanie homologiczne półotwartej konformacji ludzkiej kinazy adenozynej**

W celu przeprowadzenia dokowania molekularnego wykorzystano półotwartą konformację struktury kinazy adenozynej (ADK), ponieważ duże podstawniki przy N<sup>6</sup> adenozynej (takie jak grupa furfurylowa obecna w RK), hamują całkowite zamknięcie miejsca wiązania ADK, a fosforylacja takich substratów odbywa się w stanie półotwartym [208, 209]. Jedyną dostępną strukturą ADK w konformacji półotwartej jest struktura *Toxoplasma gondii* ADK skompleksowanej z N<sup>6</sup>-dimetyloadenozyną (kod PDB: 2A9Y). Aby otrzymać ludzki model ADK w konformacji półotwartej, przeprowadzono modelowanie homologiczne z wykorzystaniem *T. gondii* ADK jako wzorca. Sekwencja ludzkiego ADK (kod PDB: 1BX4) została użyta jako sekwencja białka docelowego. W obu strukturach (2A9Y i 1BX4) wszystkie kluczowe oddziaływania białko-ligand w miejscu katalitycznym są zachowane

[115, 208, 209]. Aby przygotować 2A9Y do modelowania, usunięto obecne w strukturze ligandy, a rekonstrukcję brakujących atomów przeprowadzono przy użyciu programu Swiss PDB Viewer (SPDBV) [196]. Usunięto prawie wszystkie cząsteczki wody, z wyjątkiem czterech (HOH6014, HOH6045, HOH6051 i HOH6054), które znajdują się w odległości 3,5 Å od 5'OH N6-dimetyloadenozyny w strukturze 2A9Y. Wykazano, że zachowanie kluczowych cząsteczek wody ogólnie poprawia symulacje dokowania [210], a w tym przypadku stabilizuje pozycję ligandu podczas dokowania molekularnego, zapobiegając w ten sposób nieprawidłowym oddziaływaniom pomiędzy 5'OH analogów KR i G315 w strukturze 2A9Y. Przygotowaną strukturę 2A9Y wykorzystano następnie do dostosowania i wyrównania z sekwencją 1BX4, a modelowanie homologiczne przeprowadzono przy użyciu programu Modeler 9.18 [197] wykorzystywanego do obu etapów. Przed minimalizacją otrzymanego modelu, do reszt białkowych dodano atomy wodoru, a pozostałe cząsteczki wody i ich pozycje zoptymalizowano za pomocą programu PROPKA3 [211] z zastosowaniem następujących warunków: brak obliczeń pKa, pole siłowe Amber, zapewnienie, że nowe atomy nie są przebudowywane zbyt blisko istniejących atomów, optymalizacja sieci wiązań wodorowych oraz przypisanie ładunków ligandowi podanemu w pliku MOL2 (ligand referencyjny: 26A z 2A9Y z atomami wodoru dodanymi wcześniej za pomocą programu Chimera [212]). Następnie, kompleks modelu i liganda referencyjnego został zminimalizowany w celu zapewnienia lepszej orientacji reszt w miejscu katalitycznym w kierunku liganda. Dla liganda referencyjnego wykorzystano moduł Antechamber programu AmberTools17 [200] do przypisania typów atomów i obliczenia ładunków atomowych metodą AM1-BCC [201]. Następnie, za pomocą modułu parmchk programu AmberTools17, wyznaczono brakujące parametry. Pliki topologiczne i współrzędnościowe dla liganda referencyjnego i jego kompleksu z białkiem zostały utworzone przy użyciu modułu leap programu AmberTools17. Ogólne pole siłowe Amber [202] zostało użyte dla kompleksu, a pole siłowe ff99SB [213] dla białka. Podczas minimalizacji zastosowano ograniczenia pozycyjne atomów szkieletu ze stałą siły ograniczenia 500 kcal/mol Å<sup>-2</sup>. Minimalizację przeprowadzono w domyślnym rozpuszczalniku „implicit” (metoda ta jest często stosowana do szacowania energii swobodnej oddziaływań rozpuszczalnik-rozpuszczalnik w procesach strukturalnych) i zastosowano uogólniony model Borna [204], w którym pierwsze 250 kroków stanowiło najbardziej strome zejście, a następnie 750 kroków gradientu sprzężonego. Zastosowano odcięcie 16 Å i wykorzystano granicę periodyczną o stałej objętości.

### **3.6.2. *Przygotowanie ligandów i dokowanie molekularne***

Struktury 3D RK i analogów adenozyiny zostały pierwotnie pobrane z bazy danych ZINC12 (28), a następnie wykorzystane do budowy ich N<sup>6</sup>-furfurylowych pochodnych przy użyciu programu GaussView z pakietu Gaussian 03 [205]. Pliki pdbqt zostały użyte podczas dokowania dla ostatecznego modelu, a ligandy zostały utworzone przy użyciu programu AutoDockTools 1.5.6 [206, 214]. Do obliczeń dokowania użyto programu AutoDock Vina [207]. Przestrzeń poszukiwań ustalono na 22,5×15×15 Å z domyślnym odstępem 0,375 Å, a współrzędne środka ustalono na -9, -41 i -106 w wymiarach odpowiednio x, y i z. Rysunki przygotowano za pomocą programu AutoDockTools [206, 214].

### **3.6.3. *Synteza 8-azaRK i 7-deazaRK***

Pochodne RK zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Komponentów Kwasów Nukleinowych IChB PAN, zgodnie z protokołem opisanym przez Baranowskiego i wsp. [215]. Struktury chemiczne związków zostały narysowane przy użyciu programu ACD/ChemSketch (2017) Freeware.

### **3.6.4. *Hodowla komórek***

Procedura związana z hodowlą komórek T98G jest analogiczna do tych opisanych w podrozdziałach 3.1., 3.2. oraz 3.4. Ponadto, w tym rozdziale (3.6.), Do analizy metabolizmu energetycznego i porównawczych pomiarów stresu oksydacyjnego, wykorzystano dodatkowo komórki raka wątrobowokomórkowego- HepG2.

### **3.6.5. *Analiza zużycia tlenu***

Komórki HepG2 i T98G wysiano na butelki T75 i hodowano aż do osiągnięcia przez komórki 80% konfluencji. Następnie komórki przemywano jednokrotnie PBS i zbierano przy użyciu skrobaczki. Zebrane komórki liczone, odwirowywano (1000 rpm, 3 min) i ponownie zawieszano w pożywce uzupełnionej EMEM. Dalsza procedura oraz obliczenie parametrów oddechowych, odbywało się w taki sam sposób jak opisano w podrozdziale 3.5.14. Dodatkowym parametrem, który obliczono była zapasową pojemność oddechową (SRC), stanowiąca różnicę między stanem U a oddychaniem podstawowym.

### **3.6.6. *Analiza porównawcza generowania mitochondrialnych RFT przeprowadzona za pomocą cytometrii przepływowej***

Komórki HepG2 i T98G wysiano na 6-dołkowych płytkach w gęstości  $2,5 \times 10^5$  komórek na dołek. Po 24 h komórki poddano działaniu induktora RFT - menadionu (Sigma-Aldrich) w końcowym stężeniu 10, 30 lub 50  $\mu\text{M}$ , przez 30 min. Następnie komórki trypsynizowano, przemywano dwukrotnie 1 ml DPBS (Thermo Fisher Scientific) i inkubowano z barwnikiem MitoSOX Red w stężeniu 1  $\mu\text{M}$  (Invitrogen), w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , przez 25 min w ciemności. Natychmiast po barwieniu komórki były analizowane za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson), a dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.

### ***3.6.7. Tworzenie sferoidów, inkubacja ze związkami i przygotowanie do wizualizacji mikroskopowej – selekcja pochodnej RK***

Przygotowanie sferoidów komórek T98G (2000 komórek na dołek) przebiegało w taki sam sposób jak opisano w podrozdziale 3.4.7. Po 72 h dojrzewania, sferoidy komórkowe traktowano 80 i 200  $\mu\text{M}$  RK, 8-azaRK i 7-deazaRK przez 24, 48 i 72 h. Sferoidy uzupełniano co 24 h, usuwając 100  $\mu\text{l}$  pożywki z każdego dołka i zastępując ją 100  $\mu\text{l}$  świeżej pożywki, zawierającej odpowiednie stężenie związku. Na koniec każdego czasu inkubacji (24, 48 i 72 h) przeprowadzono analizę żywotności sferoidów oraz indukcji stresu oksydacyjnego. Obserwowano produkcję RFT w celu identyfikacji różnych parametrów SO (stres oksydacyjny) przyczyniających się do powstawania cytoplazmatycznego SO oraz selektywnych RFT (np. nadtlenków).

W celu obrazowania sferoidów, komórki były płukane w PBS, przenoszone do świeżego podłoża zawierającego odpowiedni barwnik fluorescencyjny, do znakowania cząsteczek docelowych i inkubowane przez odpowiedni czas w warunkach wzrostu:

#### Analiza LIVE/DEAD sferoidów T98G- barwienie opisane w podrozdziale 3.5.4.

W trakcie wizualizacji, sekwencyjnie skanowane obrazy były zbierane przy długości fali 490/505-550 nm (zielona fluorescencja) i 530/600-660 (czerwona fluorescencja) nm ( $\pm 20$ ) przy użyciu obiektywu immersyjnego HC PL APO 20x/0,75 i 1.5-krotnym zoomem cyfrowym.

#### Pomiary wewnątrzkomórkowego i mitochondrialnego stresu oksydacyjnego w sferoidach T98G- barwienia opisane w podrozdziale 3.5.7.



Sekwencyjnie skanowane obrazy były pozyskiwane przy 498/505-550 nm (ex/em) dla H<sub>2</sub>DCFDA, 514/570-630 nm (ex/em) dla oznaczania nadtlenu i 405/430-480 nm (ex/em) dla barwienia jąder.

W przypadku powyższych eksperymentów, do kontroli przetwarzania obrazów wykorzystano oprogramowanie Leica LAS AF 2.7.3, natomiast do analizy intensywności fluorescencji wykorzystano oprogramowanie Leica LAS X 3.3.3 z modułem dekonwolucji 3D. Analizę intensywności fluorescencji przeprowadzono z wykorzystaniem funkcji maksymalizacji obrazu uzyskanego z nałożenia skrawków optycznych zebranych w osi Z. Wyniki prezentowane są jako średnia intensywności fluorescencji.

### **3.6.8. Analiza porównawcza właściwości przeciwnowotworowych i pro-oksydacyjnych RK i 7-deazaRK, z wykorzystaniem dwuwymiarowej hodowli komórek T98G**

#### **3.6.8.1. Fosforylacja *in vitro***

Nowe analogi nukleozydów były oceniane jako substraty dla ADK w teście fosforylacji *in vitro* (Precice ADK Assay Kit, NovoCIB). Reakcję fosforylacji 7-deazaRK katalizowaną przez kinazę adenozyliny (ADK) prowadzono przez 30 min., w temp. 37°C w buforze reakcyjnym (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 250 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM NAD, 2,75 mM ATP, IMPDH 20 mU/ml i ludzki rekombinowany ADK 2,2 mU/ml). Pozytywną kontrolę wydajności reakcji stanowiła reakcja fosforylacji z 4 mM RK jako substratem, natomiast w celu zahamowania reakcji (kontrola negatywna) dodawano 5-jodotubercydynę (inhibitor ADK) do końcowego stężenia 500 μM. Produkty fosforylowane rozdzielano i identyfikowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, na fluorescencyjnych płytkach TLC Silica Gel 60 F254 (20 × 20 cm, Merck Millipore) z zastosowaniem fazy rozdzielającej o składzie amoniak: izopropanol: woda (2: 7: 1 v/v). Po rozdziale, płytki zostały wysuszone, a produkty reakcji wizualizowane przy użyciu Gel Doc-it Imaging System (UVP). Wydajność fosforylacji obliczono przy użyciu oprogramowania Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japonia) dla Windows.

#### **3.6.8.2. Bioluminescencyjny pomiar zawartości komórkowego ATP**

Komórki T98G były wysiewane w ilości 3 × 10<sup>5</sup> komórek/dołek, na 6-dołkowych płytkach i hodowane w suplementowanym podłożu wzrostowym EMEM w temperaturze 37°C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub> do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie komórki poddawano działaniu RK i 7-deazaRK w końcowym stężeniu 80 i 200 μM przez 6 h. Dalsza procedura przebiegała tak jak opisano w podrozdziale 3.5.8.

### *3.6.8.3. Analiza proliferacji komórek w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu xCELLigence*

Analizę proliferacji komórek T98G ( $4 \times 10^3$  komórek/dołek) przeprowadzono przy użyciu systemu xCELLigence (Roche), a jej przebieg szczegółowo został opisany już w podrozdziale 3.4.3. Po 24 h komórki poddawano działaniu RK i 7-deazaRK, w końcowym stężeniu 80 i 200  $\mu\text{M}$ . Równocześnie komórki T98G traktowano kombinacją każdego z rybozydów w połączeniu z 1  $\mu\text{M}$  5-jodotubercydyną (inhibitor ADK). Komórki kontrolne hodowano tylko w pożywce uzupełnionej. Proliferację komórek T98G traktowanych związkami monitorowano w czasie rzeczywistym, w 30-minutowych odstępach czasowych, od momentu posiewu przez 96 h.

### *3.6.8.4. Oznaczanie apoptozy/nekrozy metodą cytometrii przepływowej*

Komórki T98G ( $3 \times 10^5$ ) wysiano na płytki 6-dołkowe zawierające podłoże wzrostowe (EMEM), inkubowano do uzyskania 70-80% konfluencji komórek. Następnego dnia komórki były traktowane przez 24 h RK i 7-deazaRK, w końcowych stężeniach 40, 80 i 200  $\mu\text{M}$ . Po 24 h przeprowadzono analizę apoptozy/nekrozy, tak jak opisano w podrozdziale 3.4.4. Komórki były analizowane natychmiast po barwieniu z wzbudzeniem przy długości fali 488 nm przez cytometr przepływowy FACSCalibur (Becton Dickinson), a dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.

### *3.6.8.5. Pomiar metabolicznego SO (cytoplazmatycznego i mitochondrialnego) za pomocą cytometrii przepływowej*

Komórki T98G wysiewano w ilości  $3 \times 10^5$  komórek/dołek na płytki 6-dołkowe i hodowano w EMEM, w temperaturze 37°C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>, aż do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie komórki traktowano przez 24 h badanymi związkami w końcowym stężeniu 40, 80 i 200  $\mu\text{M}$ . Procedury barwienia opisano w podrozdziałach 3.4.5. (H<sub>2</sub>DCFDA) oraz 3.5.7. (MitoSOX). Po wybarwieniu komórki analizowano z wzbudzeniem przy długości fali 488 nm za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson), a dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.

### *3.6.8.6. Pomiar peroksydacji lipidów metodą cytometrii przepływowej*

Komórki T98G wysiewano w ilości  $3 \times 10^5$  komórek/dołek, na 6-dołkowe płytki i hodowano w EMEM w temperaturze 37°C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub>, aż do osiągnięcia 70-80% konfluencji. Następnie komórki traktowano przez 24 h badanymi związkami w końcowym

stężeniu 40, 80 i 200  $\mu\text{M}$ . Po zakończeniu inkubacji, komórki trypsynizowano i przemywano dwukrotnie DPBS (1 mL), a wewnątrzkomórkowe utlenianie lipidów analizowano przy użyciu odczynnika BODIPY® 581/591 C11 zgodnie z protokołem producenta (Thermo Fisher Scientific). Po utlenieniu barwnika w żywych komórkach przesunięciu ulega pik emisji fluorescencji z 590 nm (czerwony) na 510 nm (zielony). Wybarwione komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson) przy długości fali wzbudzenia 488 nm, a uzyskane dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo. Stosunek sygnału z kanałów 590 do 510 został użyty do ilościowego określenia peroksydacji lipidów w komórkach.

#### *3.6.8.7. Pomiar poziomu zredukowanego glutationu za pomocą cytometrii przepływowej*

Komórki T98G wysiewano w ilości  $3 \times 10^5$  komórek/dołek, na płytce 6-dołkowej i hodowano w EMEM w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  i 5% nasyceniu  $\text{CO}_2$ , aż do osiągnięcia 70-80% konfluencji komórek. Następnie komórki poddawano działaniu RK i 7-deazaRK w końcowym stężeniu 40, 80 i 200  $\mu\text{M}$  przez 24 h. Spadek stężenia zredukowanego glutationu (GSH) w komórkach, mierzono przy użyciu barwnika Thiolite Green (AAT Bioquest), który emituje silną fluorescencję w reakcji z tiolami, ze wzbudzeniem i emisją przy długości fali 540 nm i 590 nm. Komórki traktowane RK trypsynizowano i przemywano dwukrotnie, jak opisano powyżej, a następnie zawieszano w roztworze barwiącym i inkubowano przez 30 min. Natychmiast po barwieniu intensywność fluorescencji była analizowana przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur z wzbudzeniem przy długości fali 488 nm, a dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo.

#### *3.6.8.8. Analiza 8-oxo-dG w komórkach T98G metodą HPLC-UV-ED*

Komórki T98G ( $1 \times 10^6$  komórek/mL) wysiewano na butelkach T25 i hodowano w uzupełnionym podłożu wzrostowym przez 24 h. Następnie komórki poddawano działaniu RK i 7-deazaRK w końcowym stężeniu 80 i 200  $\mu\text{M}$  przez 24 h. Po inkubacji komórki trypsynizowano, płukano dwukrotnie PBS i wirowano (200 x g, 3 min). Całkowite DNA izolowano z komórek poddanych działaniu związków oraz z komórek nietraktowanych, przy użyciu zestawu do izolacji Genomic mini DNA (A&A Biotechnology), zgodnie z protokołem producenta. Jakość całkowitego DNA oceniano spektrofotometrycznie.

DNA (1  $\mu\text{g}$ ) rozpuszczano w buforze octanowo-sodowym (10  $\mu\text{l}$ , 40 mM, pH 5,3) zawierającym  $\text{ZnCl}_2$  (0,1 mM) i trawiono nukleazą P1 (3  $\mu\text{g}$ ). Próbkę inkubowano przez 3 h w temp.  $37^\circ\text{C}$ . Następnie dodawano Tris-HCl (2  $\mu\text{l}$ , 1 M, pH 8,0) i fosfatazę alkaliczną (1 U), a

próbki inkubowano dalej przez 2 h, w temp. 37°C. Wszystkie hydrolizaty DNA poddano ultrafiltracji przy użyciu filtrów membranowych o odcięciu 10 000 Da. Zawartość 8-oxo-dG i dG w hydrolizatach oznaczano metodą HPLC-UV z detekcją elektrochemiczną (Coulchem III Electrochemical Detector, ESA, Inc., Chelmsford, MA, USA). Do rozdziału hydrolizatów DNA (elucja izokratyczna) wykorzystano octan amonu (50 mM pH 5.3)/metanol (93:7 v/v). Detekcję dG przeprowadzono przy długości fali 254 nm. Pomiaru 8-Oxo-dG dokonano przy użyciu detektora elektrochemicznego: +400 mV, detektor 1: +130 mV (jako elektroda przesiewowa) oraz detektor 2: +350 mV (jako elektroda pomiarowa ustawiona na czułość 500 nA/V). Aby określić zawartość 8-okso-dG, konieczne jest oznaczenie ilości guanozyny. Całkowitą ilość 8-okso-dG w genomie obliczono stosując wzór opisany w publikacji [216].

### 3.6.8.9. Izolacja całkowitego RNA, synteza cDNA i analiza PCR w czasie rzeczywistym

Komórki T98G wysiano w ilości  $1,5 \times 10^5$  komórek/dołek, na płytce 12-dołkowej i hodowano w EMEM, w temperaturze 37°C i 5% nasyceniu CO<sub>2</sub> aż do osiągnięcia 70-80% konfluencji komórek. Następnie przeprowadzono izolację RNA według procedury opisanej w podrozdziale 3.4.9. Całkowite RNA (0,5 µg) wykorzystano do syntezy cDNA za pomocą zestawu Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) z użyciem starterów oligo(dT), zgodnie z protokołem producenta. Analizę PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w celu określenia poziomu ekspresji genów SOD, CAT, GSS, SESN1, SESN2, NRF2, NFKB, SIRT2, PGC1, PARP, TFA i P53. Procedura przygotowania mieszaniny reakcyjnej oraz warunków przeprowadzenia reakcji została opisana w podrozdziale 3.4.22. Sekwencje starterów dla analizowanych genów i fluorescencyjnych sond UPL przedstawiono w **Tabeli 2**.

**Tabela 2:** Lista starterów używanych do analizy PCR w czasie rzeczywistym

Skrócona nazwa genu	Pełna nazwa genu	Starter przedni (forward) 5'-3'	Starter wsteczny (reverse) 5'-3'	Nr sondy UPL	
Geny referencyjne	<i>ACTB</i>	Beta Aktyna	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGATAG	64
	<i>TBP</i>	TATA-Box Binding Protein	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	CACACGCCAAGAAACAGTGA	3
	<i>PGK1</i>	Kinaza fosfoglicerynianowa 1	ACGCTACTGCATTCCTGCTT	ACTGTTTTGTGGGTGTTTTTGT	13
	<i>HPRT1</i>	Fosforybozylotransferaza 1 hipoksantyny	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	73

Geny badane	<i>CAT</i>	Katalaza	TCATCAGGGATCCCATATTGTT	CCTTCAGATGTGTCTGAGGATTT	76
	<i>GSS</i>	Syntetaza glutationu	CCTGCTAGTGGATGCTGTCA	TCATCCTGTTTGATGGTGCT	1
	<i>SOD</i>	Dyzmutaza ponadtlenkowa	TCCATGTTCATGAGTTTGGAGAT	TCTGGATAGAGGATTAAGTGAGGA	40
	<i>SESN1</i>	Sestryna 1	GGGCCGTTACCCTACATTA	TTCACCTAAGTAGGAGCACTGATGTC	46
	<i>SESN2</i>	Sestryna 2	TCCGCCACTCAGAGAAGG	GGAGGGCGTACAGCAGAGAG	68
	<i>NRF2</i>	Czynnik jądrowy eryteroidowy 2	CAGATGCCACAGTCAACACA	GGCTCAGCTATGAAAGCAGAA	9
	<i>NFKB</i>	Czynnik jądrowy kappa B	ACCCAAGGACATGGGTGTC	AGCCCTTATACACGCCTCTCT	47
	<i>SIRT2</i>	Sirtuina 2	TTCAAGCCAACCATCTGTCA	GCTCCAGGGTATCTATGTTCT	40
	<i>PGC1a</i>	Koaktywator PPARG 1 alfa	AAACGATGACCCTCCTCACA	TTCTTTTTGGAGGTGCATTTG	84
	<i>PARP1</i>	Polimeraza poli(ADP-Rybozy) 1	GACAGGAAAGACAACAGACAAAATC	GGGGTGATGTGTTTGAACCTTG	7
	<i>TNFA</i>	Czynnik martwicy nowotworów alfa	CAGCCTCTCTCCTCTGAT	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	40
	<i>P53</i>	Białko nowotworowe P53	TAGTGTGTGGTGCCCTATG	CACATGTAGTTGTAGTAGTGATGGGT	21

### 3.7. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism w wersji 8.0 dla Windows (GraphPad Software, San Diego CA, USA). W celu określenia istotności przeprowadzonych analiz cytometrycznych: potencjału błonowego mitochondriów, indukcji stresu oksydacyjnego, poziomu ATP (metoda bioluminescencyjna), indukcji autofagii, mitofagii, poziomu wapnia, wychwytu glukozy i tworzenia purynosomów, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (one-way) ANOVA, a następnie test wielokrotnych porównań Tukey'a. W celu określenia istotności statystycznej zmian w cyklu komórkowym zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (two-way) ANOVA, z korektą Bonferroni'ego, natomiast istotność statystyczną żywotności komórek wykazaną za pomocą barwienia na apoptozę/nekrozę, określono za pomocą dwuczynnikowej analizy ANOVA, z testem Tukey'a (w przypadku testu apoptozy/nekrozy w eksperymentach z galaktozą, przeprowadzono korektę Bonferroni'ego). Istotność statystyczna poziomu komórkowego ATP (Agilent Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay) została wykazana w wyniku przeprowadzenia jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Dunnett's. Natomiast istotność analizy poziomu ATP pochodzącego z oddychania mitochondrialnego i glikolizy, została potwierdzona za pomocą dwuczynnikowej analizy ANOVA oraz testu

Sidak'a. Do określenia istotności analiz cytometrycznych SO komórek, poziomu glutationu, zawartości 8-oxo-dG i peroksydacji lipidów zastosowano jednoczynnikową analizę ANOVA, z testem wielokrotnych porównań Dunnett'a; do pomiaru poziomu anionorodników ponadtlenkowych zastosowano jednoczynnikową analizę ANOVA, z korektą Bonferroni'ego.

Istotność statystyczna eksperymentów dotyczących wpływu RK na metabolizm komórek nowotworowych, w których wykorzystano sferoidy, została określona za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z korektą Dunnett'a. Z kolei intensywność fluorescencji sferoidów po barwieniu MitoSOX, LIVE/DEAD i H<sub>2</sub>DCFDA została oceniona za pomocą dwuczynnikowej analizy ANOVA, z testem wielokrotnych porównań Tukey'a. Istotność statystyczną analizy proteomicznej, zużycia tlenu oraz pomiarów ECAR i OCR określono za pomocą dwuczynnikowego testu *t-Studenta*. Porównywano dwie grupy, a wartości  $P < 0,05$  uznawano za istotne.

Do analizy poziomu ekspresji genów użyto jednoczynnikowej ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Dunnett'a. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SD uzyskane z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń eksperymentalnych dla każdego z nich. Wartości  $P < 0,05$  uznano za statystycznie istotne.

W niniejszej pracy doktorskiej:

1. Wizualizacje mikroskopowe, transkrypcja RNA *in vitro* (wraz ze znakowaniem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP) i analiza Western Blot purynosomów, zostały wykonane przez dr Agnieszkę Fedoruk-Wyszomirską (Pracownia Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN),
2. Analizy HPLC-DAD-ESI/MS przeprowadziła dr hab. Małgorzata Giel-Pietraszuk, prof. IChB PAN (Pracownia Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN),
3. Pomiary prędkości zużycia tlenu przez komórki nowotworowe pod wpływem RK (System Oxygraph+, Hansatech Instruments) powstały dzięki współpracy z Prof. dr hab. Hanną Kmitą (Zakład Bioenergetyki, UAM w Poznaniu) oraz dr Daria Grobys (UAM w Poznaniu),
4. Analizę modelowania i dokowania molekularnego przeprowadziła mgr Patrycja Krawczyk (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge).

## 4. WYNIKI

### 4.1. Udział rybozydu kinetyny w metabolizmie puryn

#### 4.1.1. Udział analogu adenozy- rybozydu kinetyny w szlakach enzymatycznych biosyntezy puryn w komórkach eukariotycznych

N<sup>6</sup>-furfuryloadenozy- rybozyd kinetyny, RK) jest analogiem adenozy- biorącym udział w metabolizmie puryn, na który składają się trzy główne szlaki: rezerwowy, kataboliczny i *de novo*. Jest ona prekursorem trójfosforanów nukleotydów RNA i DNA (**Rys. 1A**).

Szczegółowo zbadano biosyntezę puryn, aby zrozumieć, jak wybrane procesy są aktywowane w obecności RK i wykazano, że jego obecność w komórkach spowodowała przepływ metaboliczny puryn. Aby określić udział RK w szlakach komórkowych, zastosowano technologię wykorzystującą stabilne, nieradioaktywne znaczniki [97], dlatego RK jako związek prekursorowy szlaku, wyznakowano zastępując atom węgla- <sup>12</sup>C w pozycji C1 pierścienia rybozy, izotopem <sup>13</sup>C. Zmiana ta umożliwiła rozróżnienie tego izotopu na podstawie różnicy mas cząsteczkowych oraz śledzenie pośrednich i końcowych metabolitów RK w komórkach za pomocą HPLC-DAD-ESI/MS. Wykorzystanie stabilnego izotopu <sup>13</sup>C pozwoliło na wykrycie pochodnych RK wbudowanych do DNA i RNA (**Rys. 1**).

Dotychczasowe dowody na udział rybozydu kinetyny w szlakach przemian puryn ograniczały się do roli kinazy adenozy- (ADK) i katalizowanej przez nią reakcji fosforylacji metabolitów będących analogami adenozy- [117].





#### 4.1.2. Wyznaczenie optymalnego stężenia RK dla analiz obejmujących badania przepływu metabolicznego

Badania rozpoczęto od wyboru optymalnego stężenia RK, które nie indukowałoby nadmiernego poziomu apoptozy, ale było wystarczające do śledzenia enzymatycznej transformacji RK w komórkach eukariotycznych.

Aby przeanalizować przemiany metaboliczne, testowano trzy różne stężenia RK (40, 80, 200  $\mu\text{M}$ ) w komórkach HepG2, spośród których wybrano 80  $\mu\text{M}$ , które było właściwe do dalszych analiz. Przy użyciu systemu xCELLigence, zbadano proliferację komórek w czasie rzeczywistym, a proces apoptozy/nekrozy analizowano za pomocą cytometrii przepływowej, stosując podwójne barwienie odczynnikami Caspase-3/7 Green Reagent i 7AAD (**Rys. 2**).

RK wpływał na proliferację komórek HepG2 w sposób zależny od stężenia i czasu (**Rys. 2A**), a po traktowaniu komórek 80  $\mu\text{M}$  rybozydem kinetyny przez 24 h, śmierć komórkową zaobserwowano w około 50% całej analizowanej populacji komórek (**Rys. 2B**). W związku z tym stężenie 80  $\mu\text{M}$  uznano za optymalne dla dalszych analiz przemian metabolicznych.

Apoptoza jest procesem skorelowanym ze spadkiem poziomu ATP, co z kolei związane jest z wewnątrzkomórkową przemianą RK (fosforylacja do monofosforanu) przez kinazę adenozyliny (ADK). Po zastosowaniu inhibitora ADK (ADKi- 5-jodotubercydyna) nie zaobserwowano aktywności antyproliferacyjnych i proapoptotycznych rybozydu kinetyny (**Rys. 2A i 3B**), co potwierdza rolę ADK w reakcji fosforylacji i wskazuje, że cytotoksyczny efekt RK jest związany z aktywnością ADK i stężeniem związku.

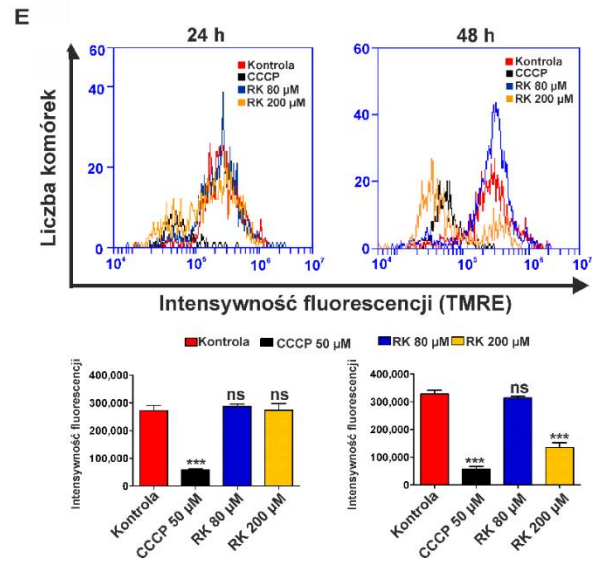
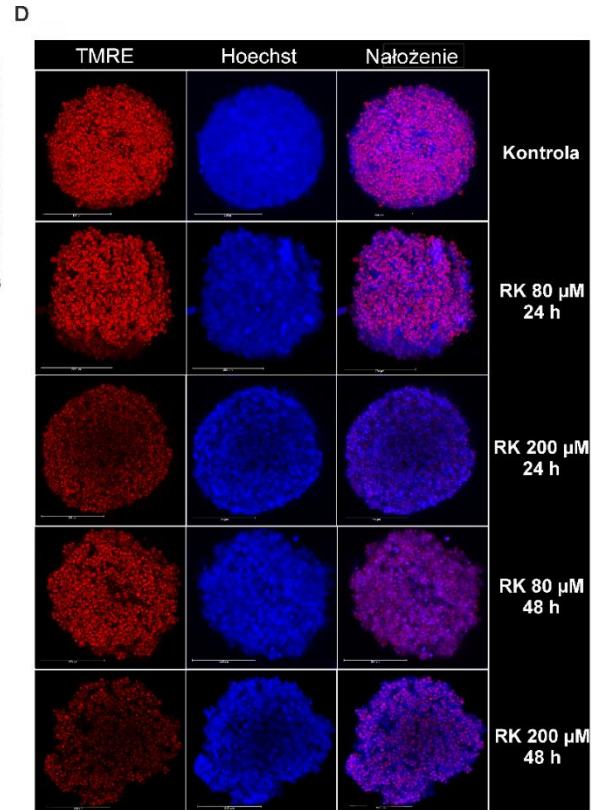
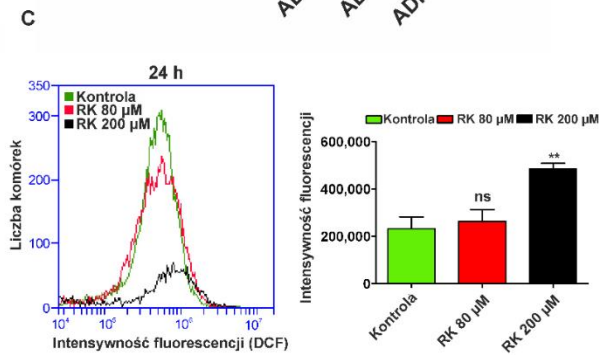
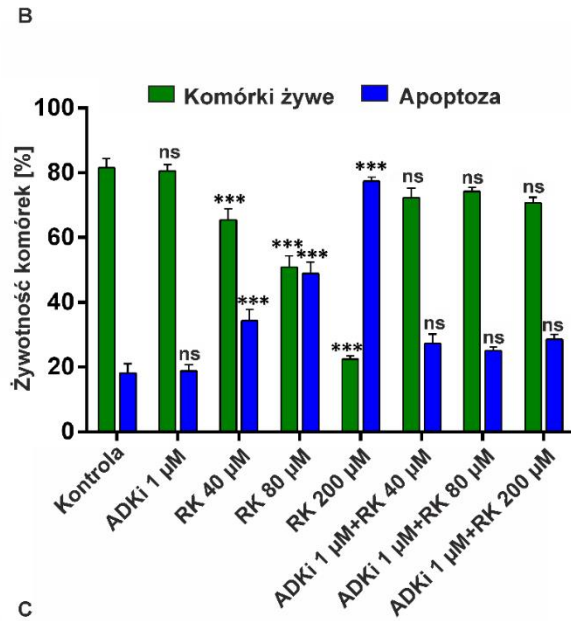
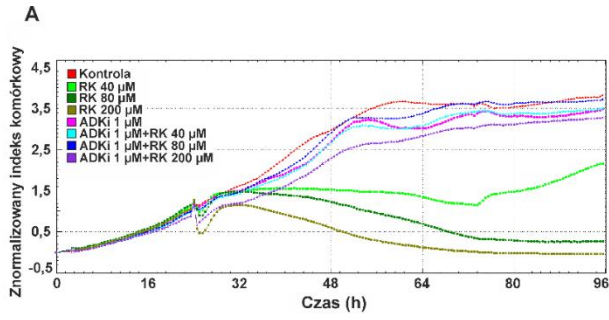
Następnie przeanalizowano proces powstawania reaktywnych form tlenu (RFT), których zbyt wysoki poziom, może zaburzać stan fizjologiczny komórek, poprzez uszkodzenie białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Zbadano zarówno komórkowy jak i mitochondrialny stres oksydacyjny w obecności RK. Stres oksydacyjny indukowano i oceniano w hodowlach 3D komórek HepG2 (sferoidy komórkowe), które są powszechnie stosowane jako model *in vitro* do walidacji leków przeciwnowotworowych. Sferoidy umożliwiają przede wszystkim badanie odpowiedzi na związki niskocząsteczkowe i ocenę skuteczności ich działania. Poziom cytoplazmatycznych RFT był mierzony poprzez zastosowanie barwnika- diaoctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCFDA) i przy użyciu cytometrii przepływowej. Po 24 h inkubacji, okazało się, że 80  $\mu\text{M}$  RK nie wywołał aktywacji RFT, podczas gdy 200  $\mu\text{M}$  stężenie RK było silnym induktorem stresu

oksydacyjnego, wykazując dwukrotnie większy efekt w porównaniu z komórkami nietraktowanymi (**Rys. 2C**).

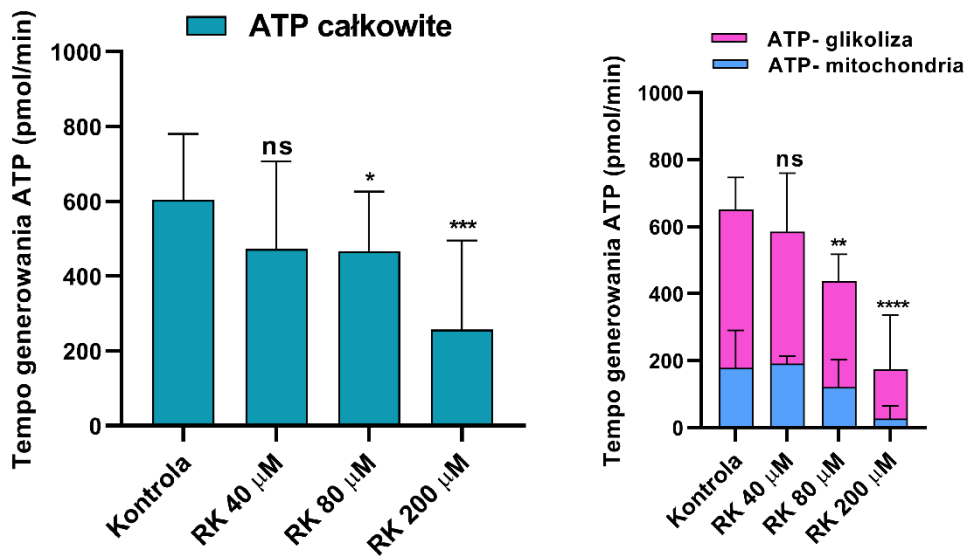
Potencjał błony mitochondrialnej (MMP) jest ważnym parametrem fizjologicznym, odnoszącym się do zdolności komórek do generowania ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Stanowi kluczowy wskaźnik „zdrowia” komórek lub ich uszkodzenia i odpowiada za regulację produkcji RFT. MMP wspólnie z gradientem pH stanowią siłę „napędzającą” protony do wnętrza mitochondriów [217].

Wykorzystując mikroskopię konfokalną i cytometrię przepływową, zbadano wpływ RK w stężeniu 80 i 200  $\mu\text{M}$ , na mitochondrialny stan redoks sferoidów HepG2 po 24 h (**Rys. 2D i E**). Obserwowane minimalne zmiany (nieistotne statystycznie) intensywności czerwonej fluorescencji TMRE świadczyły o tym, że 80  $\mu\text{M}$  RK nie zaburzał potencjału błony mitochondrialnej traktowanych sferoidów, natomiast 200  $\mu\text{M}$  RK istotnie obniżał ich MMP.

Ponadto, stosując analizator Seahorse XFp do ilościowego oznaczania ATP, wykazano obniżenie poziomu ATP w komórkach HepG2 traktowanych RK (**Rys. 2F**). Gwałtowny spadek poziomu ATP był wykrywalny w ciągu ok. 1 h (czas trwania pojedynczego pomiaru, poprzedzonego 6-godzinną inkubacją komórek z RK) i zmalał o ponad 58% w komórkach poddanych działaniu 200  $\mu\text{M}$  RK, podczas gdy niższe stężenia obniżyły zawartość ATP o ok. 23%. Do eksperymentu, wybrano optymalne warunki czasowe (6 h inkubacji ze związkiem), a wydłużenie czasu inkubacji nie spowodowałoby większego wyczerpania poziomu ATP. Łącznie dane te sugerują, że szybki i wyraźny spadek poziomu ATP jest wczesną konsekwencją ekspozycji na RK i prowadzi do utraty żywotności komórek (**Rys. 2F**). Analiza ta pokazała też, że większa część ATP pochodziła z procesu glikolizy, a mniejsza powstała w wyniku działania mitochondriów. W przypadku komórek traktowanych 40 i 80  $\mu\text{M}$  RK, poziom „ATP mitochondrialnego”, był zbliżony do tego w komórkach nietraktowanych, natomiast dopiero przy najwyższym stężeniu związku- 200  $\mu\text{M}$ , zaobserwowano 85 % spadek poziomu ATP w stosunku do komórek kontrolnych (**Rys 2F**).



F



**Rysunek 2: Biologiczny status komórek HepG2 w obecności RK.** (A, B) Zmiany żywotności komórek HepG2 po traktowaniu RK (40, 80 i 200  $\mu\text{M}$ ) i w obecności 1  $\mu\text{M}$  5-jodotubercydyny (inhibitor AdK). (A) Analiza proliferacji komórek w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu xCELLigence trwająca 96 h. Proliferacja komórek monitorowana była w odstępach 30 min. (B) Analiza cytometryczna procesu apoptozy/nekrozy w komórkach HepG2 po 24 h i zastosowaniu podwójnego barwienia Casp 3/7-FITC/7-AAD. Dane przedstawione są jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. (C) Wewnątrzkomórkowa produkcja RFT w komórkach HepG2 indukowana przez RK mierzona za pomocą cytometrii przepływowej i podwójnego barwienia H<sub>2</sub>DCFDA/PI. Wszystkie przedstawione histogramy intensywności fluorescencji pokazują reprezentatywne analizy, a wykresy słupkowe przedstawiają dane z trzech niezależnych eksperymentów wyrażone jako średnia  $\pm$  SD. Istotność statystyczna została oznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ . (D, E) Status błony mitochondrialnej w sferoidach HepG2 po 24 i 48 h traktowania RK (80 i 200  $\mu\text{M}$ ) określony za pomocą barwienia TMRE. (D) Analiza zmian intensywności fluorescencji w mikroskopii konfokalnej. Czerwona fluorescencja przedstawia mitochondria barwione TMRE (lewy panel); niebieska fluorescencja przedstawia jądra znakowane Hoechstem 33342 (środkowy panel), a fuzje dwóch obrazów fluorescencyjnych są pokazane w prawym panelu. Paski skali, 250  $\mu\text{m}$ . (E) Analiza cytometryczna zmian potencjału błony mitochondrialnej ( $\Psi\text{m}$ ). Histogramy intensywności fluorescencji są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów, podczas gdy wykresy słupkowe przedstawiają średnią intensywność fluorescencji  $\pm$  SD. CCCP był użyty jako kontrola pozytywna do zmniejszenia  $\Psi\text{m}$ . (F) Komórkowy poziom ATP w komórkach HepG2 traktowanych RK. Spadek ATP oceniano po 6 h inkubacji ze związkami oraz wyznaczono spadek ATP pochodzący z oddychania mitochondrialnego oraz glikolizy. Istotność statystyczna dla powyższych eksperymentów została oznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### **4.1.3. KMP - pierwszy metabolit pośredni w szlaku rezerwowym**

Aby porównać toksyczność KMP (5'- monofosforan rybozydu kinetyny) z toksycznością RK, ponownie zastosowano system xCELLigence, który umożliwił analizę proliferacji komórek HepG2. Żywotność komórek HepG2 poddanych działaniu obu związków, których końcowe stężenie wynosiło 80  $\mu\text{M}$ , monitorowano przez 96 h, a urządzenie dokonywało i rejestrowało pomiar w interwałach czasowych co 30 min (**Rys. 3A**). Kinytyka pomiarów żywotności komórek dostarczyła informacji o toksyczności badanych związków, a także wskazała na czasy, w których związki były najbardziej aktywne.

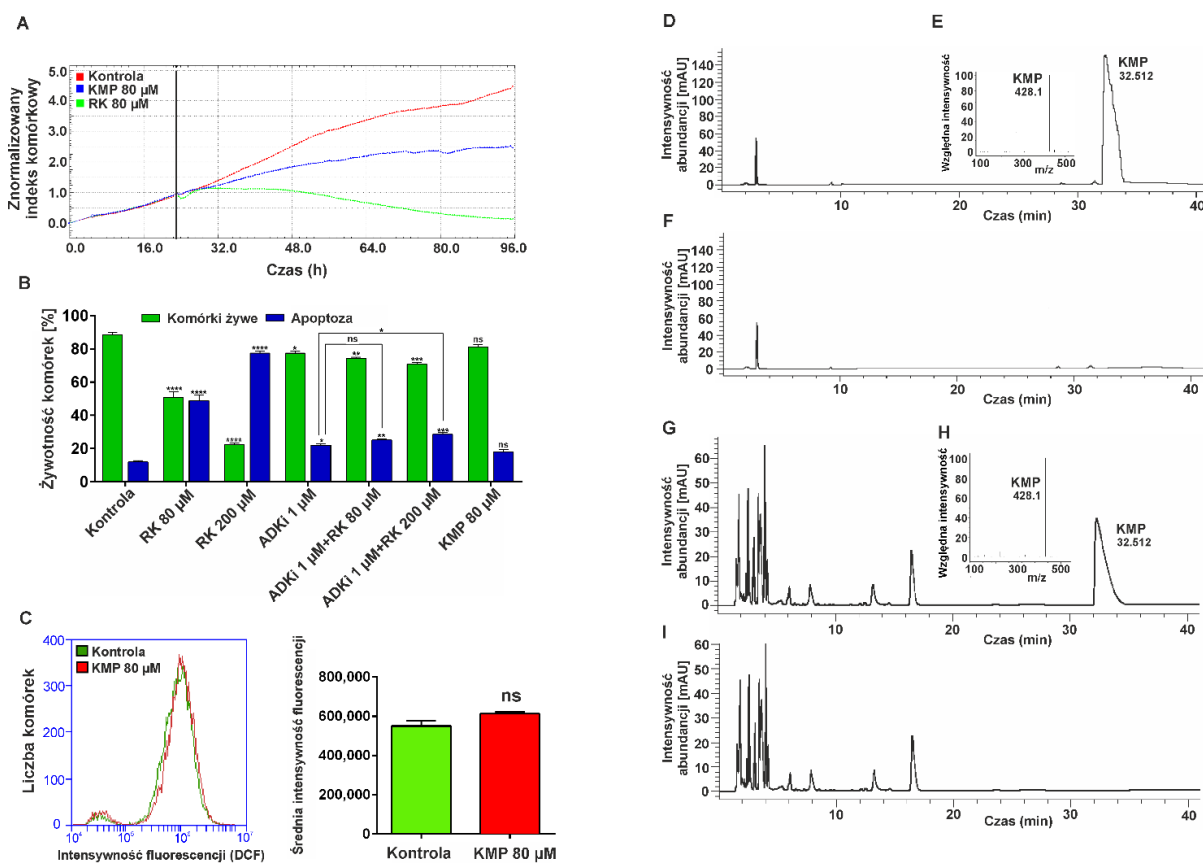
Po 24 h traktowania komórek HepG2 rybozydem kinetyny, zaobserwowano znaczący spadek (około 50%) indeksu komórkowego, podczas gdy KMP jedynie spowalniał proliferację komórek i utrzymywał ją na stałym, ale niższym poziomie w porównaniu z komórkami kontrolnymi (**Rys. 3A**). Wynik ten wskazuje, że komórki HepG2 są wrażliwe na oba związki, ale szybkość odpowiedzi na nie jest różna.

Traktowanie rybozydem kinetyny wiązało się ze śmiercią komórek na drodze apoptozy/nekrozy, w przeciwieństwie do działania KMP zarówno w stężeniu 40, jak i 80  $\mu\text{M}$ , przy których liczba komórek apoptotycznych pozostawała na poziomie kontrolnym (**Rys. 3B**). Efekt działania RK był większy niż KMP.

Przemiana pochodnych adenozyiny na drodze fosforylacji wydaje się być najczęstszym wewnątrzkomórkowym mechanizmem transformacji rybozydów. Pierwszym etapem szlaku rezerwowego puryn jest fosforylacja przez kinazę adenozyiny (ADK), która prowadzi do wytworzenia metabolitu monofosforanowego. Za pomocą powyższego eksperymentu wykazano, że RK jest substratem dla ADK i że jego fosforylacja jest kluczowym krokiem warunkującym jego toksyczność i potencjał proapoptotyczny (**Rys. 1 i 2**).

Przeanalizowano także indukcję apoptozy/nekrozy w obecności RK, KMP i 5-jodotuberycydiny (ADKi), która jest specyficznym inhibitorem ADK. Zaobserwowano, że ADKi zahamował indukcję śmierci komórkowej na drodze apoptozy w komórkach HepG2, gdy komórki poddano działaniu 1  $\mu\text{M}$  inhibitora na 1 h przed inkubacją z RK (40, 80  $\mu\text{M}$ ) (**Rys. 3B**). Dodatkowo, niską toksycznością komórkową KMP potwierdzono analizując jego bezpośredni wpływ (80  $\mu\text{M}$ ) na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2 (**Rys. 3C**). Eksperyment wykazał, że KMP nie przyczynił się do wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowych RFT, gdyż nie zaobserwowano zmiany intensywności fluorescencji (**Rys. 3C**).

Przeprowadzone badania dowiodły, że KMP jest w stanie przeniknąć przez błonę komórkową. Analiza HPLC-DAD-ESI/MS wykazała, że KMP pozostaje ufosforylowany w pożywce hodowlanej (**Rys. 3D-F**), a obecność grupy fosforanowej nie zakłóca przenikania KMP przez błonę (**Rys. 3G-J**). KMP, w porównaniu do jego prekursora- RK, nie jest toksyczny. Ponadto wykazano, że monofosforany nukleozydów są często angażowane przez komórki, na przykład jako aktywator PINK1 (ang. PTEN-induced kinase 1) i są szybko fosforylowane do nukleozydów dwu- i trójfosforanowych [218].

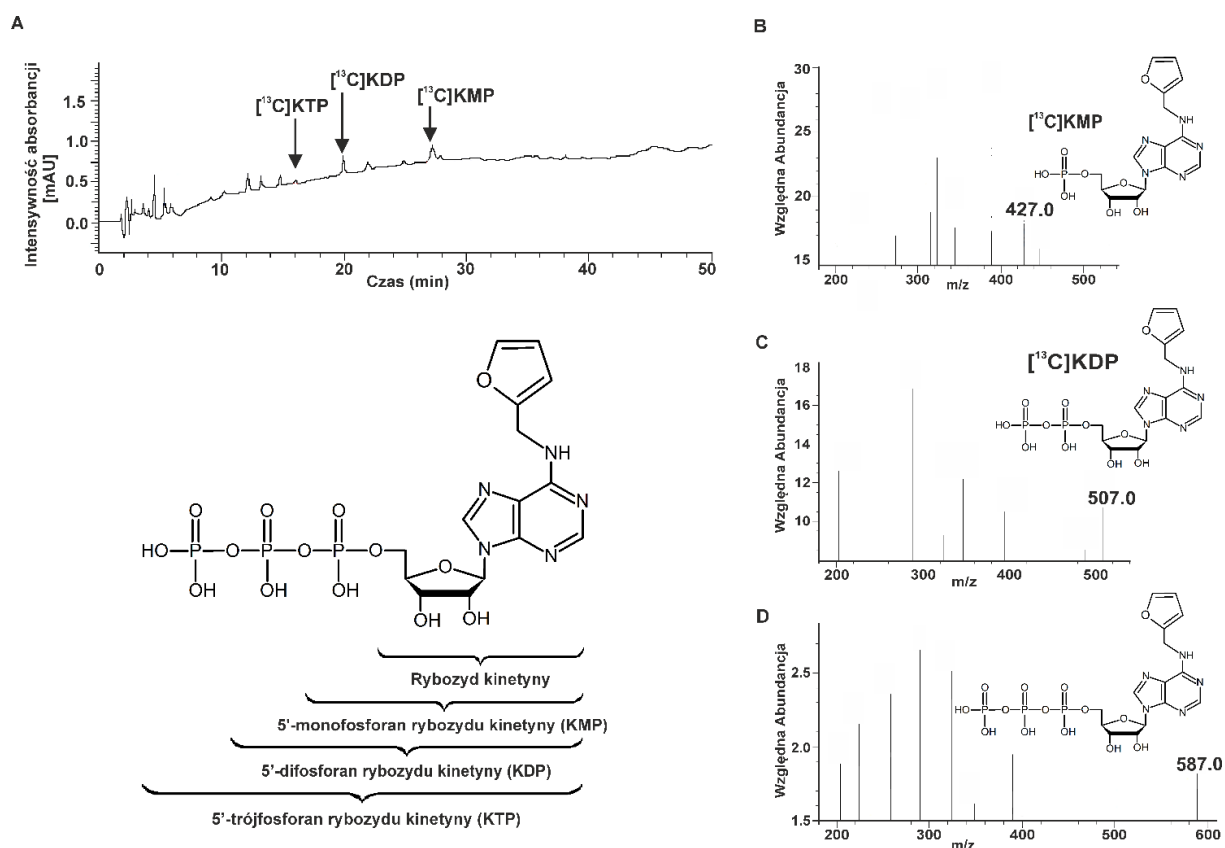


**Rysunek 3: Właściwości 5'-monofosforanu rybozydu kinetyny w komórkach HepG2.** (A) Analiza proliferacji w czasie rzeczywistym (przez 72 h), komórek po traktowaniu KMP, przy użyciu systemu xCELLigence. Proliferacja była monitorowana w odstępach 30 min. (B) Analiza cytometrii przepływowej (podwójne barwienie Casp 3/7-FITC/7-AAD) apoptozy/nekrozy w komórkach HepG2 po 24 h inkubacji z RK lub KMP i w obecności 1 μM 5-jodotubercydyny (inhibitor AdK). Dane przedstawione są jako średnie ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. (C) Poziom wewnątrzkomórkowych RFT indukowanych przez RK w komórkach HepG2 był mierzony za pomocą cytometrii przepływowej przy użyciu podwójnego barwienia H<sub>2</sub>DCFDA/PI. Histogramy intensywności fluorescencji przedstawiają reprezentatywne analizy, a wykresy słupkowe pokazują dane z trzech niezależnych eksperymentów wyrażone jako średnia ± SD. Istotność statystyczna zaznaczona gwiazdkami: (ns) p>0,05, (\*) p<0,05, (\*\*) p<0,01, (\*\*\*) p<0,001. (D-I) Analiza HPLC-DAD-ESI/MS (tryb pozytywny [M+H]<sup>+</sup>) stabilności KMP w podłożu hodowlanym (EMEM) po 24 h (D,E). Nietraktowana związkami pożywka EMEM została użyta jako kontrola (F). Analiza HPLC-DAD-ESI/MS transportu KMP do komórek HepG2 po 24 h inkubacji (G,H). Kontrola negatywna: komórki nietraktowane (I).

#### 4.1.4. Szlak rezerwowy- biosynteza mono-, di- i trójfosforanów RK

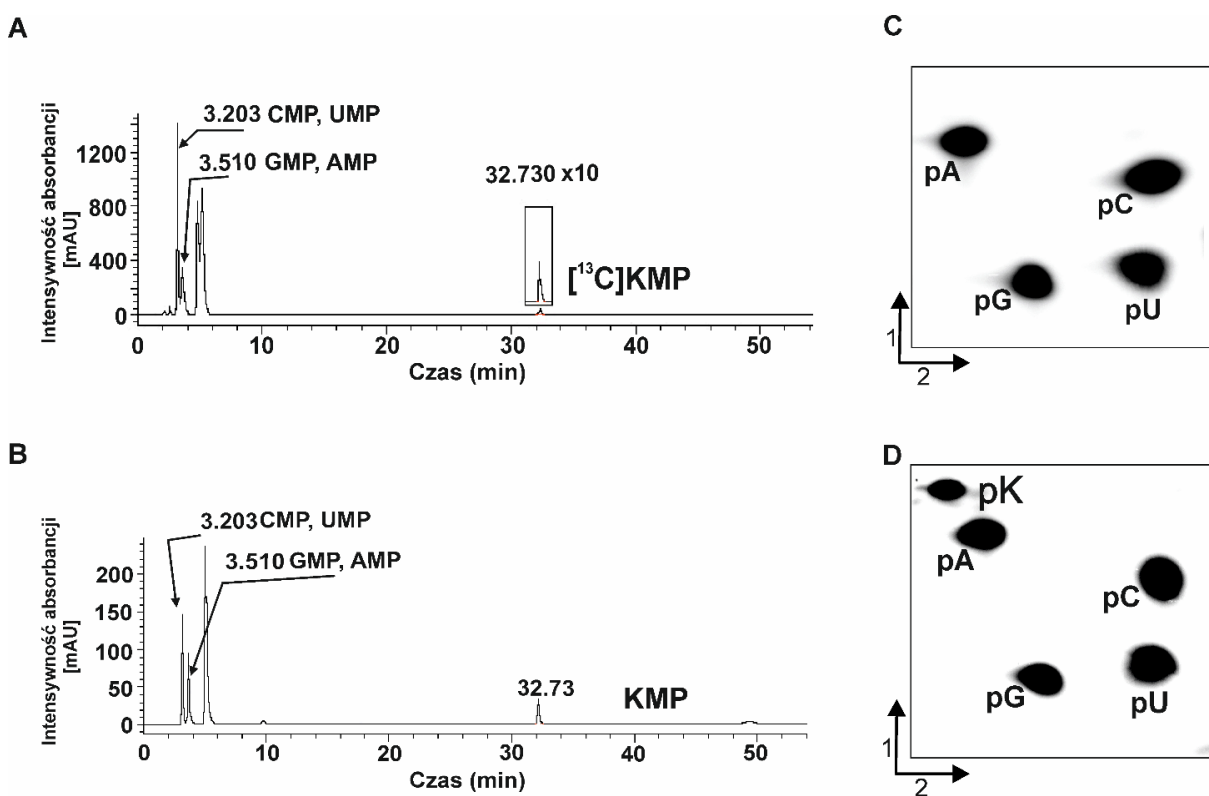
Szlak rezerwowy jest jednym ze źródeł nukleotydów niezbędnych do syntezy DNA i RNA oraz kofaktorów enzymatycznych z metabolitów pośrednich. Jest on odpowiedzialny za utrzymanie puli nukleotydów purynowych w warunkach fizjologicznych [97].

Zastosowane podejście eksperymentalne pozwoliło na wykrycie w komórkach HepG2, 5'-mono- (KMP), di- (KDP) i trójfosforanów (KTP) rybozydu kinetyny, powstałych w wyniku reakcji enzymatycznych katalizowanych przez kolejne kinazy- mono- i difosforanów nukleozydów (**Rys. 1**). Po 24 h inkubacji ze znakowanym [ $^{13}\text{C}$ ]RK, przygotowywano ekstrakt komórkowy, w celu pozyskania puli dNTP/NTP. Stabilny izotop [ $^{13}\text{C}$ ]RK wykorzystano do śledzenia jego metabolitów pośrednich w powstałym ekstrakcie komórkowym HepG2, za pomocą analizy HPLC-DAD-ESI/MS (**Rys. 4**). KTP, którego obecność w ekstrakcie komórek HepG2 została potwierdzona (**Rys. 4A i D**), może służyć jako substrat dla polimerazy RNA II.



**Rysunek 4: Wykrywanie metabolitów enzymatycznych [ $^{13}\text{C}$ ]KR w komórkach HepG2 metodą HPLC-DAD-ESI/MS. (A)** Chromatogram HPLC-DAD obecności [ $^{13}\text{C}$ ]KTP, [ $^{13}\text{C}$ ]KDP i [ $^{13}\text{C}$ ]KMP w komórkach HepG2 po traktowaniu ( $^{13}\text{C}$ )KR (szybkość przepływu 400  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). **(B-D)** Widma HPLC-ESI/MS (tryb ujemny [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^-$ ) mono- **(B)**, di- **(C)** i trójfosforanów **(D)** pochodzących z komórek HepG2 traktowanych wyznakowanym [ $^{13}\text{C}$ ]RK.

Aby to potwierdzić, przeprowadzono transkrypcję *in vitro* z użyciem matrycowego DNA o długości 168 nt oraz KTP przy jednoczesnej redukcji puli ATP. Obecność KMP w transkrybowanym RNA potwierdzono za pomocą analizy HPLC-DAD-ESI/MS (**Rys. 5A i materiały uzupełniające S1A**) oraz dwuwymiarowej analizy chromatograficznej- TLC, pozwalającej na ocenę zawartości nukleotydów (**Rys. 5A-C**). Zaobserwowano, że względna ilość AMP w transkrybowanym RNA w obecności KTP, była zmniejszona o około 50% w porównaniu do RNA kontrolnego (**materiały uzupełniające S2**). Wynik ten pozwolił na zbadanie czy [<sup>13</sup>C]KMP jest obecny w całkowitym RNA z komórek HepG2 w wyniku traktowania [<sup>13</sup>C]RK (**Rys. 5D i materiały uzupełniające S1B**).



**Rysunek 5: Identyfikacja KMP w całkowitym RNA i transkrybowanym *in vitro*.** (A) Chromatogram HPLC-DAD enzymatycznie hydrolizowanego RNA transkrybowanego w obecności KTP przy przepływie 300  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

(B, C) Analiza dwuwymiarowej chromatografii cienkowarstwowej (TLC) znakowanych [5'-<sup>32</sup>P]rybonukleotydów otrzymanych w wyniku hydrolizy enzymatycznej 168 nt RNA: kontrolnego RNA (B) i transkrybowanego w obecności KTP (C). Legenda: pA – [5'-<sup>32</sup>P]AMP, pG – [5'-<sup>32</sup>P]GMP, pU – [5'-<sup>32</sup>P]UMP, pC – [5'-<sup>32</sup>P]CMP, pK – [5'-<sup>32</sup>P]KMP. Strzałki wskazują 1. i 2. kierunek rozdziału chromatograficznego. (D)

Chromatogram HPLC-DAD enzymatycznie zhydrolizowanego całkowitego RNA z komórek HepG2 po traktowaniu [<sup>13</sup>C]KMP.

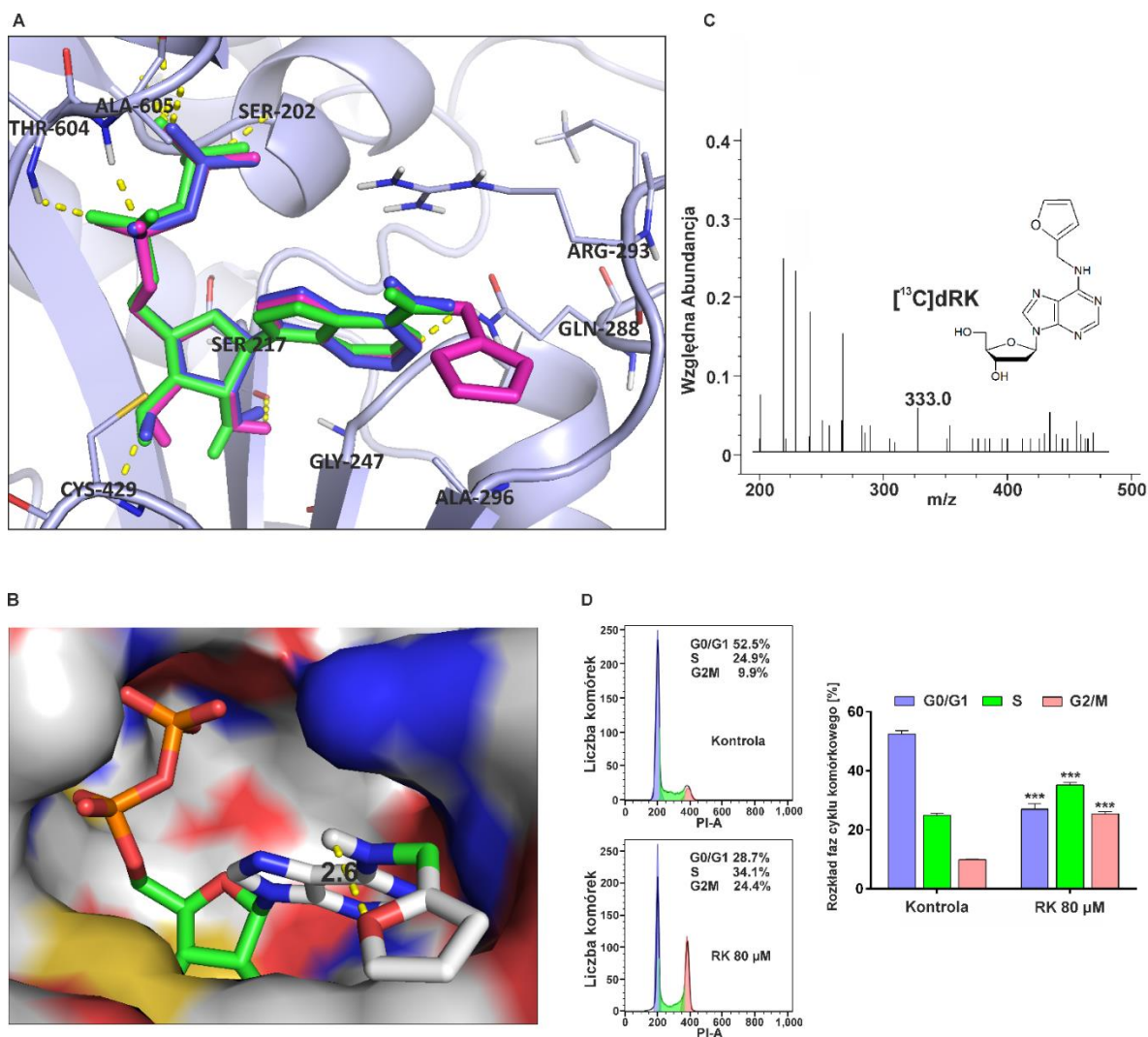


#### 4.1.5. Synteza DNA

Obecność KDP (5'- difosforan rybozydu kinetyny) w komórkach wskazuje, że kinaza monofosforanu nukleozydów (NMP) fosforyluje KMP. Jest to kluczowy etap, ponieważ KDP stanowi substrat dla kinazy difosforanów nukleozydów (NDPK), która przekształca go z kolei do KTP, co może mieć miejsce podczas syntezy RNA (**Rys. 1 i 5**). KDP jest substratem dla reduktazy rybonukleotydu (RNR), która przekształca go w dKDP (5'-difosforan-2'-deoksyrybozydu kinetyny), który jest następnie przekształcany przez kinazę difosforanów nukleozydów do dKTP, który może służyć jako substrat do syntezy DNA (**Rys. 1 i 6**). Za pomocą HPLC-ESI/MS potwierdzono obecność 5'-monofosforanu-[1'-<sup>13</sup>C]-2'-dezoksyrybozydu kinetyny ([<sup>13</sup>C]dKMP) w DNA wyizolowanym z komórek HepG2 (**Rys. 6C**). Tworzenie deoksyrybonukleotydu z rybonukleotydu jest niezbędnym i kluczowym krokiem do syntezy DNA w szlaku rezerwowym, dlatego przeanalizowano udział RK w tym procesie i przemianę 5'-difosforanu rybozydu kinetyny w 5'-difosforanu-2'-deoksyrybozydu kinetyny. KDP, imitując ADP, może wiązać się z RNR i służyć jako jego substrat, co zostało potwierdzone przez dokowanie molekularne (**Rys. 6A i B**). Jako kontrolę dla dokowania liganda referencyjnego zastosowano ADP. Zarejestrowano pozycje dokowania KDP (kolor różowy) i ADP (kolor niebieski) oraz strukturę krystaliczną ADP z kompleksu 3S87 (kolor zielony) (**Rys. 6A**). Wszystkie te trzy struktury nakładały się na siebie prawidłowo, przy czym porównując struktury po dokowaniu ze strukturą liganda referencyjnego, zaobserwowano niewielkie przesunięcie pozycji grupy fosforanowej oraz niewielką rotację pierścienia adeninowego. RMSEM (średnia miara odległości między atomami nałożonych białek, ang. Root-mean-square deviation of atomic positions) ciężkiego atomu pomiędzy krystaliczną i zadokowaną strukturą ADP wynosił 0,891, a dla zadokowanych pozycji KDP i ADP był jeszcze mniejszy i wynosił 0,818, gdyż pokrywały się one we wspólnym regionie ich struktur, z wyjątkiem bardzo niewielkiego przesunięcia pozycji pierścienia adeninowego. W zadokowanej pozycji KDP, pozycja kluczowego dla aktywności katalitycznej pierścienia rybozy została bardzo dobrze zachowana i zachowane zostały też wszystkie ważne oddziaływania, w tym te, które zapewniają oddziaływanie z zasadą: wiązanie wodorowe pomiędzy atomem N<sup>1</sup> pierścienia adeninowego a Gln288 (odległość 2 Å) (**Rys. 6A**) oraz słabsze z Arg293 (odległość 4,1 Å, niewidoczna na **Rys. 6A**) [219]. Szacowana energia wiązania obliczona przez program AutoDock Vina wynosiła -9,7 dla KDP vs -9,0 dla liganda referencyjnego, można więc przypuszczać, że obecność grupy N<sup>6</sup>-furfurylowej w KDP nie upośledzała zdolności cząsteczki do przyjmowania właściwej konformacji ani jej akomodacji

w centrum wiązania. Możliwe jest, że dodatkowa grupa furfuryłowa KDP może wypierać cząsteczki wody obecne w strukturze RNR (HOH937 w pliku PDB o numerze 3S87). Woda znajdująca się w pobliżu C6 liganda referencyjnego (ADP) tworzy wiązanie wodorowe z grupą aminową ADP. Zadokowana pozycja grupy furfuryłowej sugeruje, że KDP może odtwarzać to wiązanie wodorowe poprzez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływanie pomiędzy tlenem pierścienia furanowego a wodorem grupy aminowej w pozycji 6 (**Rys. 6A**).

Wyniki te wskazują, że dKDP jest substratem do dalszych przemian przez kinazę difosforanów nukleozydów, co prowadzi do syntezy dKTP i jego wbudowania do DNA (**Rys. 6C**). Powoduje to także zmiany w dystrybucji cyklu komórkowego HepG2 po inkubacji z RK (80  $\mu\text{M}$ , 24 h). Zaobserwowano, że RK znacząco zwiększył akumulację komórek w fazach G2/M i ponadto, odnotowano także wzrost liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego (**Rys. 6D**).



**Rysunek 6: Obecność pochodnej RK w DNA. (A)** Rola reduktazy rybonukleotydujowej w metabolizmie RK na podstawie dokowania KDP do centrum katalitycznego. Zestawienie zadokowanych pozycji KDP (różowy), ADP

(niebieski) i struktury krystalicznej ADP z kompleksu 3S87 (zielony) w miejscu wiązania modelowanej struktury ludzkiego RNR, przedstawionej za pomocą wstążek. Wiązania wodorowe pomiędzy KDP i RNR przedstawione są jako żółte przerywane linie. **(B)** Dokowanie KDP do modelu ludzkiego RNR w konformacji wiążącej dGTP i ADP. Reprezentacja powierzchni molekularnej białka potwierdza, że istnieje miejsce na umieszczenie KDP w centrum wiążącym. Możliwe wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe pomiędzy tlenem pierścienia furanowego (czerwony) i wodorem (szary) grupy aminowej w pozycji 6 w KDP o odległości 2,6 Å, pokazane są jako żółte przerywane linie. **(C)** Wykrywanie [<sup>13</sup>C]dRK w hydrolizacie DNA z komórek HepG2 po potraktowaniu [<sup>13</sup>C]RK metodą HPLC-ESI/MS (tryb pozytywny [M+H]<sup>+</sup>). **(D)** Wpływ RK na rozkład faz cyklu komórkowego w komórkach HepG2. Komórki poddawano działaniu 80 μM RK przez 24 h, a następnie badano za pomocą cytometrii przepływowej. Zawartość DNA była mierzona przez barwienie jodkiem propidyny (PI-A), a liczba komórek w każdej fazie została oszacowana. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna zaznaczona gwiazdkami: (\*\*\*) p<0,001.

#### 4.1.6. Wzajemne oddziaływanie szlaków metabolizmu puryn

Szlak *de novo* jest głównym szlakiem odpowiedzialnym za syntezę nukleotydów purynowych z amfibolicznych związków pośrednich, które uczestniczą w większości szlaków przemian puryn. W wyniku enzymatycznej transformacji [<sup>13</sup>C]RK, za pomocą HPLC-DAD-ESI/MS zidentyfikowano kilka ważnych pochodnych w tym IMP, PRPP i R5P, jak również AMP, I, A i KMP (pełne nazwy związków znajdują się w *Wykazie skrótów*), które posiadały znaczniki <sup>13</sup>C. Ponadto, wykazano obecność kinetyny- produktu wewnątrzkomórkowej konwersji [<sup>13</sup>C]RK katalizowanej przez fosforylaze nukleozydów purynowych (PNP) (**Rys. 7A i materiały uzupełniające S3**). Aby udowodnić, że wykryte metabolity są bezpośrednimi pochodnymi RK (**Rys. 1**), wytypowano kinazę adenozy (ADK), fosforylaze nukleozydów purynowych (PNP) i deaminazę adenozy (ADA), spośród enzymów odpowiedzialnych za regulację syntezy puryn i zahamowano ich aktywność katalityczną, używając w tym celu specyficznych inhibitorów: odpowiednio 5-jodotubercydynę, forodezynę i erytro-9-(2-hydroksy-3-nonylo)-adeninę (EHNA). Analiza HPLC-DAD-ESI/MS wykazała, że inhibicja każdego z enzymów skutkowała brakiem metabolitów znakowanych <sup>13</sup>C, specyficznych dla każdej z reakcji enzymatycznych (**Rys. 7B-D**). Obecność 5-jodotubercydyny powodowała brak [<sup>13</sup>C]KMP, związanego ze szlakiem rezerwowym puryn (**Rys. 7B**). Forodezyna powodowała brak kinetyny oraz [<sup>13</sup>C]R5P i [<sup>13</sup>C]PRPP, które reprezentują szlaki *de novo* i kataboliczny (**Rys. 7C**). EHNA spowodowała brak <sup>13</sup>C-inozyny i <sup>13</sup>C-monofosforanu inozyny, które są związane również ze szlakiem *de novo* biosyntezy puryn (**Rys. 7D**).

Wiedząc, że nie istnieje jedno źródło inozyny dla transformacji RK (5'-nukleotydaza purynowa i deaminaza adenozy), zastosowano także inną metodę wykrywania jej puli

wewnątrzkomórkowej. Za pomocą mikroskopii konfokalnej, przeprowadzono analizę immunofluorescencyjną komórek HepG2 traktowanych 80 lub 200  $\mu\text{M}$  RK lub 300  $\mu\text{M}$  adenozyną (Ado) przez 24 h, wykorzystując w tym celu specyficzne przeciwciała anty-inozynowe. Otrzymane wyniki wskazały, że obecność RK spowodowała znaczący wzrost całkowitego wewnątrzkomórkowego poziomu inozyny, który był wyższy niż w przypadku zastosowania adenozyiny (**Rys. 7E**). Używając HPLC-ESI/MS, wykryto zarówno inozynę, jak i  $^{13}\text{C}$ -inozynę w komórkach HepG2 traktowanych [ $^{13}\text{C}$ ]RK, których nie można było rozróżnić za pomocą analizy immunofluorescencyjnej (**Rys. 7F**).

Pirofosforan fosforybozylu (PRPP) jest ważnym metabolitem pośrednim metabolizmu komórkowego. Bierze udział w przemianach, w ramach szlaku *de novo*, rozpoczynając syntezę nukleotydów purynowych i prowadząc do powstania pierwszego w pełni ukształtowanego nukleotydu, 5'-monofosforanu inozyny (IMP). PRPP jest również pierwszym intermedyatem szlaku katabolicznego, w którym reakcje prowadzą do rozpadu cząsteczek na mniejsze [220].

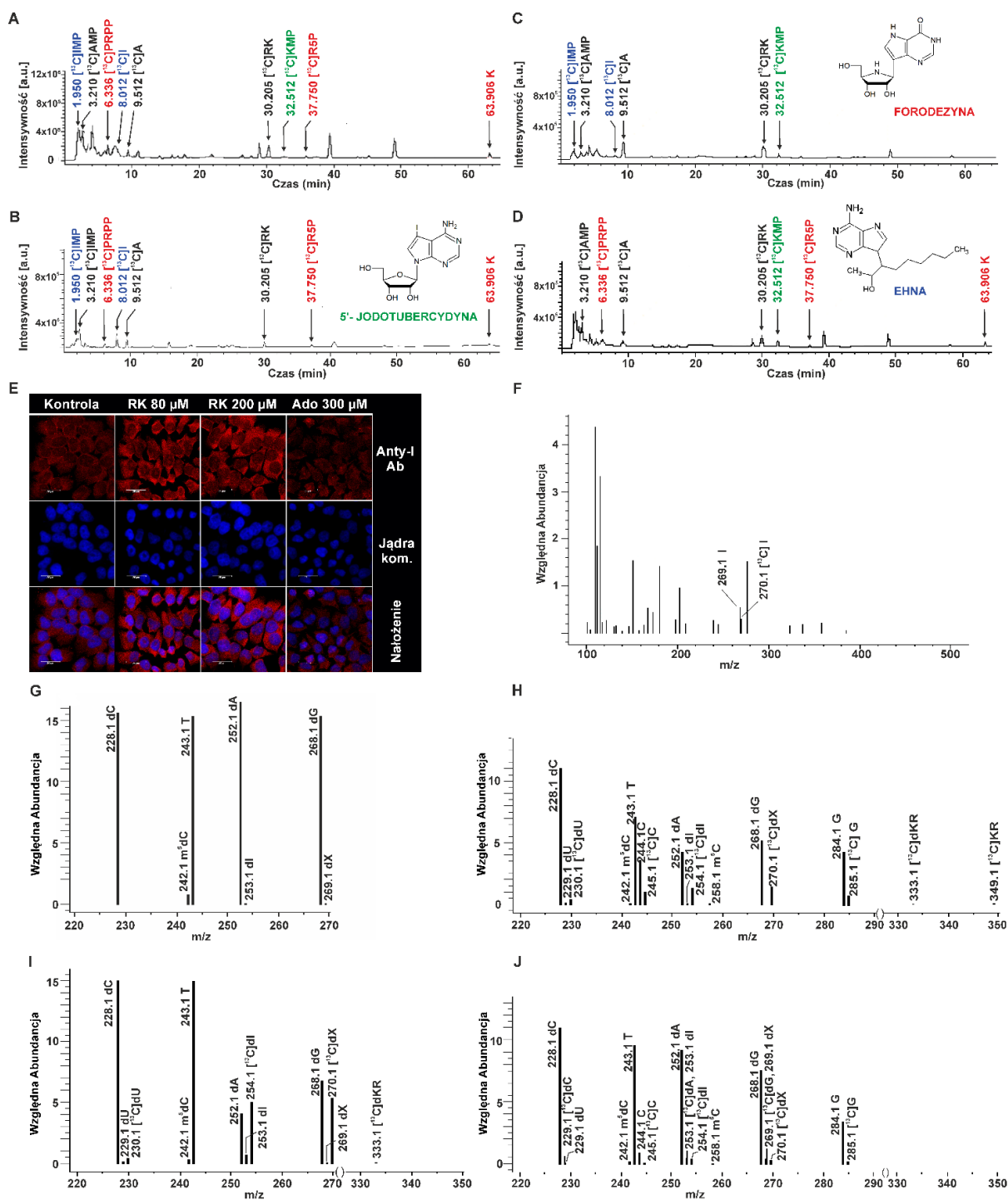
Wykazano, że [ $^{13}\text{C}$ ]PRPP jest generowany w komórkach przez syntazę PRPP, w konsekwencji traktowania [ $^{13}\text{C}$ ]RK. Substratem dla enzymu jest [1- $^{13}\text{C}$ ]-rybozo-5-fosforan ([ $^{13}\text{C}$ ]R5P), który powstaje w szlaku *de novo* poprzez reakcję z fosforylazą nukleozydów purynowych, gdzie dodatkowym produktem jest kinetyna (**Rys. 1 i materiały uzupełniające S4**). Obecność [ $^{13}\text{C}$ ]PRPP i [ $^{13}\text{C}$ ]R5P wskazuje, że RK został "zdegradowany" do pierwszych metabolitów zaangażowanych w szlak *de novo* (nukleotydy purynowe i pirymidynowe) i kataboliczny. Dowodów na aktywację szlaku katabolicznego przez RK dostarczyła obecność ksantyny, hipoksantyny i kwasu moczowego, które występowały stosunkowo licznie, odpowiednio  $\sim 1,26$ ,  $\sim 3,39$  i  $\sim 1,95$  razy częściej, w komórkach poddanych działaniu [ $^{13}\text{C}$ ]RK w porównaniu do kontrolnych (**materiały uzupełniające S5**).

Metabolity [ $^{13}\text{C}$ ]IMP, [ $^{13}\text{C}$ ]AMP i [ $^{13}\text{C}$ ]KMP są monofosforanami nukleozydów, które są charakterystyczne dla szlaku rezerwowego i mogą być dalej przekształcane do di- i trójnukleotydów. Dlatego też przeanalizowano, czy  $^{13}\text{C}$ -ryboza może być włączana podczas syntezy nukleotydów. W wyniku analizy HPLC-DAD-ESI/MS zidentyfikowano następujące nukleotydy purynowe i pirymidynowe z rybozą znakowaną  $^{13}\text{C}$ : XMP, GMP, GDP, GTP, ADP, ATP, UMP, CMP i dTMP (**tabela uzupełniająca S2 i materiały uzupełniające S6 i S7**). Obecność  $^{13}\text{C}$ -adenozyiny,  $^{13}\text{C}$ -inozyny i kinetyny również świadczyła o aktywności deaminazy adenozyiny (**Rys. 7A, tabela uzupełniająca S2 i materiały uzupełniające S3**).

Obecność wielu różnych metabolitów w komórkach poddanych działaniu RK spowodowała zmniejszenie ilości naturalnych puryn, takich jak adenozyina i guanozyina.

Adenozyna jest czynnikiem wyzwalającym kaskadę sygnałową, która warunkuje szereg procesów komórkowych, w tym syntezę DNA [221]. Dlatego ponownie za pomocą metody HPLC-DAD-ESI/MS, przeanalizowano skład nukleotydowy w całkowitym DNA komórek HepG2 traktowanych [<sup>13</sup>C]RK (80 i 200 μM) i ADKi (1 μM), jednocześnie przez 24 h. Stwierdzono istotne zmiany w DNA, takie jak zróżnicowane pochodne nukleotydów purynowych i pirymidynowych: dI, dX, dU, m5dC, [<sup>13</sup>C]dU, [<sup>13</sup>C]C, [<sup>13</sup>C]dC, [<sup>13</sup>C]dI, [<sup>13</sup>C]dA, [<sup>13</sup>C]dG, [<sup>13</sup>C]G, [<sup>13</sup>C]dX, [<sup>13</sup>C]dRK oraz rybonukleotydów C, m5C, G, [<sup>13</sup>C]C, [<sup>13</sup>C]G, [<sup>13</sup>C]RK) (**Rys. 7G-J i tabela uzupełniająca S3**).

Ponadto przeanalizowano zmiany w poziomie ekspresji genów kilku enzymów zaangażowanych we wszystkie szlaki purynowe w obecności RK. Ponieważ RK jest analogiem adenozyny (Ado), stanowiła ona kontrolę pozytywną dla tych reakcji. Wykazano, że RK aktywował deaminazę adenozyny (ADA), fosforylazę nukleozydów purynowych (PNP), deaminazę monofosforanu adenozyny 2 (AMPD2) i reduktazę rybonukleotydów (RRM1) na poziomie zbliżonym do poziomu Ado i aktywował ADK na poziomie wyższym niż Ado. Kinaza adenylanowa 1 (AK1) i kinaza adenylanowa 9 (AK9) nie były aktywowane przez RK (**materiały uzupełniające S8**).



**Rysunek 7: Identyfikacja wybranych enzymatycznych metabolitów  $[^{13}\text{C}]$ RK w komórkach HepG2. (A-D)**

Chromatogramy HPLC-ESI/MS ekstraktów z komórek HepG2 po traktowaniu  $[^{13}\text{C}]$ RK (80  $\mu\text{M}$ ) (A), w obecności 5-jodotubercydyny (B), forodezyny (C) i EHNA (D). Analizowane metabolity pochodzą ze szlaków: *de novo* (PRPP), katabolicznego (IMP, AMP, R5P, inozyna, adenyne i kinetyna) i rezerwowego (KMP) puryn ((j.u.) - jednostki arbitralne). Nazwy specyficznych inhibitorów i związanych z nimi metabolitów zaznaczono na wykresach tym samym kolorem. (E) Immunofluorescencyjna analiza wpływu RK na poziom inozyny w komórkach HepG2. Czerwony kolor reprezentuje sygnał pochodzący od wewnątrzkomórkowej inozyny (lewy panel) w komórkach HepG2 po traktowaniu RK (80 i 200  $\mu\text{M}$ ) lub adenyne (300  $\mu\text{M}$ ). Komórki kontrolne były hodowane w samym medium. Na niebiesko zaznaczono wybarwione jądra (środkowy panel), a połączone

obrazy przedstawiono w prawym panelu; skala: 25  $\mu\text{m}$ . **(F)** Widma HPLC-ESI/MS (tryb pozytywny  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) inozyny i  $^{13}\text{C}$ -inozyny w komórkach HepG2 poddanych działaniu  $^{13}\text{C}$ RK. Wszystkie eksperymenty wykonano dwu- lub trzykrotnie i były powtarzalne. **(G-J)** Widma HPLC-ESI/MS (tryb pozytywny  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) uzyskane z całkowitego DNA nietraktowanych komórek HepG2 **(G)**, po traktowaniu 80  $\mu\text{M}$  **(H)** lub 200  $\mu\text{M}$  **(I)**  $^{13}\text{C}$ RK, oraz w obecności zarówno 200  $\mu\text{M}$   $^{13}\text{C}$ RK jak i 1  $\mu\text{M}$  5-jodotubercydyny **(J)**.

#### 4.1.7. Asocjacja purynosomu

Pirofosforan fosforybozylu (PRPP) jest pierwszym substratem wchodzącym w szlak *de novo* i jak wykazano wcześniej, jest także produktem przemian metabolicznych RK w komórkach.

Purynosom stanowi przejściowy kompleks multienzymatyczny powstający podczas aktywacji szlaku biosyntezy puryn *de novo* w komórkach ludzkich [100, 222]. Jego aktywacja jest inicjowana w celu ochrony niestabilnych metabolitów i zwiększenia przepływu metabolicznego przez szlaki biosyntezy puryn. W warunkach wysokiego zapotrzebowania na puryny, enzymy szlaku *de novo*, skupiają się w pobliżu mitochondriów i mikrotubul, tworząc dynamiczne kompleksy multienzymatyczne określane mianem "purynosomów" [100]. W związku z tym założono, że RK może także wyzwać aktywację purynosomu **(Rys. 8)**.

Dotychczasowa analiza purynosomu obejmowała jedynie badanie sposobu działania poszczególnych enzymów tworzących kompleks. Zastanawiające było, czy specyficzne warunki środowiskowe, takie jak pojawienie się egzogenego analogu puryny-RK, wpłynę na te mechanizmy. Dlatego zaproponowano nowe, kompleksowe podejście do badań nad powstawaniem purynosomu, obejmujące nie tylko zastosowanie specyficznego związku, ale także po raz pierwszy dodatkową metodę analityczną, jaką jest cytometria przepływowa **(Rys. 8A i B)**.

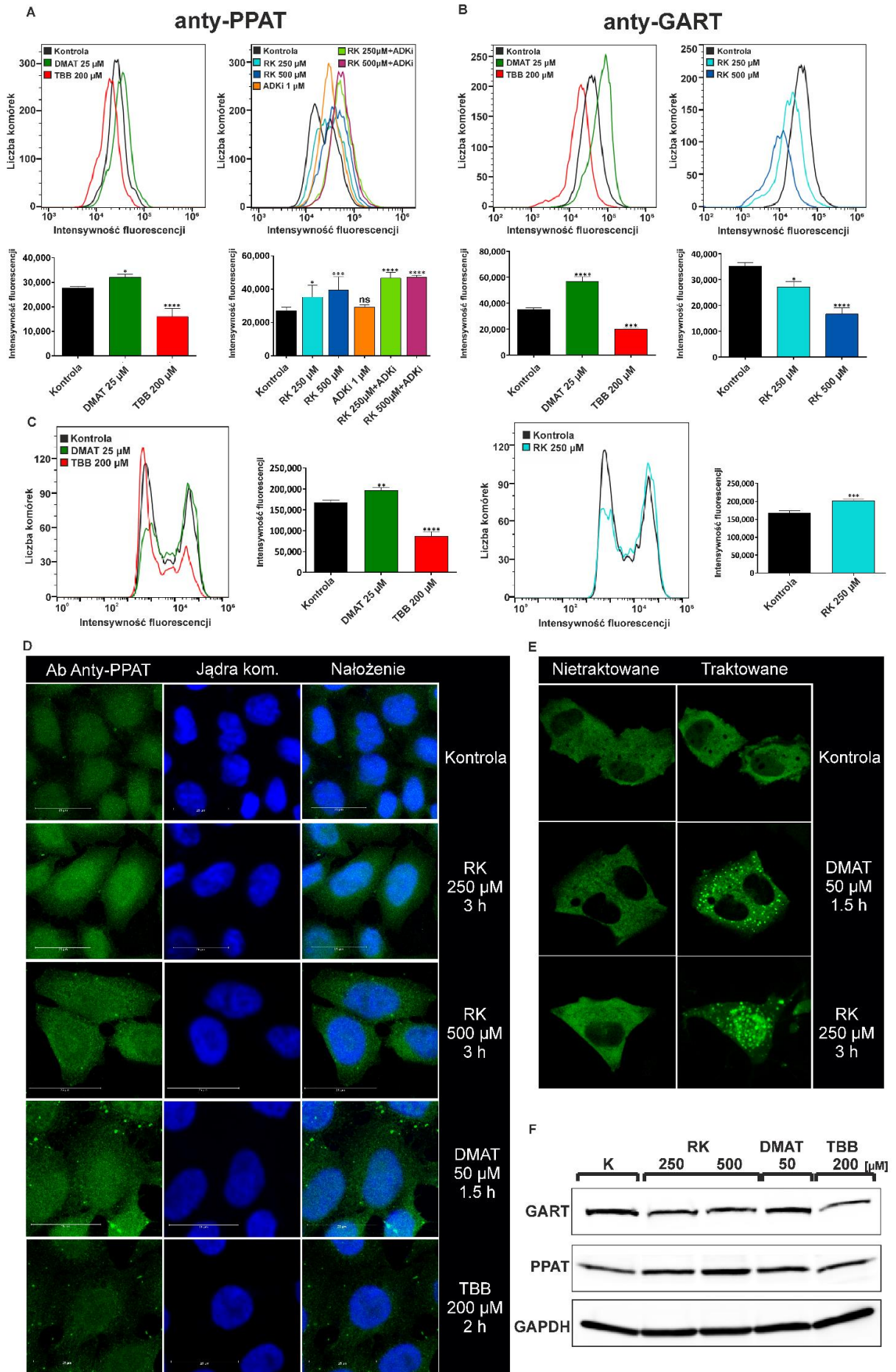
W tym celu przeanalizowano aktywację trzech enzymów tworzących rdzeń purynosomu w komórkach ssaków: amidotransferazy PRPP (PPAT), trójfunkcyjnego białka biosyntezy puryn (GART) **(Rys. 8)** oraz syntazy fosforybozyloformyloglicynoamidyn (FGAMS) **(Rys. 8D)**. W przeciwieństwie do poprzednich podejść eksperymentalnych [100, 222], wykorzystujących głównie mikroskopię konfokalną, w niniejszej pracy doktorskiej pokazaną aktywację kluczowych dla purynosomu enzymów, tj. PPAT i GART, za pomocą specyficznych przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie i analizy cytometrii przepływowej. W przypadku enzymu FGAMS wykonano transfekcję hFGAMS-GFP, poprzedzającą analizę cytometryczną i wizualizację za pomocą mikroskopii konfokalnej **(Rys. 8C)**.

Po pierwsze, oceniono tworzenie purynosomu za pomocą przeciwciała anti-PPAT w komórkach traktowanych RK i obserwowano poprzez wzrost fluorescencji, wzrost poziomu tworzenia purynosomu w sposób zależny od stężenia. W obecności inhibitora ADK (ADKi), który zaburza metabolizm puryn, tworzenie purynosomu było inicjowane na niskim poziomie, podczas gdy jednoczesne traktowanie RK i ADKi powodowało znacznie większą indukcję jego tworzenia w porównaniu z RK lub ADKi użytych osobno (**Rys. 8A**). Następnie zbadano aktywację enzymu GART, ale zaobserwowano odwrotny efekt do powyższych (**Rys. 8B**). Analiza cytometrii przepływowej wykazała, że zwiększona intensywność fluorescencji w komórkach po transfekcji RK jest skorelowana z ekspresją EGFP i aktywacją enzymu FGAMS (**Rys. 8D**). Ponadto, w jego przypadku, zastosowano jedynie stężenie 250  $\mu$ M RK, ze względu, na to, że po transfekcji komórki były już mniej stabilne i bardziej wrażliwe na działanie dodatkowych czynników, takich jak podanie związku. Wyższe stężenie RK powodowało ich znacznie szybsze umieranie.

W celu określenia specyficzności przeciwciał zastosowano kontrole pozytywne - aktywator powstawania purynosomu - DMAT (2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol) oraz TBB (4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol), związek odpowiedzialny za dysocjację kompleksu.

Potwierdzono, że RK inicjuje powstawanie purynosomu za pomocą mikroskopii konfokalnej (**Rys. 8C, D**). Zwiększenie intensywności zielonej fluorescencji anti-PPAT, a w szczególności analiza formowania purynosomu w komórkach HepG2 transfekowanych FGAMS-GFP, bezpośrednio wskazuje, że RK jest aktywatorem tego procesu (**Rys. 8C, D**). Ponadto, wzrost poziomu ekspresji białek istotnych w procesie formowania purynosomu (PPAT, GART), co zostało potwierdzone analizą Western blot (**Rys. 8E**).



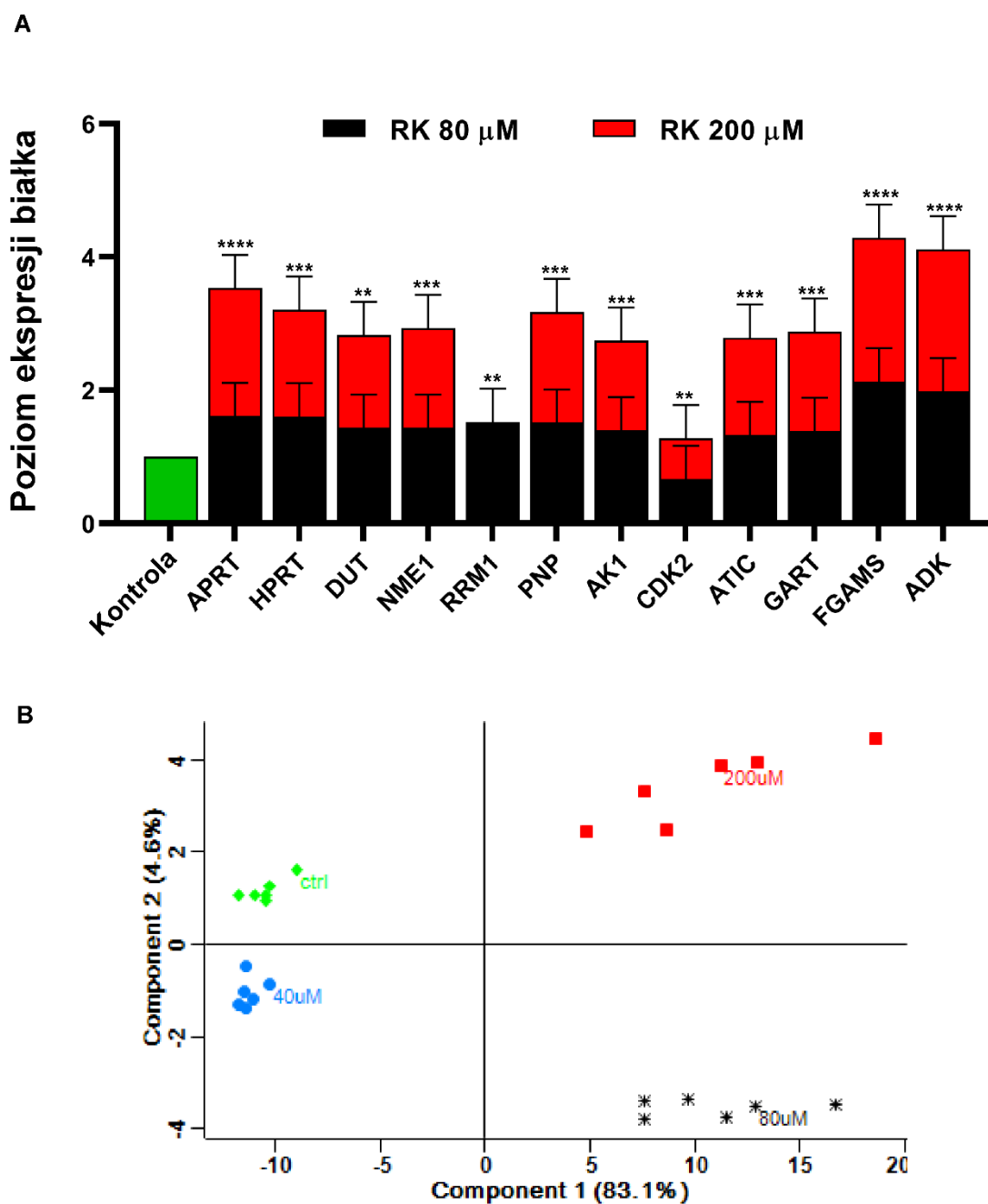


**Rysunek 8: Aktywacja purynosomów w komórkach HepG2 po indukcji RK.** (A, B) Analiza cytometryczna formowania purynosomu w komórkach HepG2 po dodaniu RK i w obecności ADKi. Komórki poddano działaniu 250 lub 500  $\mu\text{M}$  RK przez 3 h oraz 25  $\mu\text{M}$  DMAT lub 200  $\mu\text{M}$  TBB odpowiednio przez 1,5 h lub 2 h, które zastosowano jako aktywator i inhibitor purynosomu. ADKi (1  $\mu\text{M}$ ) dodawano 24 h przed inkubacją z RK. Mierzono sygnały fluorescencyjne anty-PPAT (A), anty-GART (B) i FGAMS (C), a ich intensywność pokazano na reprezentatywnych histogramach lub jako średnią  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. (D) Analiza immunofluorescencyjna poziomów PPAT w komórkach HepG2 poddanych działaniu 250 lub 500  $\mu\text{M}$  RK (3 h) i 50  $\mu\text{M}$  DMAT (1,5 h) (aktywator purynosomu) lub 200  $\mu\text{M}$  TTB (2 h) (inhibitor purynosomu). Komórki nietraktowane stanowiły kontrolę eksperymentu. Intensywność zielonego sygnału jest skorelowana z tworzeniem purynosomu (lewy panel). Kolor niebieski reprezentuje wybarwione jądra (środkowy panel), natomiast prawy panel przedstawia nakładanie się dwóch obrazów. Skala wynosi 25  $\mu\text{m}$ . (E) Analiza w mikroskopii konfokalnej żywych komórek tworzących purynosom w komórkach HepG2 po indukcji RK. Obrazy fluorescencyjne purynosomów w komórkach HepG2 transfekowanych FGAMS-GFP. Purynosomy w komórkach HepG2 są formowane po 3 h inkubacji z 250  $\mu\text{M}$  RK lub 1,5 h traktowania 50  $\mu\text{M}$  DMAT (kontrola pozytywna). (F) Analiza Western blot ekspresji białek PPAT i GART (długa izoforma) w komórkach HepG2 po 3 h traktowania KR (250 i 500  $\mu\text{M}$ ), DMAT (50  $\mu\text{M}$ ) lub TBB (200  $\mu\text{M}$ ). Jako białko referencyjne użyto GAPDH. Wszystkie dane są reprezentatywne dla 3 niezależnych eksperymentów.

Ostatni etap badań stanowiła porównawcza analiza proteomiczna i identyfikacja białek, których ekspresja ulega zmianie w komórkach HepG2 traktowanych 80 i 200  $\mu\text{M}$  RK, w odniesieniu do komórek nietraktowanych. W efekcie zidentyfikowano ponad 650 białek zaangażowanych w różne procesy komórkowe, ale mając na uwadze wyniki uzyskane powyżej, dokonano selekcji interesujących białek. Dlatego też w przypadku wpływu rybozydu kinetyny na metabolizm puryn, zdecydowano się wybrać białka bezpośrednio związane z tym procesem (**Rys. 9A**).

W efekcie zaobserwowano wzrost ekspresji białek związanych z formowaniem purynosomu, takich jak ATIC, GART oraz FGAMS; białek związanych z rezerwowym szlakiem puryn, tj. APRT, HPRT, PNP i kluczowego enzymu ADK, co potwierdziło wyniki uzyskane podczas analizy HPLC-MS, cytometrycznej oraz mikroskopowej. Ponadto widoczny jest spadek ekspresji białka związanego z kontrolą cyklu komórkowego CDK2, co stanowi odzwierciedlenie analizy zaburzonego pod wpływem RK cyklu. W każdym przypadku, obserwujemy wzrost ekspresji pod wpływem 200  $\mu\text{M}$  RK, jednakże wyjątek stanowi reduktaza rybonukleotydowa (RRM1), w przypadku, której nie uzyskano danych dotyczących zmiany poziomu ekspresji białka, pod wpływem wyższego stężenia związku (**Rys. 9A**). Ponadto, wykres przedstawiający wyniki analizy komponentów głównych (PCA) potwierdza, że pod wpływem dwóch najwyższych stężeń związku dochodzi do znaczących

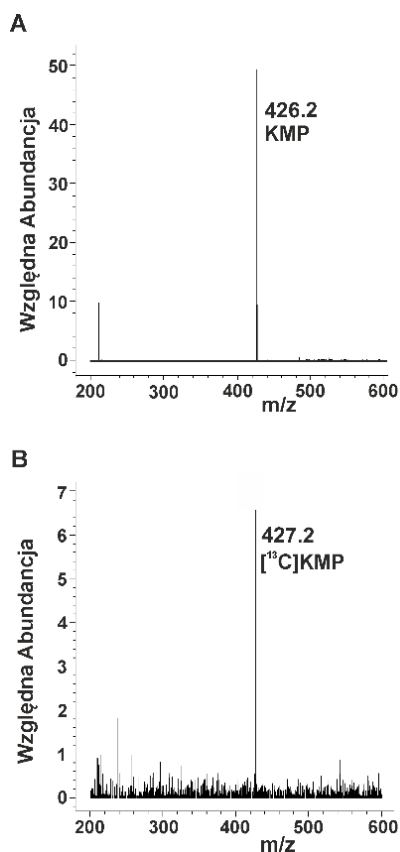
zmian ekspresji białek, a w przypadku stężenia 40  $\mu\text{M}$  zmiany są na poziomie kontroli (Rys. 9B).



**Rysunek 9: Porównawcza analiza proteomiczna ekspresji białek w komórkach HepG2 traktowanych RK.**

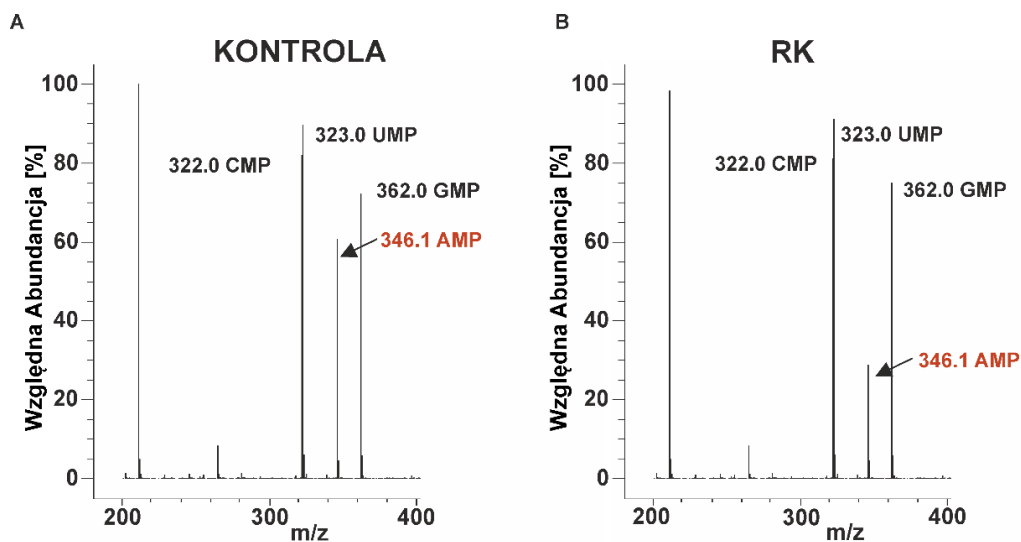
(A) Ekspresja wybranych białek związanych z metabolizmem puryn. Porównanie efektu dwóch różnych stężeń RK w odniesieniu do komórek nietraktowanych (B) Wykres wektorów odległości pierwszej głównej składowej względem drugiej głównej składowej otrzymany w PCA przeprowadzonej dla komórek nietraktowanych i inkubowanych stężeniami 40, 80 i 200  $\mu\text{M}$  RK. Dane przedstawiono  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczną oznaczono gwiazdkami: (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ . Gwiazdki odnoszą się jednocześnie do czerwonych i czarnych słupków.

*Materiały uzupełniające do części Udział rybozydu kinetyny w metabolizmie puryn*



Rysunek uzupełniający S1: Identyfikacja KMP w całkowitym i *in vitro* transkrybowanym RNA metodą HPLC-ESI/MS.

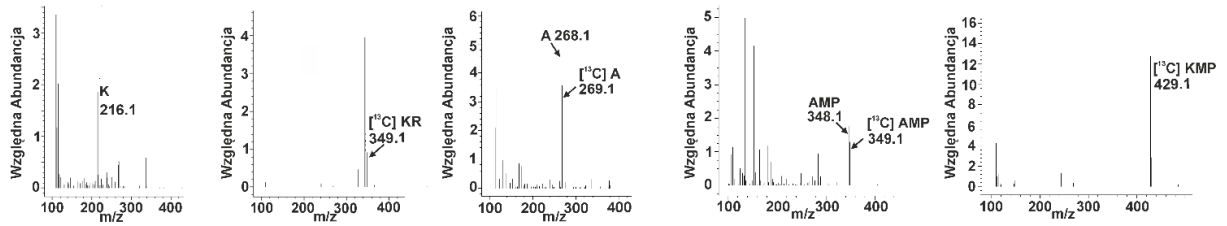
(A, B) Widma (tryb ujemny [M+H]<sup>-</sup>) KMP z RNA transkrybowanego *in vitro* w obecności KTP (A) oraz [<sup>13</sup>C]KMP pochodzącego z całkowitego RNA izolowanego z komórek HepG2 po traktowaniu [<sup>13</sup>C]RK (B).



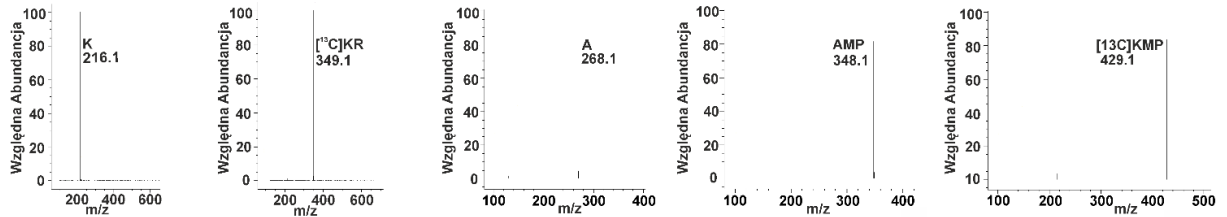
Rysunek uzupełniający S2: Analiza HPLC-ESI/MS zawartości podstawowych nukleotydów w RNA transkrybowanym *in vitro* w obecności lub nieobecności KTP. (A, B) Widma (tryb negatywny [M+H]<sup>-</sup>) transkryptu kontrolnego (A) i RNA transkrybowanego w obecności KTP (B).

A

## REZULTATY

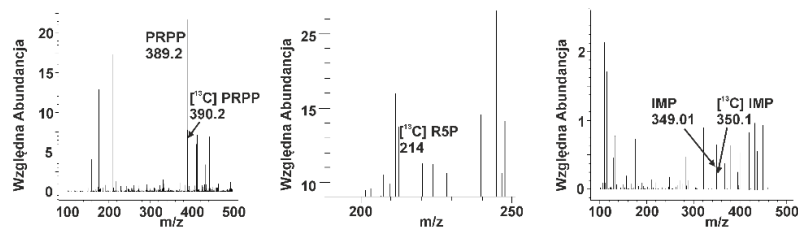


## STANDARDY

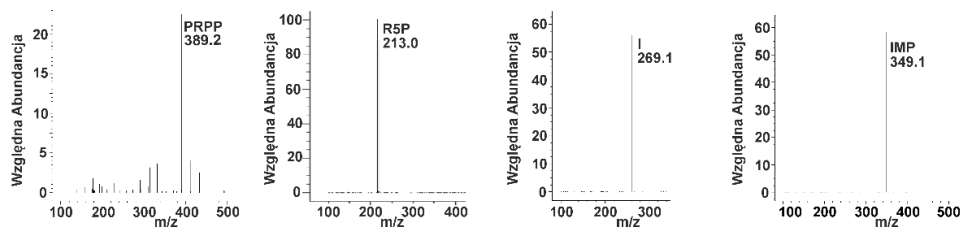


B

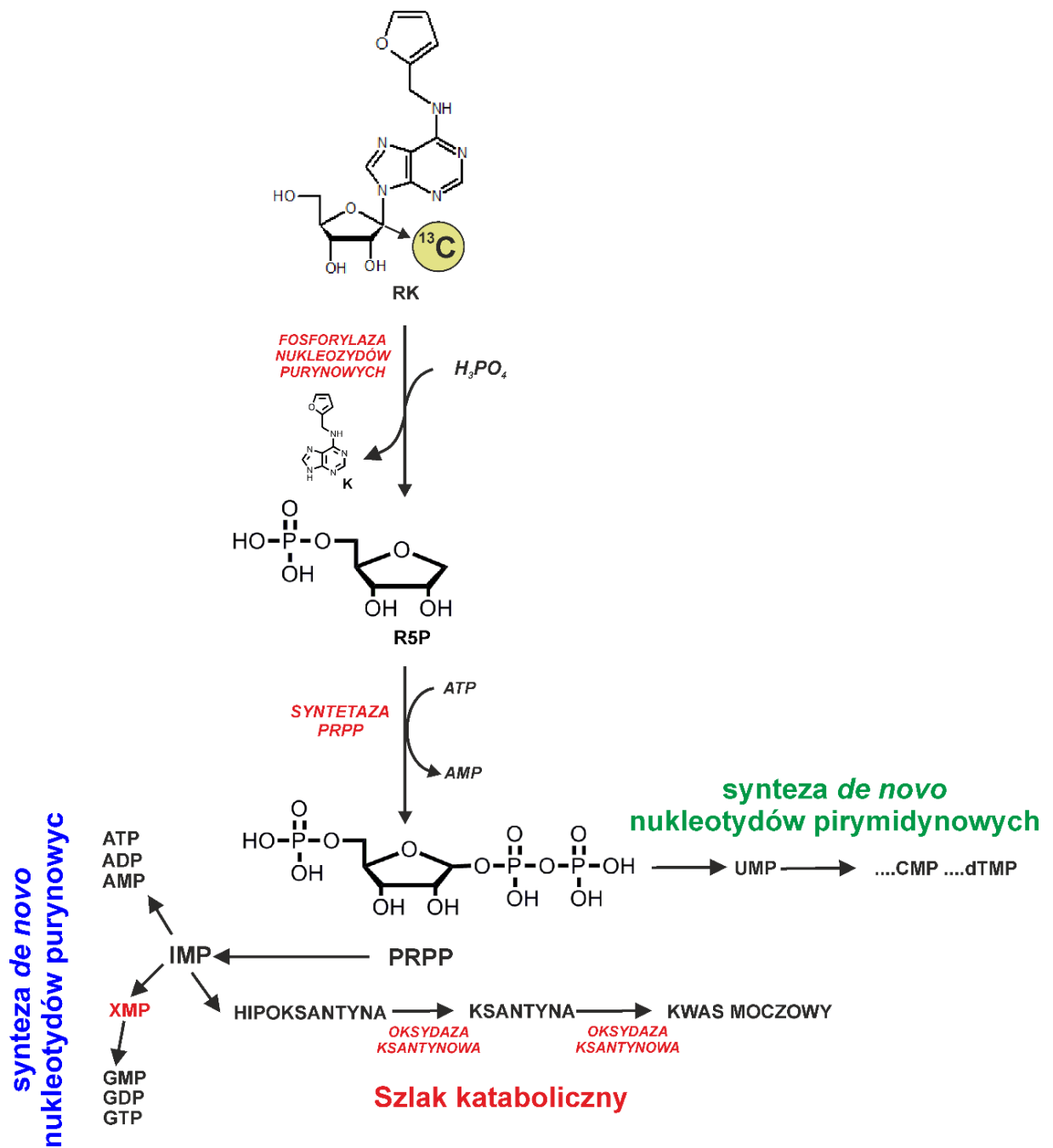
## REZULTATY



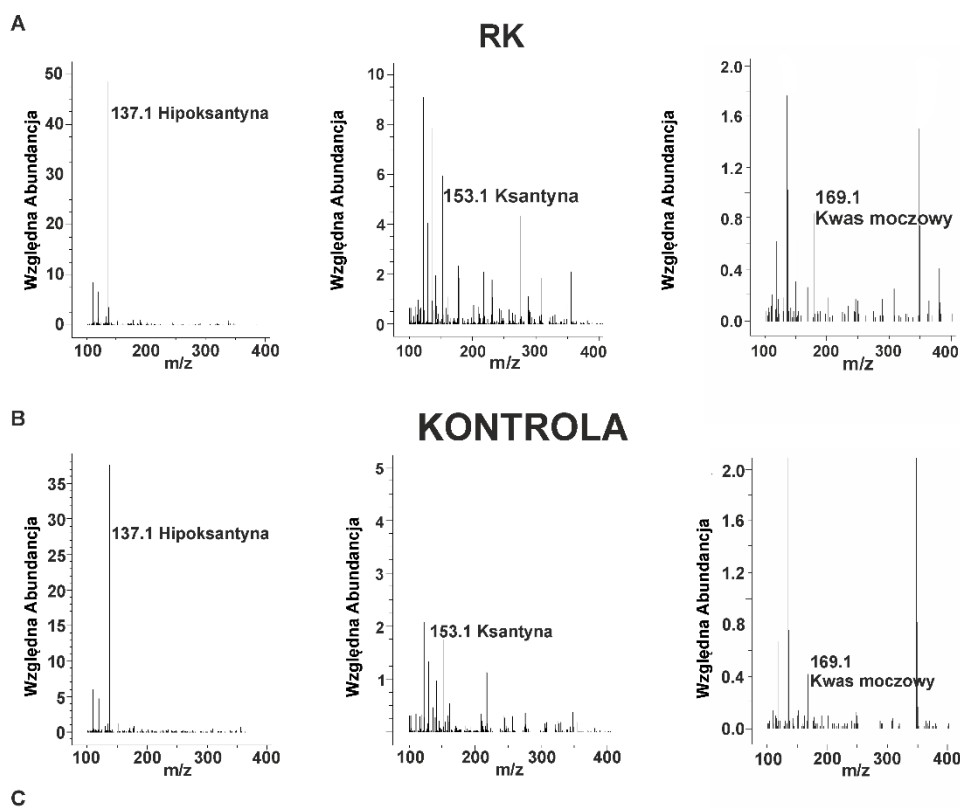
## STANDARDY



**Rysunek uzupełniający S3: Identyfikacja enzymatycznych metabolitów  $[^{13}\text{C}]$ RK w komórkach HepG2 metodą HPLC-ESI/MS. (A, B) Widma standardów nukleozydów/nukleotydów (panele dolne) i ekstraktu komórek HepG2 po traktowaniu  $[^{13}\text{C}]$ RK (panele górne). Analizy przeprowadzono w trybie dodatnim ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) lub ujemnym ( $\text{M}+\text{H}^-$ ) (A) K (kinetyna,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), RK/ $[^{13}\text{C}]$ RK (rybozyd kinetyny,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), A/ $[^{13}\text{C}]$ A (adenozyna,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), AMP/ $[^{13}\text{C}]$ AMP (5'-monofosforan adenozyny,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), KMP/ $[^{13}\text{C}]$ KMP (5'-monofosforan rybozydu kinetyny,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). (B) PRPP/ $[^{13}\text{C}]$ PRPP (5-fosfo-D-rybozo-1-difosforan, difosforan fosforybozylu,  $[\text{M}+\text{H}]^-$ ), R5P/ $[^{13}\text{C}]$ R5P (5-fosforan rybozy,  $[\text{M}+\text{H}]^-$ ), I/ $[^{13}\text{C}]$ I (inozyna,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), IMP/ $[^{13}\text{C}]$ IMP (5'-monofosforan inozyny,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).**

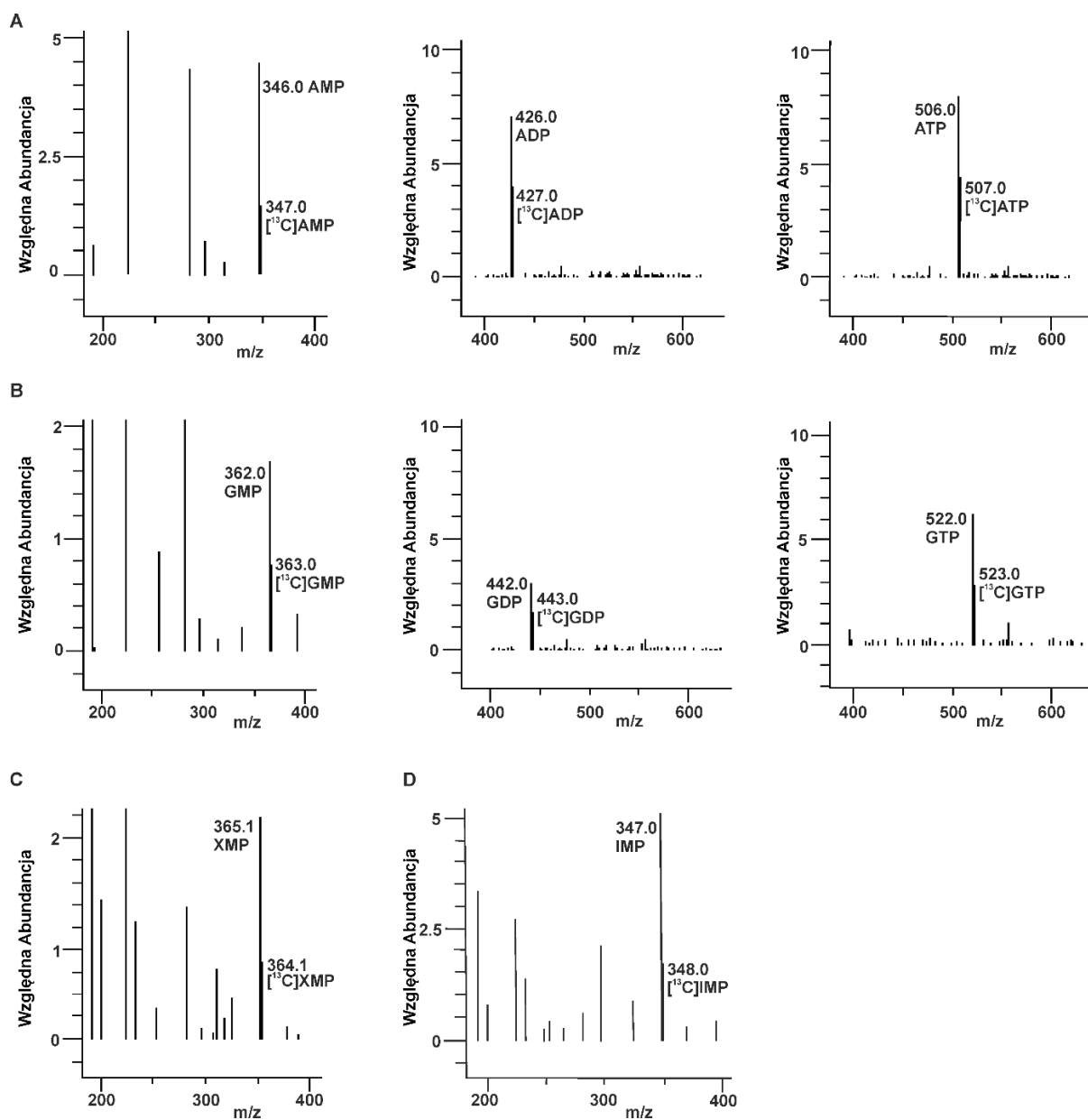


Rysunek uzupełniający S4: Udział metabolitów rybozydu kinetyny R5P i PRPP w różnych komórkowych szlakach enzymatycznych.



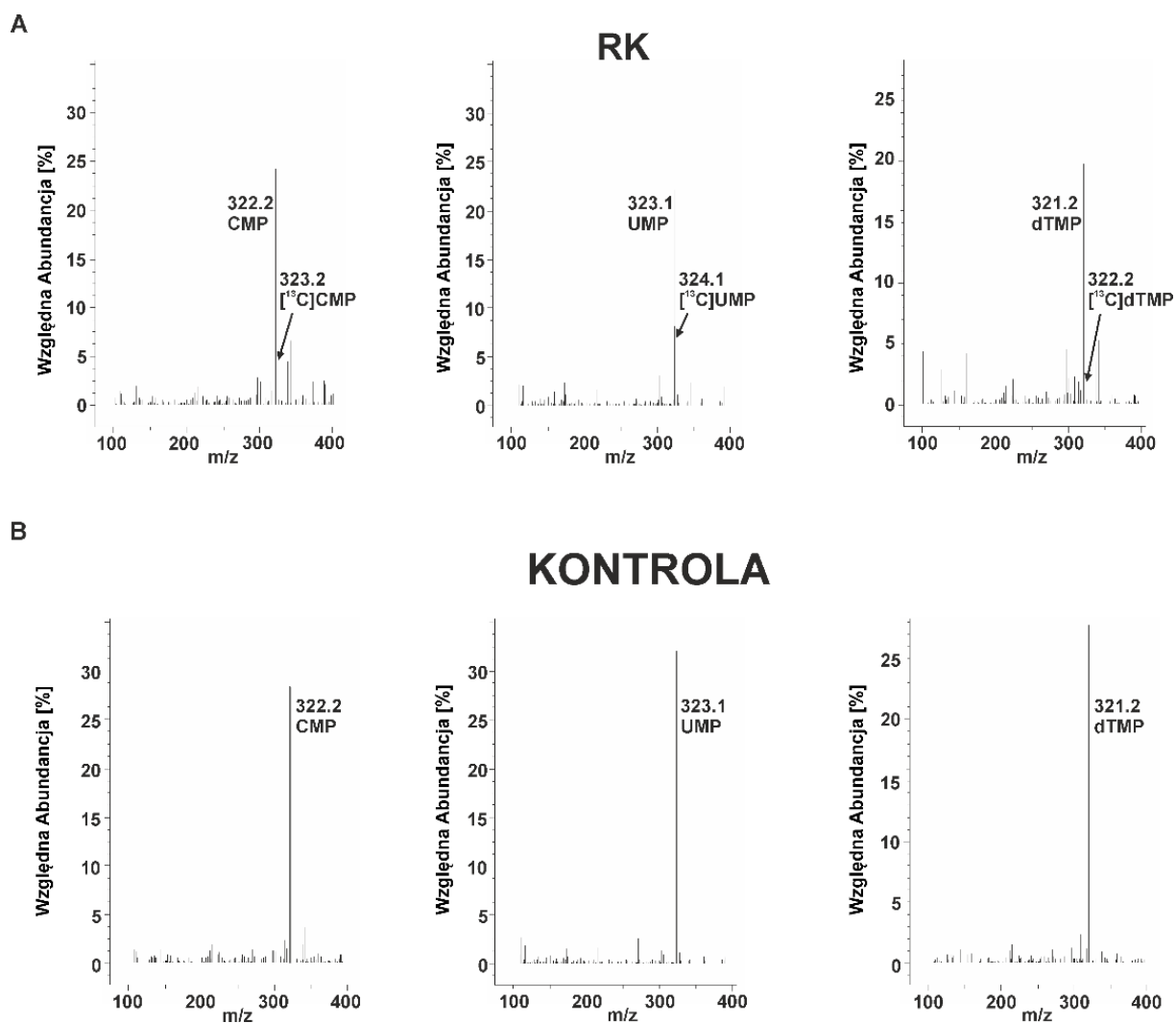
Metabolit	m/z	Względna Abundancja [%]		
		Kontrola (A)	RK (B)	B/A
Hipoksantyna	137.1	38	48	1.263
Ksantyna	153.1	1.8	6	3.388
Kwas moczowy	169.1	0.42	0.82	1.952

**Rysunek uzupełniający S5: Identyfikacja enzymatycznych metabolitów [<sup>13</sup>C]RK pochodzących ze szlaku katabolicznego w komórkach HepG2 metodą HPLC-ESI/MS. (A, B) Widma w trybie pozytywnym ([M+H]<sup>+</sup>) hipoksantyny, ksantyny i kwasu moczowego pochodzące z komórek HepG2 poddanych działaniu RK (A) i kontroli nie poddanej działaniu RK (B). (C) Porównanie względnej ilości hipoksantyny, ksantyny i kwasu moczowego w komórkach traktowanych i nietraktowanych.**

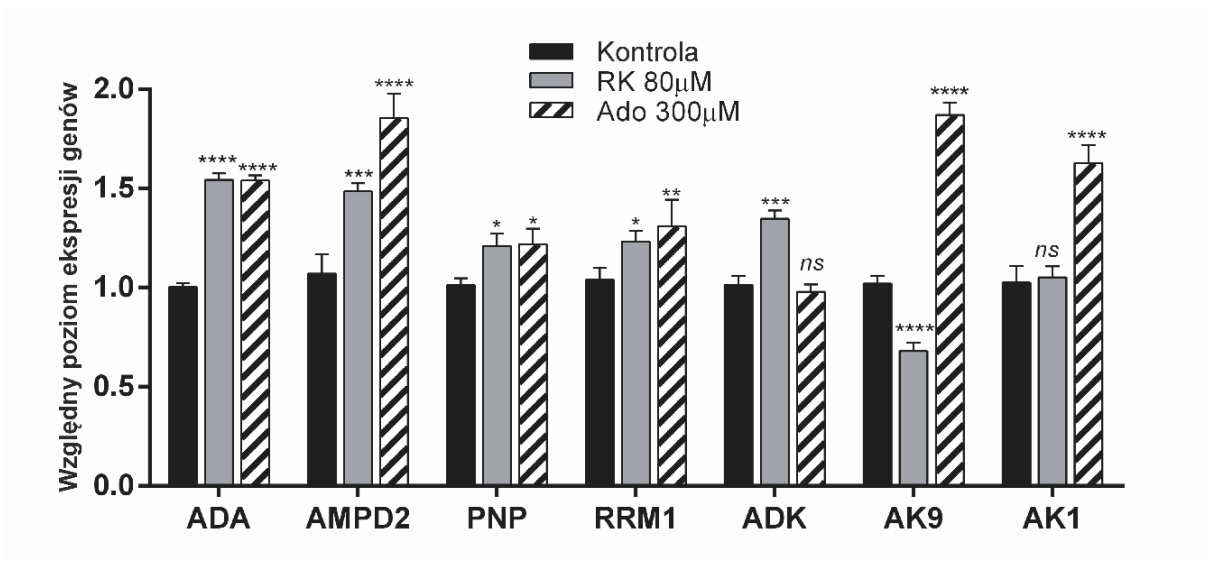


**Rysunek uzupełniający S6: Wykrywanie enzymatycznych metabolitów  $^{13}\text{C}$  RK pochodzących ze szlaku syntezy nukleotydów purynowych *de novo* w komórkach HepG2 metodą HPLC-ESI/MS. (A-D) Widma w trybie dodatnim ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) AMP/ $^{13}\text{C}$ AMP, ADP/ $^{13}\text{C}$ ADP i ATP/ $^{13}\text{C}$ ATP (adenozyno-5'-mono-/di-/trifosforan) (A); GMP/ $^{13}\text{C}$ GMP, GDP/ $^{13}\text{C}$ GDP i GTP/ $^{13}\text{C}$ GTP (guanozyno-5'-mono-/di-/trifosforan) (B); XMP/ $^{13}\text{C}$ XMP (5'-monofosforan ksantyny) (C) i IMP/ $^{13}\text{C}$ IMP (5'-monofosforan inozyny) (D) w ekstraktach z komórek HepG2 po traktowaniu  $^{13}\text{C}$  RK.**





**Rysunek uzupełniający S7: Analiza HPLC-ESI/MS metabolitów enzymatycznych  $^{13}\text{C}$ RK pochodzących ze szlaku syntezy *de novo* nukleotydów pirymidynowych w komórkach HepG2. (A, B) Widma w trybie ujemnym ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) CMP/ $^{13}\text{C}$ CMP (5'-monofosforan cytydyny), UMP/ $^{13}\text{C}$ UMP (5'-monofosforan urydyny) i dTMP/ $^{13}\text{C}$ dTMP (5'-monofosforan 2'-deoksytymidyny) uzyskane z komórek HepG2 po traktowaniu  $^{13}\text{C}$ RK (A) i związkami standardowymi (B).**



**Rysunek uzupełniający S8: Analiza poziomu ekspresji wybranych genów po indukcji RK.** Względna analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomów ekspresji genów ADA, AMPD2, PNP, RRM1, ADK, AK9 i AK1 w komórkach HepG2 24 h po traktowaniu rybozydem kinetyny w końcowym stężeniu 80 µM. Komórki nietraktowane i komórki inkubowane w obecności 300 µM adenozyiny przez 24 h były wykorzystywane odpowiednio jako kontrola negatywna i pozytywna. Dane przedstawione są jako średnie ± SD z trzech lub więcej niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna jest zaznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

**Tabela uzupełniająca S2: Zestawienie danych HPLC-DAD-ESI/MS dla wszystkich analizowanych metabolitów.** [<sup>13</sup>C]Mw/Mw - masa cząsteczkowa, r.t. - czas retencji, m/z - widmo masowe, (+) - tryb pozytywny, (-) - tryb negatywny. **(a)** elucja w gradiencie liniowym: rozpuszczalnik A (50 mM kwas mrówkowy) i rozpuszczalnik B (metanol) stosowane w elucji gradientowej: 0 - 50 min, 3% do 20% B; 50 - 65 min, 20% B; 65-70 min, 20% do 3% B. **(b)** elucja w gradiencie liniowym: rozpuszczalnik A (10 mM kwas mrówkowy) i rozpuszczalnik B (metanol) stosowane w elucji gradientowej: 0 - 50 min, 7% do 20% B; 50 - 65 min, 20% B; 65-70 min, 20% do 7% B. **(c)** elucja izokratyczna: 97% kwas mrówkowy 50 mM, 3% metanol, analiza przez 1-30 min.

Nazwa	Mw/[ <sup>13</sup> C]Mw	r.t.	m/z (+)	m/z (+)[ <sup>13</sup> C]	m/z (-)	m/z (-)[ <sup>13</sup> C]
<i>Natężenie przepływu 0,3 ml/min<sup>(a)</sup></i>						
KMP	427.09/428.09	32.512	428.1	429.1	-	-
PRPP	390.07/391.07	6.336	-	-	389.2	390.2
XMP	364.21/365.21	1.547	365.1	366.1	-	-
IMP	348.05/349.05	1.950	349.1	350.1	-	-
AMP	347.22/348.22	3.210	348.1	349.1	-	-
I	268.23/269.23	8.012	269.1	270.1	-	-
A	267.24/268.24	9.512	268.1	269.1	-	-
dA	251.24/252.24	10.615	252.1	-	-	-
K	215.21	63.906	216.1	-	-	-
R5P	214.03/215.03	37.750	-	-	213.0	214.0
Kwas moczowy	168.11	2.973	169.1	-	-	-
Xan	152.11	4.110	153.1	-	-	-
Hyp	136.11	3.309	137.1	-	-	-
<i>Natężenie przepływu 0,3 ml/min<sup>(b)</sup></i>						
C	243.22/244.22	4.516	244.1	245.1	-	-
dC	227.22/228.22	5.067	228.1	229.1	-	-
m5C	257.24/258.24	5.785	258.1	259.1	-	-
dU	228.20/229.20	5.985	229.1	230.1	-	-
m5dC	241.24/241.24	6.007	242.1	243.1	-	-
dI	252.23/253.23	6.497	253.1	254.1	-	-
dX	268.23/269.23	6.856	269.1	270.1	-	-
G	283.24/284.24	7.006	284.1	285.1	-	-
dG	267.24/268.24	7.514	268.1	269.1	-	-
dA	251.24/252.24	7.897	252.1	253.1	-	-
T	242.23/243.23	10.018	243.1	244.1	-	-
RK	347.33/348.33	30.205	348.1	349.1	-	-

dKR	331.33/332.33	54.247	-	333.0	-	-
<i>Natężenie przepływu 0,4 ml/min<sup>(a)</sup></i>						
KTP	587.27/588.27	17.903	-	-	586.2	587.2
KDP	507.29/508.29	20.125	-	-	506.2	507.2
KMP	427.33/428.33	27.402	-	-	426.2	427.2
<i>Natężenie przepływu 0,1 ml/min<sup>(c)</sup></i>						
GTP	523.18/524.18	0.581	-	-	522.0	523.0
PKB	443.20/444.20	2.075	-	-	442.0	443.0
GMP	363.22/364.22	12.056	-	-	362.0	363.0
ATP	507.18/508.18	1.346	-	-	506.0	507.0
ADP	427.20/428.20	2.767	-	-	426.0	427.0
AMP	347.22/348.22	14.057	-	-	346.0	347.0
XMP	364.21/365.21	11.673	-	-	363.0	364.0
IMP	348.20/349.20	11.878	-	-	347.0	348.0
UMP	324.18/325.18	11.895	-	-	323.1	324.1
CMP	323.20/324.20	8.685	-	-	322.2	323.2
dTMP	322.21/323.21	18.540	-	-	321.2	322.2

**Tabela uzupełniająca S3: Zestawienie względnej liczby zmodyfikowanych nukleotydów w całkowitym DNA komórek HepG2 po traktowaniu RK analizowanych metodą HPLC-DAD-ESI/MS. (A) Zestawienie danych nukleotydów purynowych i pirymidynowych. (B) Zestawienie pochodnych [<sup>13</sup>C]RK. (C) Zestawienie danych rybonukleotydów.**

	<b>Względna liczebność (%)</b>			
	<b>RK (μM)</b>			
	<b>Kontrola</b>	<b>80</b>	<b>200</b>	<b>200 +ADKi</b>
<b>dA</b>	16.50	4.06	4.25	8.20
<b>dI</b>	0.01	0.07	1.01	1.01
<b>dG</b>	15.40	6.80	5.10	6.55
<b>dX</b>	0.01	0.10	-	1.20
<b>dC</b>	15.60	15.00	11.05	9.90
<b>dU</b>	-	0.13	0.14	0.10
<b>m5dC</b>	0.75	0.30	0.07	0.20
<b>T</b>	15.30	15.00	7.09	8.55

**B**

	Względna liczebność (%)			
	RK (μM)			
	Kontrola	80	200	200 +ADKi
(C <sup>13</sup> )dU	-	0.4	0.4	-
(C <sup>13</sup> )C	-	-	1.0	0.01
(C <sup>13</sup> )dC	-	-	-	0.55
(C <sup>13</sup> )dI	-	1.0	0.01	0.38
(C <sup>13</sup> )dA	-	-	-	0.4
(C <sup>13</sup> )dG	-	-	-	0.4
(C <sup>13</sup> )G	-	-	0.7	0.15
(C <sup>13</sup> )dX	-	5.35	0.45	0.25
(C <sup>13</sup> )dRK	-	0.1	0.05	-
(C <sup>13</sup> )RK	-	-	0.07	-

**C**

	Względna liczebność (%)			
	RK (μM)			
	Kontrola	80	200	200 +ADKi
<b>C</b>	-	-	3.55	0.9
<b>m5C</b>	-	-	-	0.009
<b>G</b>	-	-	4.25	3.38
(C <sup>13</sup> )C	-	-	1.0	0.01
(C <sup>13</sup> )G	-	-	0.7	0.15
(C <sup>13</sup> )RK	-	-	0.07	-

## 4.2. Wpływ rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów

### 4.2.1. *Zamiana glukozy na galaktozę w pożywce hodowlanej przyspiesza śmierć komórek po traktowaniu RK*

Celem tych badań było porównanie czy podłoże "galaktozowe", które wymusza i nasila fosforylację oksydacyjną (OXPHOS), wpływa na uwrażliwienie komórek na działanie RK oraz czy zapewnia większy i szybszy efekt niż podłoże zawierające glukozę. W tym celu zbadano proliferację komórek w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu xCELLigence oraz przeprowadzono cytometryczną analizę indukcji apoptozy komórek. Zastosowano test na lokalizację i liczbę mitochondriów, a także na monitorowanie wychwytu glukozy przy użyciu 2-NBDG. Eksperymenty rozpoczęto od wyboru optymalnego stężenia RK, które było wystarczające do śledzenia indukcji śmierci komórek w hodowli HepG2.

System xCELLigence pozwolił wykazać, że efekt Crabtree jest krótkotrwałą odpowiedzią komórek na niekorzystne warunki środowiska. Komórki hodowane w podłożu galaktozowym były bardziej wrażliwe na antymetabolit RK. Ze względu na jego toksyczność w warunkach eksperymentalnych, czas analizy został skrócony z 24 do 6 h, z wyjątkiem testu proliferacji w czasie rzeczywistym. W tym celu, tak samo jak w przypadku analiz związanych z metabolizmem puryn, użyto system xCELLigence do monitorowania proliferacji komórek HepG2, aby porównać toksyczność RK w dwóch różnych podłożach hodowlanych uzupełnionych glukozą lub galaktozą. Żywotność komórek HepG2 monitorowano przez 120 h w odstępach 30-minutowych (**Rys. 10A**). Kinetyka pomiaru proliferacji komórek, dostarczyła informacji, kiedy nastąpiła aktywacja toksycznego działania badanego związku. Tak jak już wspomniano wcześniej, na wartość indeksu komórkowego (CI) wpływa kilka parametrów, takich jak liczba komórek, wielkość komórek, interakcje komórka-podłoże oraz komórka-komórka. Dlatego system xCELLigence wykorzystuje pomiary impedancji do monitorowania w czasie rzeczywistym wzrostu i śmierci komórek.

Zaobserwowano znaczący spadek wartości indeksu komórkowego komórek HepG2 po 24 h inkubacji z RK w pożywce galaktozowej, podczas gdy zahamowanie proliferacji komórek w pożywce glukozowej było mniej znaczące (**Rys. 10A**). Oznacza to, że komórki HepG2 były wrażliwe na rybozyd kinetyny w obu rodzajach pożywek, ale szybkość odpowiedzi była różna.

Apoptoza i nekroza stanowią dwa główne procesy prowadzące do śmierci komórek. W celu zbadania, czy RK indukował apoptozę w komórkach HepG2, przeprowadzono analizę za pomocą cytometrii przepływowej, poprzez zastosowanie podwójnego barwienia

odczynnikami CellEvent® Caspase-3/7 Green ReadyProbes® Reagent i 7AAD (szczegółowo opisane w rozdziale *Materiały i metody*). RK wpływał na proliferację HepG2 w sposób zależny od dawki i czasu (**Rys. 10B**). Po 6 h inkubacji z RK w zakresie stężeń 20-80  $\mu\text{M}$  w medium galaktozowym (wykres po prawej stronie), odsetek komórek apoptotycznych (Caspase-3/7/7AAD-pozytywnych) wzrósł do 35,5% w porównaniu z komórkami kontrolnymi (11,92%), natomiast w medium glukozowym (24 h traktowania RK; wykres po lewej stronie) efekt ten był mniej wyraźny i dwukrotnie niższy (**Rys. 10B**).

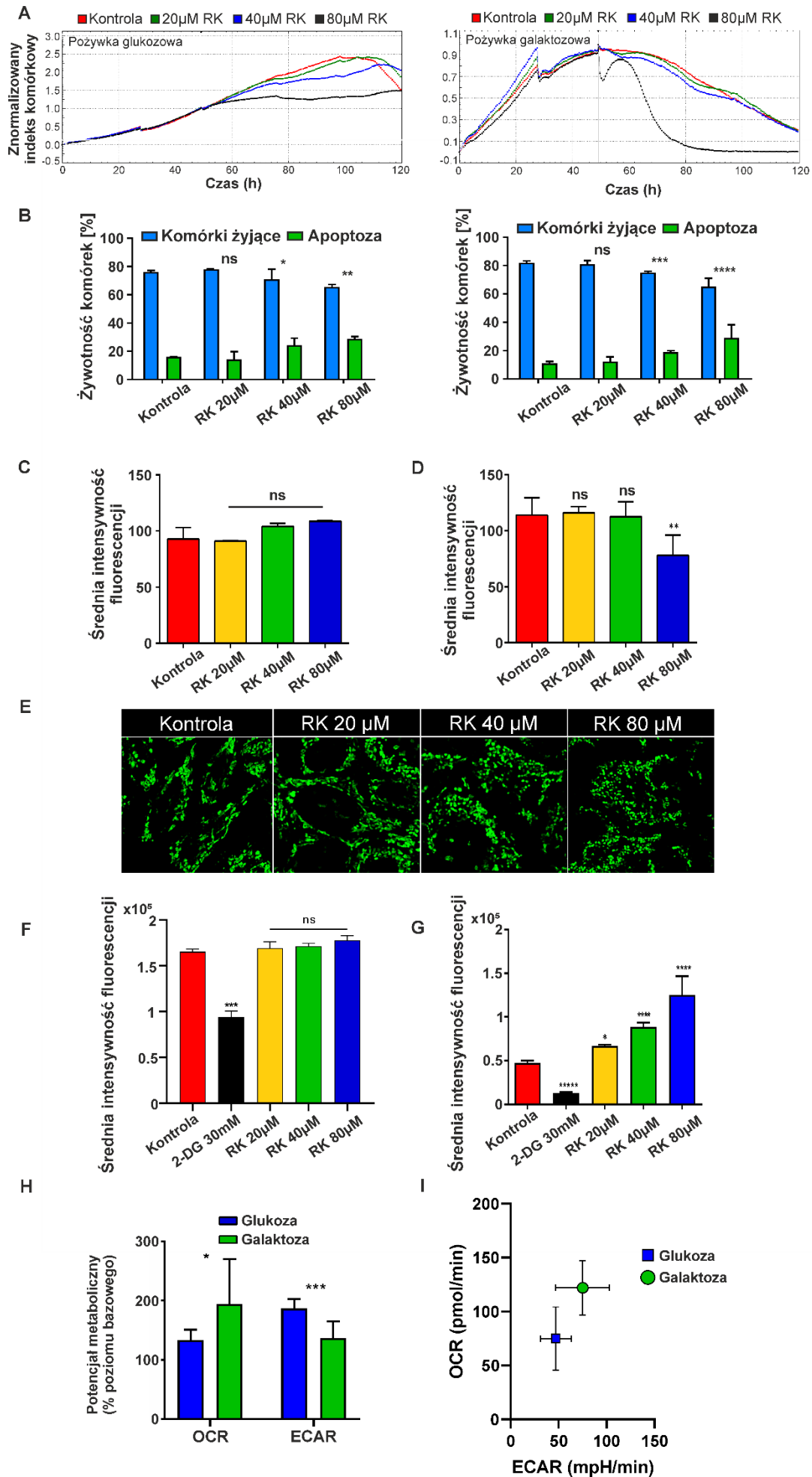
W celu określenia liczby mitochondriów w komórkach HepG2 rosnących na podłożu galaktozowym i glukozowym zastosowano barwnik MitoTracker Green FM, który lokalizuje się w mitochondriach niezależnie od  $\Delta\psi$ . MitoTracker Green FM pozwala na pomiar masy mitochondriów i stał się użytecznym narzędziem do oceny mitofagii. Niską toksyczność komórkową RK zaobserwowano w komórkach rosnących w podłożu glukozowym, o czym świadczył brak przesunięcia intensywności fluorescencji i brak zmian w ilości mitochondriów (liczba mitochondriów nieznacznie wzrosła do około 17% po traktowaniu RK; **Rys. 10C**). W podłożu galaktozowym obserwowano niewielki spadek intensywności fluorescencji po ekspozycji na 20-40  $\mu\text{M}$  RK (**Rys. 10D**), natomiast po zastosowaniu 80  $\mu\text{M}$  RK spadek intensywności fluorescencji był znaczny i korelował ze spadkiem liczby mitochondriów o 31,5% w porównaniu z komórkami kontrolnymi. W przypadku komórek HepG2 rosnących w pożywce suplementowanej galaktozą, przeprowadzono dodatkową analizę mikroskopową, która uwidoczniła pofragmentowane mitochondria pod wpływem działania RK w zakresie badanych stężeń (**Rys. 10E**).

Metabolizm komórkowy obejmuje wiele reakcji metabolicznych, które biorą udział w przekształcaniu źródeł węgla (pozyskiwanie składników odżywczych) w inne składniki budulcowe niezbędnych do biosyntezy. Wraz ze wzrostem przepływu metabolitów, wymuszonym przez glikolizę, proliferacja komórek nowotworowych jest wzmacniana w celu dostarczenia większej ilości energii. Dlatego w badaniach zastosowano fluorescencyjny analog glukozy, czyli 2-NBDG, a następnie cytometrię przepływową do ilościowego oznaczania w czasie rzeczywistym wychwytu glukozy przez komórki poddane działaniu RK, rosnące w obu rodzajach podłoża (**Rys. 10F, G**). Efekt ten obserwowano jedynie w komórkach HepG2 rosnących w podłożu z galaktozą (**Rys. 10G**). Im wyższe stężenie RK, tym wyraźniejszy był wychwyt glukozy, co korelowało ze wzrostem fluorescencji ponad 2,5-krotnie w komórkach traktowanych 80  $\mu\text{M}$  RK, w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Pojawienie się glukozy w pożywce galaktozowej natychmiast wymuszało glikolizę i zmniejszało metabolizm OXPHOS po suplementacji RK. W pożywce glukozowej nie

obserwowano zmian, a w komórkach traktowanych inhibitorem glikolizy, czyli 2-DG (2-deoksy-D-glukoza), zaobserwowano znaczący spadek, bo prawie 70%, wychwytu glukozy (**Rys. 10F**).

Ponadto, scharakteryzowano fenotyp metaboliczny komórek HepG2 przy użyciu systemu Seahorse extracellular flux (XFp). W systemie tym respiracja mitochondrialna (OCR) jest wykorzystywana do oceny OXPHOS, a zakwaszenie zewnątrzkomórkowe poprzez wzrost stężenia mleczanu (ECAR) jest indykatorem glikolizy. Porównano komórki rosnące na podłożu glukozowym i galaktozowym i stwierdzono, że w komórkach hodowanych w pożywce zawierającej galaktozę, poziom OXPHOS wzrósł o około 46%, a aktywność ECAR była o 26,8% niższa niż w komórkach hodowanych na podłożu glukozowym (**Rys.10H**). Może to świadczyć o tym, że komórki HepG2 rosnące w środowisku galaktozy zwiększają swoją zdolność do konsumpcji tlenu poprzez wzmocnienie fosforylacji oksydacyjnej (**Rys. 10I**).





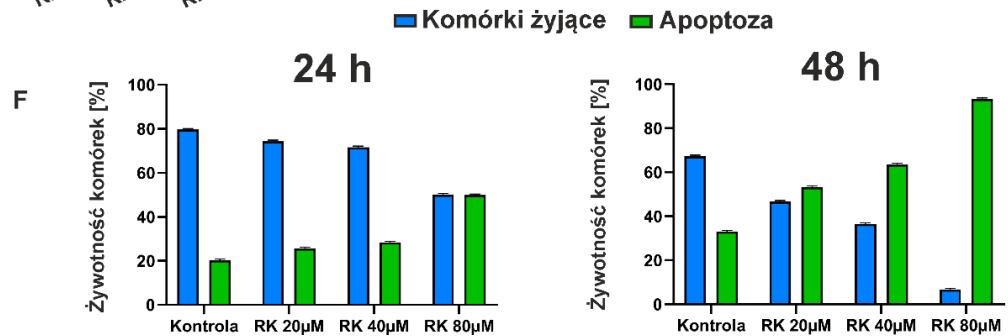
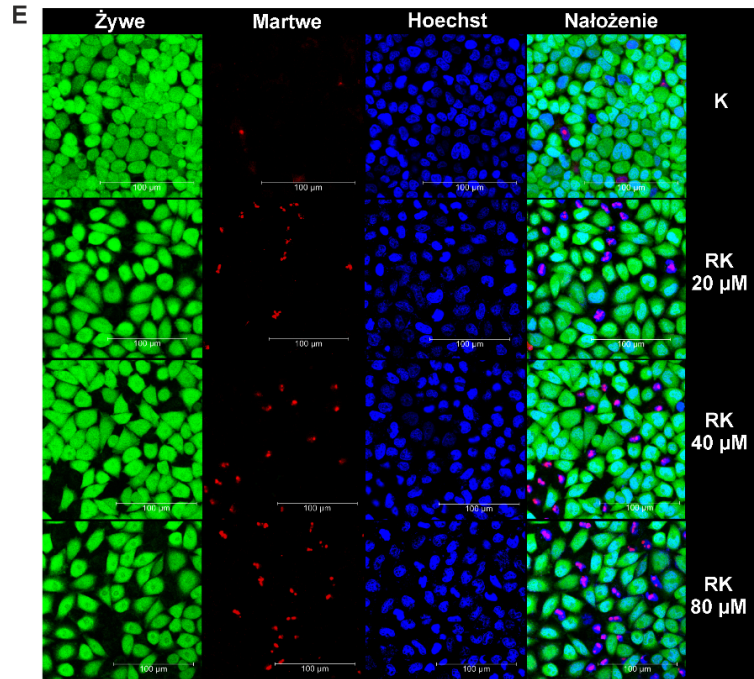
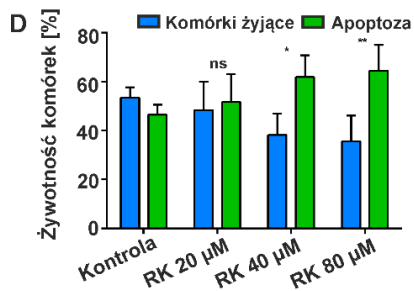
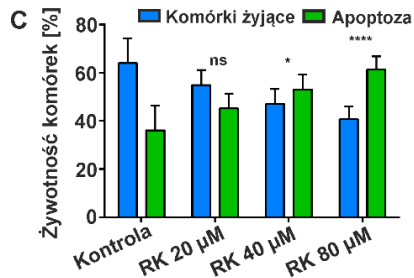
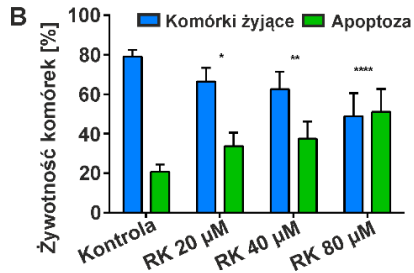
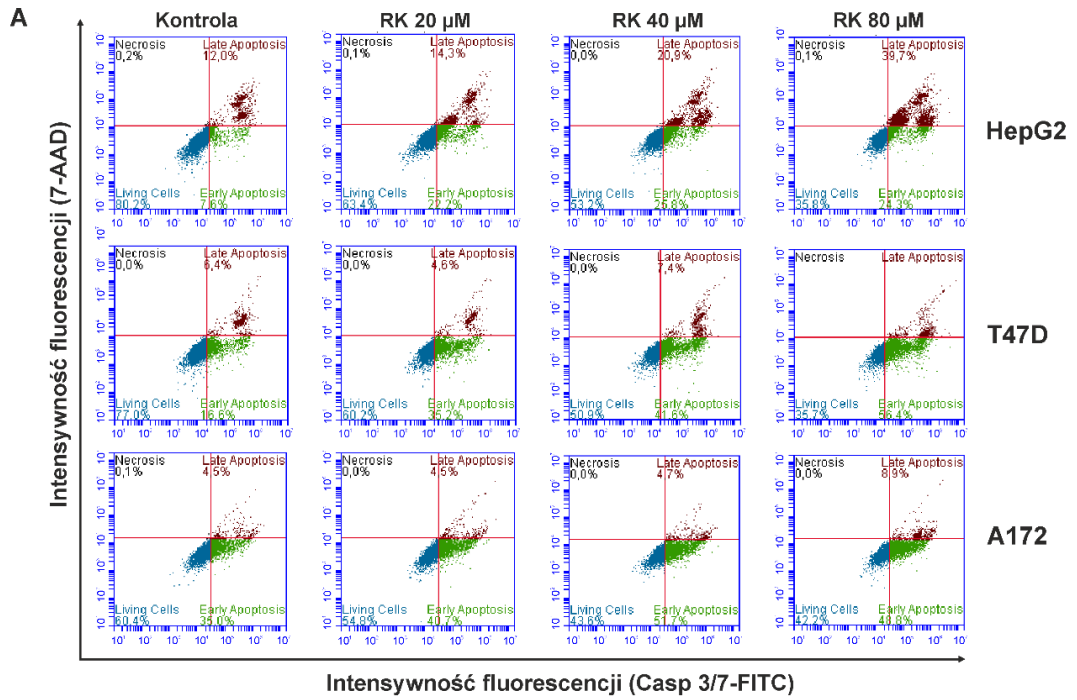
**Rysunek 10: Traktowanie komórek HepG2 rybozydem kinetyny (RK) jest wzmocnione przez zastąpienie glukozy galaktozą w podłożu hodowlanym.** (A) Proliferacja komórek w czasie rzeczywistym w podłożu glukozowym vs. galaktozowym w obecności RK. Wpływ RK (20-80  $\mu$ M) na proliferację komórek HepG2 monitorowano za pomocą systemu xCELLigence przez 120 h w odstępach 30-minutowych. Wyniki są reprezentatywne dla co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. (B) Analiza apoptozy/nekrozy komórek HepG2 po indukcji RK w podłożu glukozowym (wykres po lewej stronie) i galaktozowym (wykres po prawej stronie). Poziom apoptozy oceniano za pomocą cytometrii przepływowej z zastosowaniem podwójnego barwienia Casp 3/7-FITC/7-AAD (Thermo Fisher Scientific). Odstawienie glukozy uwrażliwia komórki HepG2 na RK. Niebieskie słupki oznaczają żywe komórki, podczas gdy zielone słupki reprezentują zarówno wczesne jak i późne komórki apoptotyczne. Dane przedstawiono jako średni procent całej analizowanej populacji (10,000 komórek)  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. (C, D) Pomiary masy mitochondriów przy użyciu MitoTracker Green metodą cytometrii przepływowej odpowiednio w podłożu glukozowym (C) i galaktozowym (D). Wyniki ilościowe masy mitochondriów są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów. (E) W przypadku komórek rosnących w pożywce galaktozowej wykonano wizualizację mikroskopową mitochondriów za pomocą MitoTracker Green. (F, G) Pomiar wychwytu fluorescencyjnego analogu glukozy (2-NBDG) metodą cytometrii przepływowej w komórkach HepG2 w podłożu zawierającym glukozę (F) i galaktozę (G). Żywotność komórek określano na podstawie szybkości wychwytu glukozy przez komórki po traktowaniu RK w różnych stężeniach. Aby monitorować wychwyt glukozy przez żywe komórki, użyto fluorescencyjnego analogu glukozy (2-NBDG) do określenia średniej fluorescencji. Intensywność fluorescencji mierzona za pomocą cytometru przepływowego Accuri C6 została przedstawiona w postaci wykresów słupkowych (średnia  $\pm$  SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Jako kontrolę pozytywną stosowano 2-deoksy-D-glukozę. (H) Porównanie metabolizmu glikolitycznego i tlenowego w komórkach poprzez ocenę parametrów OCR i ECAR. (I) Mapa metaboliczna ilustrująca profile metaboliczne komórek HepG2 hodowanych w podłożu glukozowym i galaktozowym poprzez wartości OCR i ECAR. Istotność statystyczną oznaczono gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.2. *Pozbawienie glukozy nasila działanie RK- wpływ związku na różne linie komórkowe wykazujące efekt Crabtree*

Następnie oceniono, czy RK może indukować apoptozę w komórkach T47D (linia komórkowa ludzkiego nowotworu piersi) i A172 (linia komórkowa ludzkiego glejaka wielopostaciowego) rosnących w podłożu galaktozowym, ponieważ komórki te również podlegają efektowi Crabtree (**Rys. 11A**). Analiza cytometrii przepływowej wykazała, że apoptotyczne działanie RK na obie linie komórkowe jest podobne do obserwowanego w komórkach HepG2. Odsetek apoptotycznych komórek HepG2 traktowanych 80  $\mu$ M RK wzrósł o 44,4% w porównaniu z komórkami kontrolnymi, natomiast w komórkach T47D i A172 wzrósł odpowiednio o 33,4% i 18,2% (**Rys. 11A-D**). Wyniki te potwierdziły, że apoptoza jest zaangażowana w indukowane przez RK hamowanie proliferacji komórek w

pożywce galaktozowej. W ten sposób wykazano, że RK jest silnym czynnikiem indukującym apoptozę w sposób zależny od stężenia. Porównanie efektu apoptotycznego rybozydu kinetyki wśród różnych linii komórkowych, u których dochodzi również do aktywacji efektu Crabtree, wykazało, że efekt działania związku zależy od typu komórki (**Rys. 11A**). Analiza mikroskopowa żywotności komórek HepG2 w pożywce galaktozowej po 6 h traktowania RK, uwidoczniała rozkład komórek żywych (kolor zielony) i martwych (kolor czerwony) (**Rys. 11E**). Wzrost poziomu martwych komórek był skorelowany z rosnącym stężeniem RK.

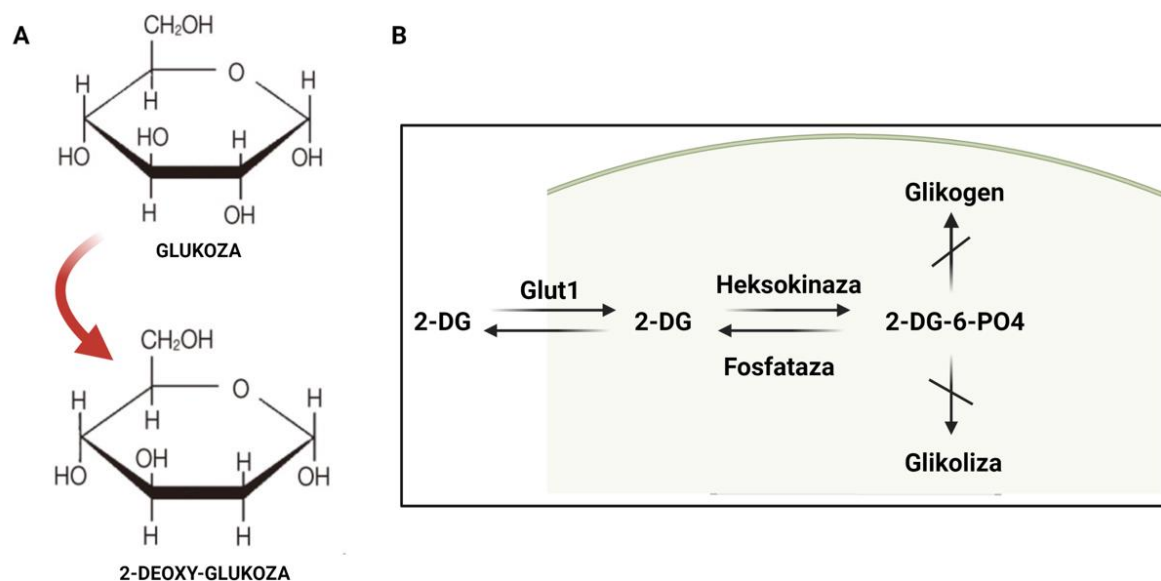
W przypadku samej glukozy przeprowadzono też pojedynczy eksperyment sprawdzający, czy wydłużenie czasu inkubacji przyniesie lepszy efekt działania związku. W związku z tym, wykonano 24 i 48-godziną inkubację porównawczą komórek HepG2 z RK w zakresie z stężeń 20- 80  $\mu\text{M}$ . Zaobserwowano, że już przy najniższym stężeniu RK, nastąpił znaczący procentowy wzrost komórek apoptotycznych i dla każdego ze stężeń był 2-krotnie wyższy w porównaniu do komórek inkubowanych z RK przez 24 h (**Rys. 11F**).



**Rysunek 11: Porównanie wpływu RK w pożywce galaktozowej na przeżywalność komórek trzech różnych linii komórkowych wykazujących efekt Crabtree.** (A) Poziom apoptozy oceniano w liniach komórkowych HepG2, T47D i A172 przez podwójne barwienie Casp 3/7-FITC/7-AAD. Na wykresach cytometrycznych dolny lewy kwadrant (niebieski) wskazuje komórki żywe; dolny prawy (zielony) komórki wczesnej apoptozy; górny prawy (brązowy) komórki apoptozy późnej, a górny lewy (czarny), to komórki nekrotyczne. Odsetek żywych i apoptotycznych komórek po 6 h inkubacji z RK w różnych stężeniach przedstawiono również na wykresach słupkowych (B-D). Niebieskie słupki oznaczają żywe komórki, podczas gdy zielone słupki reprezentują zarówno wczesne, jak i późne komórki apoptotyczne. Dane przedstawione są jako średni procent całej analizowanej populacji (10 000 komórek)  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna jest zaznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ . (E) Analiza mikroskopii konfokalnej żywotności komórek HepG2 w pożywce galaktozowej 6 h po traktowaniu RK przy użyciu testu LIVE/DEAD Assay (Thermo Fisher Scientific). (F) Porównawczy poziom apoptozy w komórkach HepG2 po 24 i 48 h inkubacji z RK.

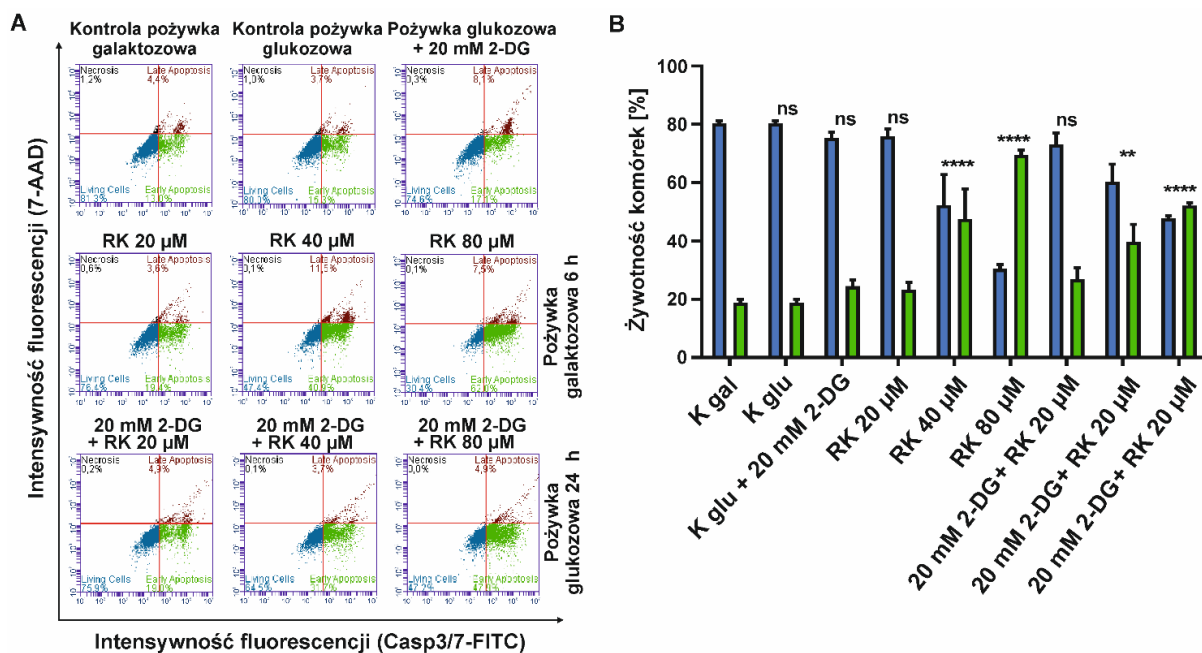
**4.2.3. *Hamowanie glikolizy za pomocą 2-DG w komórkach HepG2, poddanych działaniu RK, jest mniej skuteczne w indukowaniu śmierci komórek niż w komórkach poddanych działaniu RK i hodowanych w pożywce zawierającej galaktozę.***

Aby określić i potwierdzić, który ze szlaków metabolicznych jest zaburzony w wyniku działania RK, przeprowadzono analizę apoptozy/nekrozy w komórkach HepG2 rosnących w podłożu galaktozowym lub glukozowym z dodatkiem 2-DG (2-deoksy-d-glukoza), czynnika zaburzającego proces glikolizy (Schemat 39). 2-DG blokuje pierwszy etap glikolizy (działa kompetycyjnie hamując produkcję glukozo-6-fosforanu na poziomie heksokinazy). Zahamowanie glikolizy powoduje obniżenie stężenia pirogronianu, który włącza się w cykl kwasu trójkarboksyłowego (TCA) w celu wytworzenia ATP. W przypadku eksperymentu, pula pirogronianu była jednak utrzymywana przez egzogenne pirogronian w podłożu wzrostowym.



**Schemat 39:** Porównanie struktur 2-deoksy-D-glukozy i glukozy oraz schemat obrazujący mechanizm działania inhibitora podczas pierwszej reakcji enzymatycznej glikolizy [223].

Komórki w podłożu galaktozowym traktowano RK przez 6 h, natomiast komórki, których głównym substratem energetycznym jest glukoza, inkubowano przez pierwsze 24 h z inhibitorem glikolizy 2-DG, a następnie z RK przez kolejne 24 h. Zaobserwowano, że apoptotyczny efekt RK jest szybszy i bardziej efektywny w komórkach rosnących w podłożu galaktozowym, z nasiloną OXPHOS. Odsetek apoptotycznych komórek HepG2 poddanych działaniu 80  $\mu\text{M}$  RK wzrósł do 52,1% w porównaniu z komórkami kontrolnymi, podczas gdy w komórkach rosnących w warunkach 2-DG odsetek ten wynosił do 33,6% (**Rys. 12A, B**). Inhibitor 2-DG nie był toksyczny dla komórek, ale po dodaniu RK obserwowano indukcję apoptozy, która nie była tak znacząca, jak w przypadku komórek HepG2 rosnących w środowisku zawierającym galaktozę (**Rys. 12**).



**Rysunek 12: Wpływ 2-deoksy-D-glukozy na żywotność komórek HepG2 po traktowaniu RK.** Porównanie żywotności komórek po indukcji RK (6 h), hodowanych w podłożu galaktozowym i z dodatkiem 2-deoksy-D-glukozy. **(A)** Poziom apoptozy oceniano za pomocą cytometrii przepływowej i przedstawiono jako reprezentatywny wykres żywych, wczesnych apoptotycznych i późnych apoptotycznych komórek. **(B)** Dane przedstawiono również na wykresie słupkowym, gdzie niebieskie słupki oznaczają żywe komórki, a zielone słupki oznaczają zarówno wczesne, jak i późne apoptotyczne komórki. Dane są przedstawione jako średni procent całej analizowanej populacji (10 000 komórek) ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna jest oznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.4. RK indukuje perturbacje potencjału błony mitochondrialnej i obniża poziom ATP w komórkach HepG2

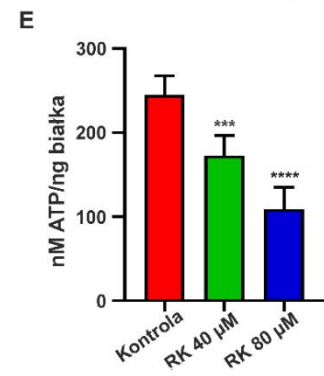
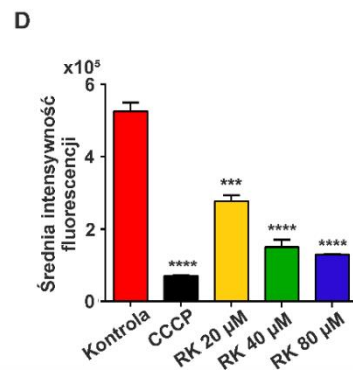
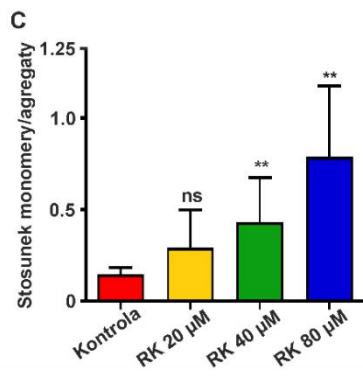
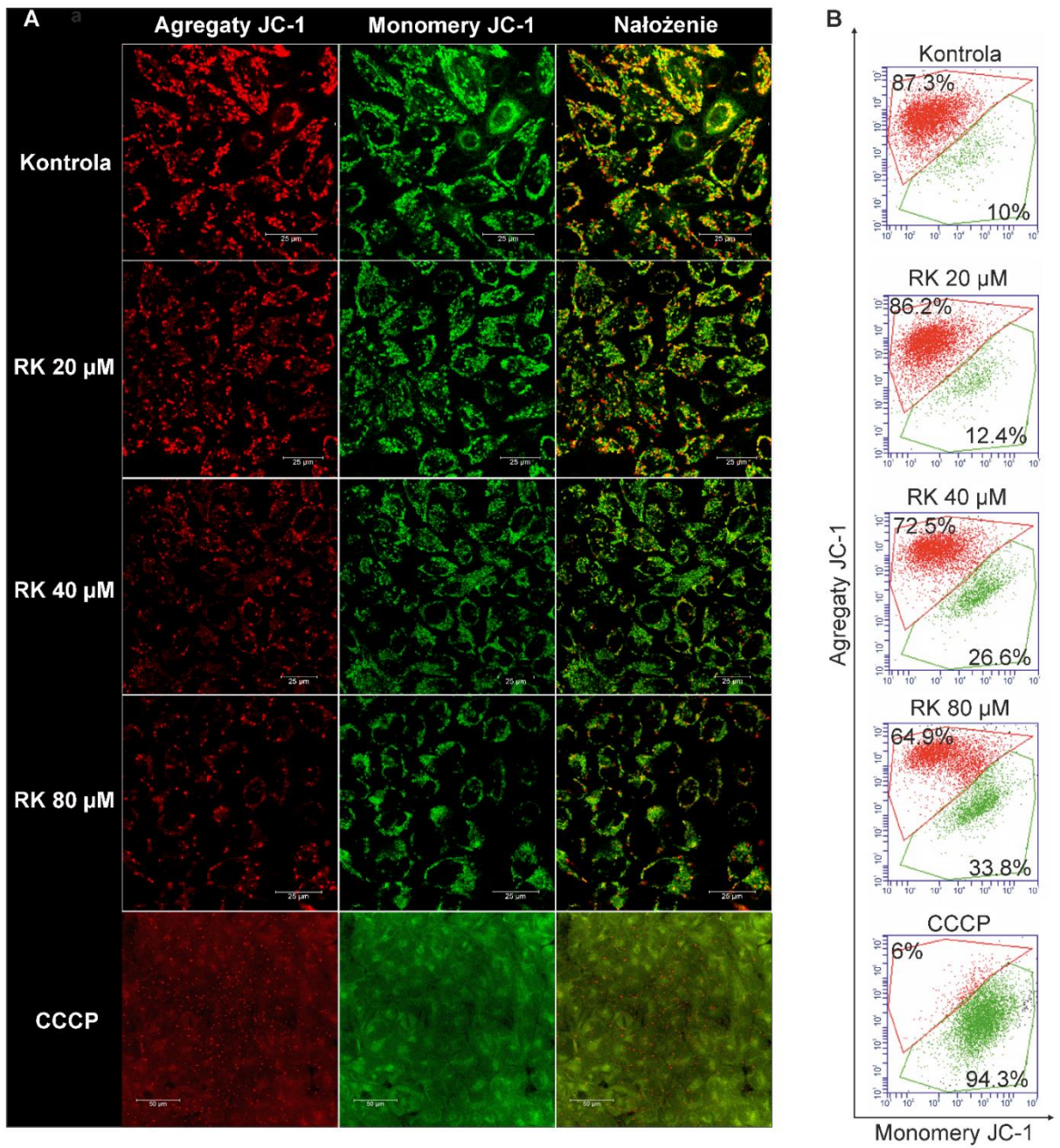
Potencjał błony mitochondrialnej (MMP,  $\Psi_m$ ) wskazuje na żywotność komórki, a jego obniżenie prowadzi do apoptozy. Zbadano wpływ RK na zmiany mitochondrialnego stanu redoks komórek HepG2 rosnących w podłożu galaktozowym po 6 i 24 h (pożywka zawierająca glukozę) inkubacji ze związkiem (**Rys. 13**). Komórki barwiono JC-1, a zmiany  $\Psi_m$  analizowano równolegle za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej (**Rys. 13A-C**). Komórki nietraktowane wykorzystano jako kontrolę pozytywną, a CCCP (m-chlorofenylodhydrazon cyjanku karbonylu) użyto do stworzenia silnej, pojedynczej pozytywnej kontroli zielonej fluorescencji. Komórki z wysokim MMP promują tworzenie agregatów barwnika i emitują czerwoną fluorescencję. Komórki o niskim MMP zawierają więcej monomerów JC-1 i emitują zieloną fluorescencję (**Rys. 13A-C**). Depolaryzacja błony

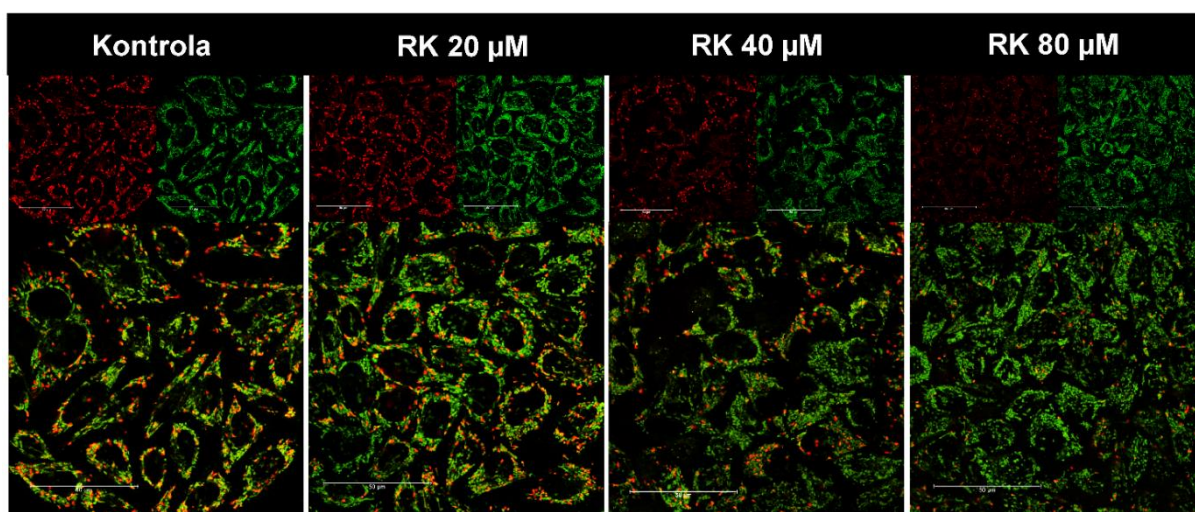
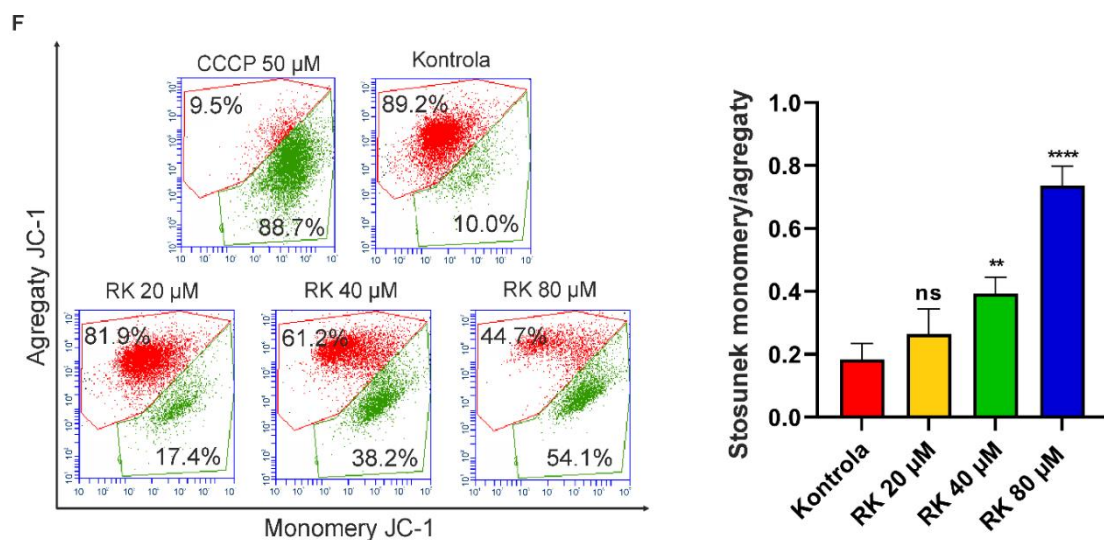
komórkowej wiąże się z degradacją mitochondriów i wzrostem intensywności zielonej fluorescencji. Dodanie RK prowadziło do zmniejszenia czerwonej fluorescencji emitowanej przez agregaty. Na tej podstawie oceniono stosunek monomerów do agregatów (535/595) (**Rys. 13C**). Im wyższa wartość tego stosunku, tym większa była obserwowana depolaryzacja błony. W komórkach HepG2 poddanych działaniu 80  $\mu$ M RK, stosunek ten wzrastał 4,5-krotnie w porównaniu z komórkami kontrolnymi (**Rys. 13B, C**). Ponadto, jednoczesne monitorowanie fluorescencji TMRE (w trybie niższego wygaszania) potwierdziło, że 6-godzinna inkubacja z RK spowodowała zmniejszenie MMP, wraz ze spadkiem intensywności fluorescencji o 75% w komórkach traktowanych 80  $\mu$ M RK (**Rys. 13D**) (tylko podłoże galaktozowe, ponieważ dla glukozy i sferoidów traktowanych RK, wyniki zostały przedstawione w części poświęconej metabolizmowi puryn).

W przypadku komórek HepG2 rosnących w pożywce zawierającej glukozę, stosunek monomerów do agregatów wzrósł prawie 4-krotnie dla 80  $\mu$ M stężenia RK, w porównaniu do komórek nietraktowanych. Podczas analizy mikroskopowej zaobserwowano również znaczący wzrost intensywności zielonej fluorescencji, pochodzącej od monomerów barwnika JC-1, co korelowało ze wzrastającym stężeniem rybozydu kinetyny (**Rys. 13F**).

Stosując metodę bioluminescencyjną do ilościowego oznaczania ATP, wykazano obniżenie poziomu ATP w komórkach HepG2 traktowanych RK (podłoże galaktozowe). Gwałtowny spadek poziomu ATP był wykrywalny w ciągu 2 h, i zmalał o ponad 56% w komórkach poddanych działaniu 80  $\mu$ M RK, podczas gdy najniższe stężenie nie miało żadnego wpływu. Wynik pokazuje zatem efekt dwóch najwyższych stężeń. Do eksperymentu, wybrano optymalne warunki czasowe, a wydłużenie czasu inkubacji nie spowodowało większego wyczerpania poziomu ATP. Łącznie dane te sugerują, że szybkie i wyraźne wyczerpanie ATP jest wczesną konsekwencją ekspozycji na RK i prowadzi do utraty żywotności komórek (**Rys. 13E**).







**Rysunek 13: Status bioenergetyczny komórek HepG2 rosnących w podłożu galaktozowym i glukozowym po zastosowaniu RK.** Komórki HepG2 traktowano RK przez 6 i 24 h, a zmiany  $\Psi_m$  analizowano przy użyciu wrażliwego na potencjał błony mitochondrialnej (MMP) kationowego barwnika JC-1. Analiza mikroskopii konfokalnej (A) i cytometrii przepływowej (B) ujawniła dwie populacje komórek o wysokim (czerwony) i niskim (zielony)  $\Psi_m$ , które odpowiadają odpowiednio agregatom i monomerom barwnika. (C) Wykres słupkowy przedstawia stosunek monomerów JC-1 do agregatów w warunkach traktowania. (D) Jednoczesną analizę stanu redoks mitochondriów przeprowadzono za pomocą innego barwnika wrażliwego na zmiany  $\Psi_m$ -TMRE. Średnia intensywność fluorescencji została oszacowana i przedstawiona w postaci wykresu słupkowego  $\pm$  SD. (E) Komórkowy poziom ATP w komórkach HepG2 rosnących w podłożu galaktozowym i traktowanych RK. Spadek ATP oceniano po 2 h inkubacji z RK. (F) Analiza (cytometryczna i mikroskopowa- barwienie JC-1) potencjału błony mitochondrialnej dla komórek HepG2 hodowanych w pożywce zawierającej glukozę i traktowanych RK przez 24 h. Dane przedstawione są jako średnie  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna jest zaznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

#### ***4.2.5. RK zaburza parametry oksydacyjne w komórkach HepG2 rosnących w pożywce zawierającej galaktozę lub glukozę***

W kolejnym kroku przeanalizowano produkcję reaktywnych form tlenu (RFT), aby potwierdzić, czy ich patologiczny poziom zaburza fizjologiczny stan komórek, poprzez uszkodzenie białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Cytoplazmatyczne RFT były mierzone za pomocą barwnika- diaoctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCFDA), przy użyciu cytometrii przepływowej (**Rys. 14A**). Analiza komórek HepG2 rosnących w podłożu galaktozowym i traktowanych przez 6 h wzrastającymi stężeniami RK wykazała wzrost fluorescencji emitowanej przez utleniony barwnik do 37% przy najwyższym stężeniu RK, odzwierciedlając w ten sposób indukcję stresu oksydacyjnego. Wyniki te silnie sugerują, że stres oksydacyjny indukowany przez RK może wywoływać apoptozę komórek (**Rys. 14A**). Zaobserwowano również, że zastosowanie RK pociąga za sobą obniżenie całkowitej zawartości GSH (glutation), który jest naturalnym składnikiem systemu obrony antyoksydacyjnej. Spadek stężenia GSH w komórkach (o 30% w porównaniu z komórkami kontrolnymi) został zmierzony za pomocą barwienia niefluorescencyjnym barwnikiem Thiolite Green (**Rys. 14B**). W przypadku komórek rosnących w podłożu zawierającym glukozę, wynik zostanie zaprezentowany w kolejnej części poświęconej indukcji stresu oksydacyjnego pod wpływem rybozydu kinetyny.

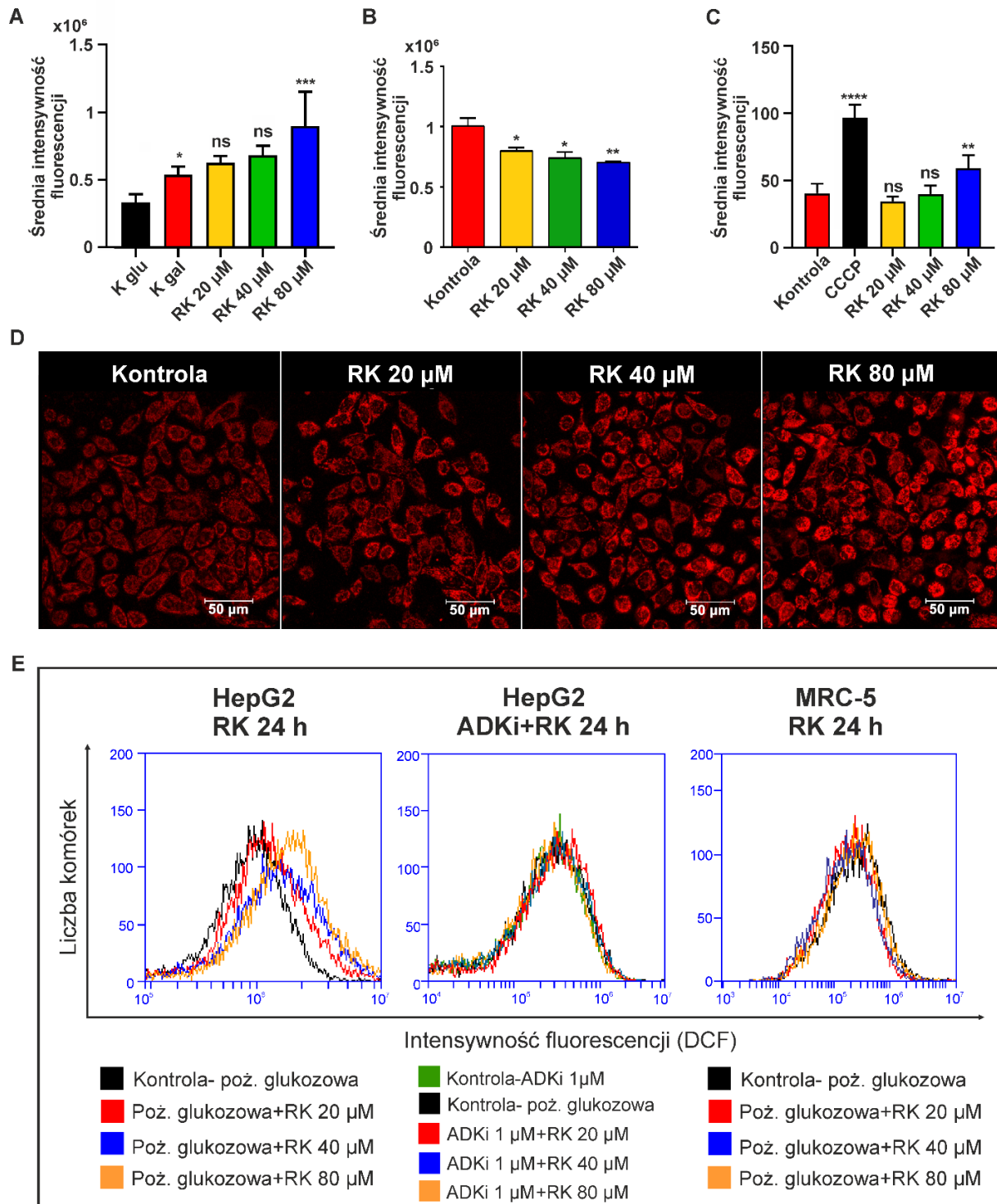
Ponadto, te same eksperymenty zostały przeprowadzone dla komórek HepG2 hodowanych w podłożu zawierającym glukozę, traktowanych tylko RK lub RK w obecności inhibitora ADK oraz dla komórek fibroblastów MRC-5. Wyniki jednoznacznie wskazują, że RK w pożywce z glukozą powoduje wzrost RFT w podobnym stosunku jak w przypadku komórek metabolizujących na drodze OXPHOS (równoznaczne ze wzrostem intensywności fluorescencji barwnika). Po raz kolejny potwierdzono, że do pełnej aktywności i toksyczności, niezbędny jest proces fosforylacji RK przez kinazę adenozy. Jej inhibicja spowodowała brak stresu oksydacyjnego indukowanego przez RK, co również obserwowane jest w przypadku komórek nienowotworowych MRC-5 i może świadczyć o selektywnym działaniu związku (intensywność fluorescencji na poziomie komórek nietraktowanych) (**Rys. 14E**).

Dodatkowo przeanalizowano indukcję mitochondrialnego stresu oksydacyjnego, powstałego w wyniku działania RK w komórkach HepG2 za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej (barwienie MitoSOX). Czerwona fluorescencja tego barwnika jest wyzwalana selektywnie w mitochondriach w obecności nadtlenu. Analiza

wykazała, że RK w stężeniu 80  $\mu\text{M}$  indukuje produkcję nadtlenu w komórkach (obserwowano wzrost intensywności fluorescencji o około 32% w porównaniu z komórkami nietraktowanymi, co odzwierciedlało wzrost mitochondrialnego stresu oksydacyjnego), natomiast efekt ten nie był widoczny przy niższym stężeniu (**Rys. 14C, D**).

W przypadku komórek hodowanych w obecności glukozy, efekt RK na indukcję mitochondrialnego stresu oksydacyjnego zostanie opisany poniżej na przykładzie sferoidów komórek HepG2 oraz w kolejnej części, obejmującej bardziej szczegółową analizę tego zagadnienia.





**Rysunek 14: Wymuszona galaktozą OXPPOS nasila deregulację statusu oksydacyjnego komórek traktowanych RK.** Produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) analizowano po traktowaniu komórek HepG2 hodowanych z RK (6 h) w podłożu galaktozowym. **(A)** W celu wykrycia wewnątrzkomórkowych RFT, komórki barwiono H<sub>2</sub>DCFDA, a intensywność fluorescencji mierzono za pomocą cytometrii przepływowej. Dane są przedstawione jako wykres słupkowy z trzech niezależnych eksperymentów (średnia ± SD). **(B)** Poziom komórkowego GSH był mierzony przez barwienie niefluorescencyjnym barwnikiem Thiolite™ Green, który staje się silnie fluorescencyjny po reakcji z tiolami. Przesunięcie intensywności fluorescencji jest przedstawione

na wykresie słupkowym z trzech niezależnych eksperymentów (średnia  $\pm$  SD). (C) Cytometria przepływowa i (D) mikroskopia konfokalna pokazały indukcję mitochondrialnego stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2 po stosowaniu RK. Zmiana intensywności fluorescencji jest przedstawiona jako reprezentatywny histogram z trzech niezależnych eksperymentów i wykreślona na wykresie słupkowym (średnia  $\pm$  SD). Istotność statystyczna jest zaznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  (E) Porównawcza analiza cytometryczna indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach HepG2 rosnących w podłożu zawierającym glukozę, traktowanych RK lub RK przy jednoczesnym zastosowaniu inhibitora kinazy adenozyliny oraz w komórkach MRC-5 inkubowanych z RK. Wynik przedstawiony za pomocą reprezentatywnych histogramów.

\*\*\*

*Zamiana glukozy na galaktozę w pożywce hodowlanej, umożliwiła wykazanie i potwierdzenie wpływu RK na mitochondria, dlatego też pozostałe eksperymenty zostały wykonane z wykorzystaniem komórek hodowanych wyłącznie w glukozie. Analizy te były bardziej szczegółowe, dlatego też znacznie łatwiej bazować na jednym rodzaju medium hodowlanego bez konieczności jego wymiany.*

#### **4.2.6. Rybozyd kinetyny indukuje autofagię oraz mitofagię, zaburzając gospodarkę wapnia, funkcje łańcucha oddechowego i utrzymanie odpowiedniego poziomu NAD**

Autofagia jest procesem zachodzącym w komórkach eukariotycznych, zaangażowanym w utrzymanie homeostazy komórkowej i przetrwanie w warunkach zarówno fizjologicznych jak i stresowych.

Autofagia odgrywa ważną rolę w homeostazie komórkowej i patogenezie chorób, a także jest jedną z przyczyn zahamowania wzrostu komórek. Dzięki temu procesowi składniki cytozolu i organella są dostarczane do lizosomów w celu ich degradacji. Małe cząsteczki chemiczne, które mają zdolność modulowania autofagii mogą mieć wartość farmakologiczną w leczeniu różnych chorób, w tym nowotworów. Stosując cytometrię przepływową i barwnik Green Detection Reagent, który specyficznie znakuje autofagosomy, wykazano wpływ rybozydu kinetyny na indukcję procesu autofagii w komórkach HepG2. W celu silnej aktywacji pozytywnego sygnału autofagii, komórki HepG2 inkubowano z rapamycyną, silnym inhibitorem mTOR [224].

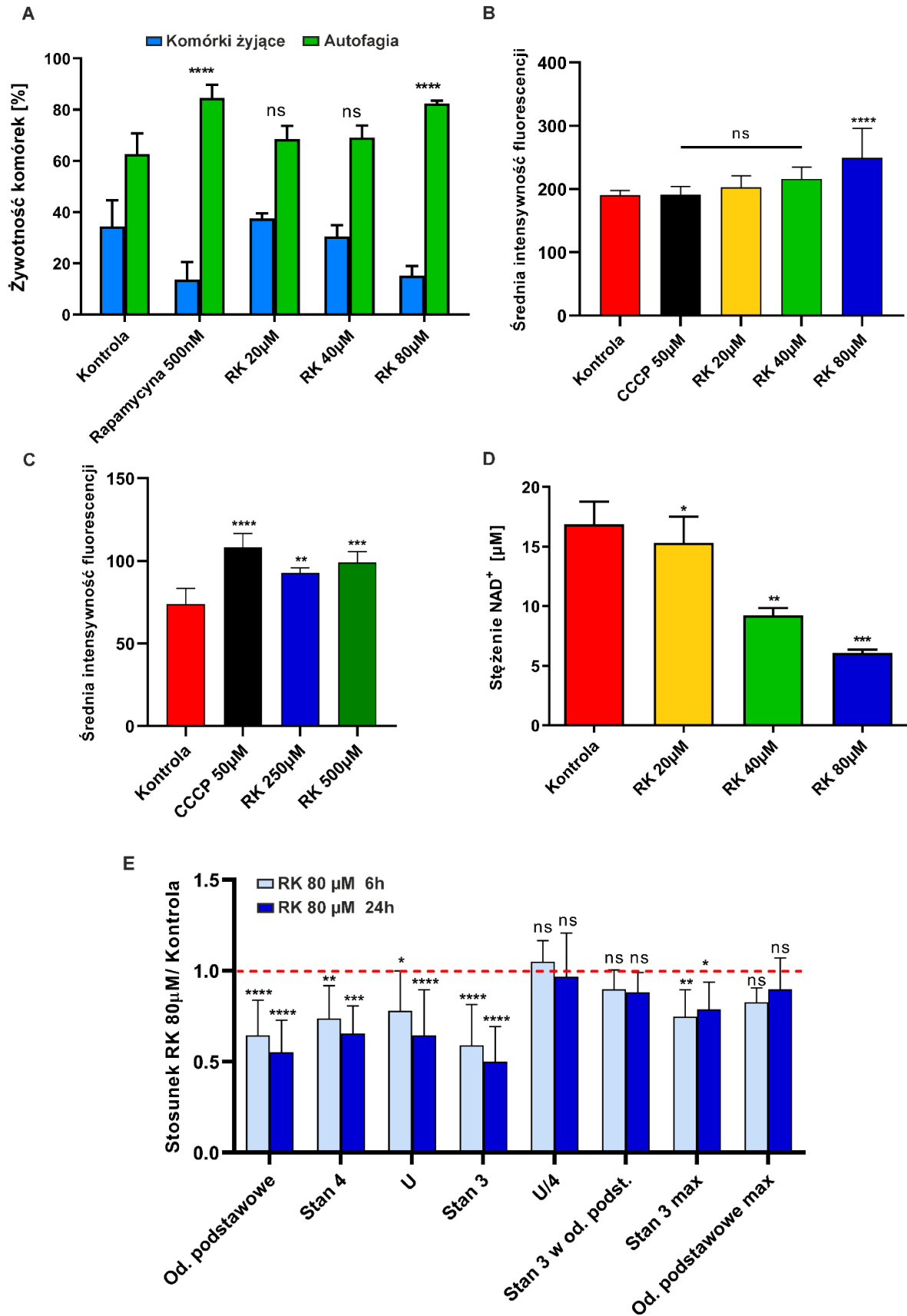
W badaniu wykazano, że RK w najwyższym stężeniu, tj. 80  $\mu$ M, jest aktywatorem autofagii (**Rys. 15A**), ponieważ spowodował wzrost fluorescencji barwnika o ponad 20% (na tym samym poziomie co rapamycyna) w porównaniu z kontrolą. Niższe stężenia rybozydu kinetyny również przyczyniły się do aktywacji tego procesu komórkowego i był to wzrost rzędu kilkunastu procent (**Rys. 15A**). Autofagia zwykle poprzedza apoptozę lub zachodzi

razem z nią. Stwierdzono, że RK testowany jako mediator, może promować lub hamować apoptozę komórek HepG2 w ich wyższych stężeniach lub przy wydłużonym czasie inkubacji.

Ponadto, mając na uwadze, że RK zaburza funkcjonowanie mitochondriów, zbadano również jego wpływ na indukcję selektywnej autofagii, tj. mitofagii. W tym celu również zastosowano cytometrię przepływową i specyficzne barwienie, które wykazało, że RK w stężeniu 80  $\mu\text{M}$  spowodował w 1,2-krotny wzrost fluorescencji w porównaniu z komórkami kontrolnymi, co koreluje z indukcją mitofagii. W przypadku niższych stężeń rybozydu kinetyny stwierdzono, że intensywność fluorescencji znajduje się na poziomie kontroli, nie mając wpływu na indukcję procesu (**Rys. 15B**). Następnie badano wpływ RK na gospodarkę komórkową wapnia (**Rys. 15C**) i wykazano, że RK powoduje deregulację jego poziomu, co prowadzi do wzrostu wapnia wewnątrzkomórkowego. Ze względu na to, że jest to proces dynamiczny, zastosowano znacznie wyższe stężenia RK (250 i 500  $\mu\text{M}$ , te same wykorzystane podczas badania aktywacji purynosomów), które umożliwiły przeprowadzenie analizy cytometrycznej w znacznie szybszym czasie, tj. po 3 h od indukcji związku. Wykazano, że oba stężenia RK powodują wzrost poziomu uwalnianego wapnia, co koreluje ze wzrostem fluorescencji barwnika. W przypadku wyższego stężenia wzrost wynosił ok. 57%, z kolei niższe stężenie RK spowodowało wzrost fluorescencji o prawie 44% w porównaniu z komórkami nietraktowanymi związkiem (**Rys. 15C**). Może mieć to ścisły związek z generacją RFT oraz indukcją apoptozy w komórkach HepG2, a także z hamowaniem kanałów wymiany sodowo-wapniowej.

Ponadto, stosując test kolorymetryczny, zaobserwowano 64% spadek utlenionej formy dinukleotydu nikotynamidowo-adeninowego ( $\text{NAD}^+$ ) w komórkach HepG2 po traktowaniu 80  $\mu\text{M}$  RK. Utrzymanie odpowiedniego poziomu  $\text{NAD}^+$  jest niezbędne do zachowania prawidłowej funkcji oddechowej komórki i modulacji komórkowego statusu redoks (**Rys. 15D**).

Określono także status energetyczny komórek HepG2 traktowanych rybozydem kinetyny, poprzez pomiar respiracji komórkowej, przy użyciu elektrody tlenowej typu Clarka. W komórkach traktowanych 80  $\mu\text{M}$  RK przez 6 i 24 h, w wyniku działania uwalniającego łańcuch oddechowy, tempo zużycia tlenu uległo spowolnieniu, a tym samym oddychanie mitochondrialne. W stanie 3 (stan oddechowy związany z syntezą ATP) uwolnienie to było najbardziej widoczne. Jednocześnie parametry dotyczące sprzężenia nie uległy zmianie. Może to być związane z obniżeniem zapotrzebowania na ATP lub z brakiem aktywności syntazy ATP (**Rys. 15E**).

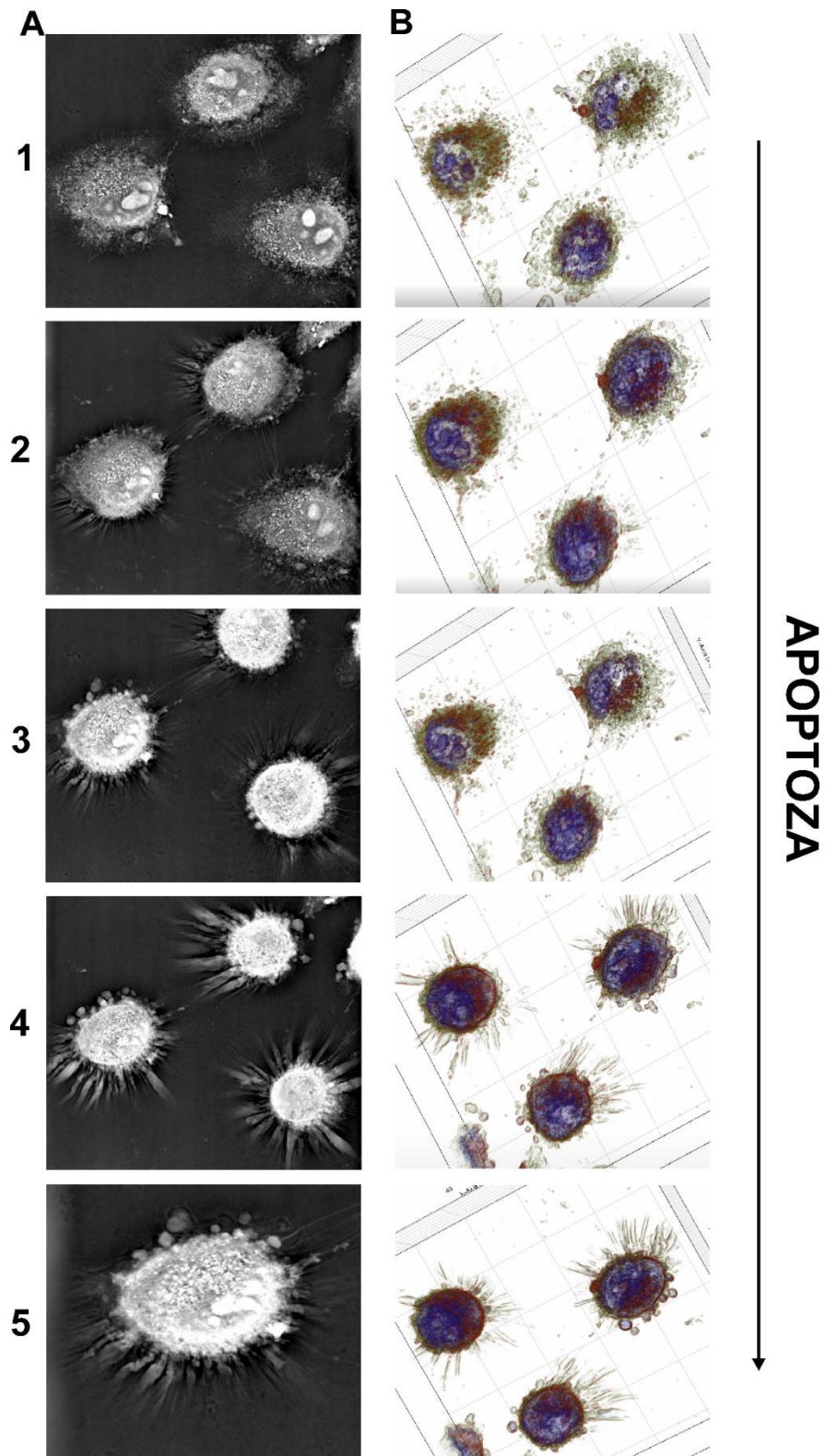


Rysunek 15: RK indukuje autofagię, mitofagię i wpływa na funkcjonowanie łańcucha oddechowego oraz gospodarkę wapnia. (A) Indukcję autofagii oraz (B) mitofagii analizowano po traktowaniu komórek HepG2



RK (24 h) hodowanych w podłożu glukozowym. W celu detekcji obu procesów, komórki barwiono dedykowanymi barwnikami, a intensywność fluorescencji mierzono za pomocą cytometrii przepływowej. Dane są przedstawione jako wykresy słupkowe z trzech niezależnych eksperymentów (średnia  $\pm$  SD) oraz reprezentatywne histogramy. **(C)** Poziom wewnątrzkomórkowego wapnia był mierzony przez barwienie niefluorescencyjnym barwnikiem rhod-2 AM, który staje się silnie fluorescencyjny w wyniku reakcji polegającej na redukcji rhod-2 AM do dihydrohod-2 AM. Przesunięcie intensywności fluorescencji jest przedstawione na wykresie słupkowym z trzech niezależnych eksperymentów (średnia  $\pm$  SD). **(D)** Oznaczenie stanu oddechowego związanego z fosforylacją oksydacyjną (stan 3) komórek HepG2 po zastosowaniu RK, przy użyciu systemu Oxygraph+. **(E)** Poziom utlenionej formy dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NAD<sup>+</sup>) w komórkach HepG2 po traktowaniu RK oceniano kolorymetrycznie, za pomocą czytnika płytek. Analiza komórek HepG2 traktowanych RK wykazała obniżenie poziomu NAD<sup>+</sup>. Utrzymanie odpowiedniego poziomu NAD jest niezbędne do zapewnienia prawidłowej funkcji oddechowej komórek oraz modulacji ich statusu redoks. Zmiana intensywności fluorescencji jest przedstawiona jako reprezentatywny histogram z trzech niezależnych eksperymentów i wykreślona na wykresie słupkowym (średnia  $\pm$  SD). Istotność statystyczna jest zaznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Dodatkowo przeprowadzono wizualizację indukcji apoptozy przez RK i w czasie rzeczywistym rejestrowano ten proces za pomocą holotomografu. Po kilkunastu minutach od indukcji związku zaobserwowano rozpad komórek HepG2 i tworzenie się, charakterystycznych dla procesu apoptozy, ciałek apoptotycznych, zawierających między innymi fragmenty cytoplazmy organelli **(Rys. 16)**.



**Rysunek 16:** (A) Apoptoza/nekroza komórek HepG2 inkubowanych z RK, obserwowana w czasie rzeczywistym za pomocą holotomografu Nanolive. Na zdjęciu nr 5 widoczne już uformowane ciała apoptotyczne. (B) Proces apoptozy komórek HepG2 zeskanowany za pomocą holotomografu Nanolive, a następnie „cyfrowo wybarwiony” w programie STEVE.

#### 4.2.7. Wpływ rybozydu kinetyny na żywotność sferoidów komórek HepG2

Dodatkowa wymiarowość kultur komórkowych (formowanie sferoidów), pozwala na lepszą imitację naturalnego środowiska tkanki nowotworowej. Daje to możliwość interakcji komórek z innymi otaczającymi je komórkami, a także mikrośrodowiskiem, w którym komórki rosną. Sferoidy zawierają komórki w różnych stadiach zaawansowania, zorganizowane są w kilku warstwach, co sprawia, że komórki w hodowlach 3D proliferują wolniej niż komórki rosnące w monowarstwie. Wykazują inną odpowiedź na podane związki, dlatego są lepsze do analizy skuteczności działania leków przeciwnowotworowych lub innych substancji o potencjalnym charakterze leczniczym. Dlatego też zostały one wykorzystane do zbadania odpowiedzi na RK i skuteczności jego działania.

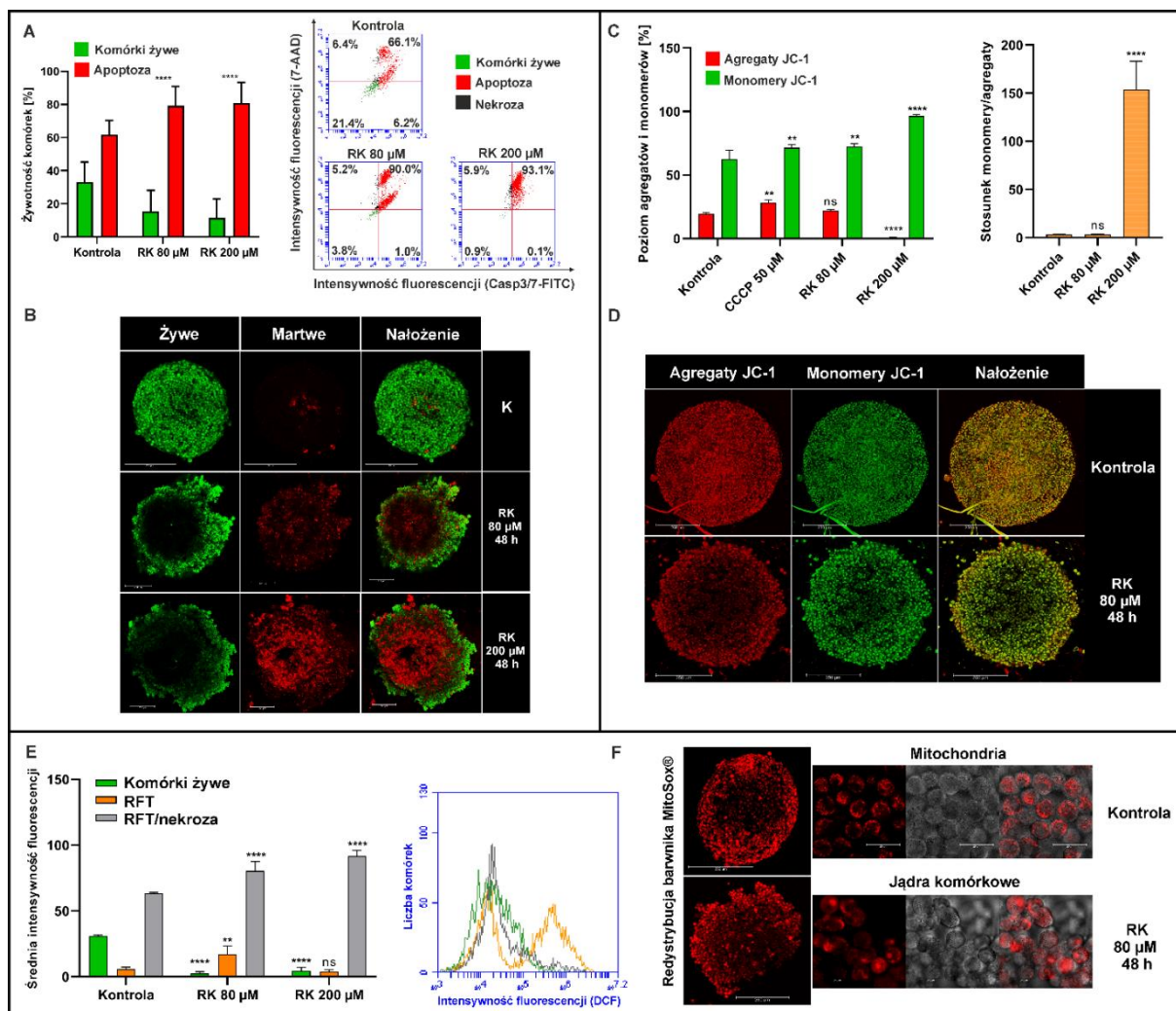
Poziom apoptozy/nekrozy zbadano poprzez zastosowanie cytometrii przepływowej i wykazano, że proapoptotyczny efekt działania RK zależny był od jego stężenia. Żywotność komórek traktowanych 80 i 200  $\mu\text{M}$  RK spadła z poziomu 45,1% odpowiednio do 27,2% i 22,2%. Procentowy stosunek komórek na różnych etapach apoptozy różni się znacząco od tego w hodowlach 2D, ze względu na inną strukturę sferoidu, a także wychwyt RK przez komórki. Większa część sferoidu składa się z komórek w fazie spoczynku lub słabo proliferujących, dlatego na wykresie obserwowano więcej komórek będących w tzw. późnej apoptozie niż we wczesnej. Poziom całkowitej apoptozy wzrósł z 26,94% do 35,06% (**Rys. 17A**). Ponadto, za pomocą analizy LIVE/DEAD, zaobserwowano zahamowanie proliferacji komórek oraz pęknięcie zewnętrznej warstwy sferoidów. Zaobserwowano również wzrost w intensywności czerwonej fluorescencji barwnika w wyniku działania RK (**Rys. 17B**).

Zmiany potencjału błony mitochondrialnej sferoidów HepG2 sprawdzono za pomocą cytometrii przepływowej, stosując zarówno barwnik JC-1. Dodanie RK prowadziło do zmniejszenia czerwonej fluorescencji emitowanej przez agregaty. Na tej podstawie oceniono stosunek monomerów do agregatów (535/595) (**Rys. 17C**). Im wyższa wartość tego stosunku, tym większa była obserwowana depolaryzacja błony. W sferoidach komórek HepG2 poddanych działaniu 80 i 200  $\mu\text{M}$  RK, procentowy udział monomerów wzrósł odpowiednio o ok. 63% i 75%, w porównaniu z komórkami kontrolnymi (**Rys. 17C**). Ten sam efekt obserwowano podczas wizualizacji sferoidów za pomocą mikroskopii konfokalnej dla 80  $\mu\text{M}$  RK, wyższe stężenie spowodowało rozpad sferoidu (**Rys. 17D**).

Na koniec przeanalizowano wpływ RK na produkcję RFT w komórkach sferoidów HepG2. W tym celu wykorzystano standardowy barwnik  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ .

Histogramy uzyskane w wyniku tej analizy, ilustrują przesunięcia wynikające z reakcji sferoidów na wzrastające stężenia rybozydu kinetyny. Rozkład linii histogramów jest inny niż obserwowany byłby w przypadku komórek 2D. W kontekście sferoidów, złożonych z dużej liczby komórek nekrotycznych, poziom „nekrotycznych RFT” jest znacznie podwyższony. Najwyższe stężenie RK silnie uszkadza komórki, prowadząc do nekrozy i wysokiej generacji RFT. Barwnik ten wybarwia jednak tylko żywe komórki, dlatego histogram przedstawia produkcję RFT w komórkach, które pozostały żywe. Tak więc, 80  $\mu\text{M}$  RK może wydawać się bardziej cytotoksyczny, choć w rzeczywistości to wyższe jego stężenie (200  $\mu\text{M}$ ) powoduje większe uszkodzenia komórek (**Rys. 17E**).

W przypadku zastosowania drugiego barwnika MitoSOX, zastosowano stężenie 80  $\mu\text{M}$  i wynik pokazano po 48 h inkubacji. Sferoidy nie uległy jeszcze rozpadowi (stąd niższe stężenie) i możliwa była zaobserwowanie redystrybucji fluorescencji do jąder komórkowych. Jest to wynik uszkodzenia mitochondriów i związanego z tym uwalniania znacznika fluorescencyjnego. Nie zaobserwowano tego w komórkach sferoidów nietraktowanych RK (**Rys. 17F**).



**Rysunek 17: Efekt RK na żywotność sferoidów HepG2.** (A) Poziom apoptozy oceniano w sferoidach HepG2 przez podwójne barwienie Casp 3/7-FITC/7-AAD. Zastosowano dwa stężenia związku (stężenia 80 i 200  $\mu$ M) i sprawdzano skuteczność jego działania po 24 i 48 h od podania. Odsetek żywych i apoptotycznych komórek po 24 h inkubacji z RK w różnych stężeniach przedstawiono na wykresie słupkowym. (A) Zielone słupki oznaczają żywe komórki, podczas gdy czerwone słupki reprezentują zarówno wczesne, jak i późne komórki apoptotyczne. Dystrybucję populacji komórek przedstawiono także za pomocą reprezentatywnego wykresu cytometrycznego, gdzie wczesne apoptotyczne komórki znajdują się w prawym dolnym kwadrancie wykresu, późne apoptotyczne w prawym górnym a żywe komórki – w lewym dolnym kwadrancie. (B) Wizualizacja mikroskopowa żywotności sferoidów HepG2 w po traktowaniu RK (24 i 48 h) przy użyciu testu LIVE/DEAD Assay (Thermo Fisher Scientific). Zielona (ex/em: 490/505-550 nm) i czerwona fluorescencja (ex/em: 530/600-660 nm) odpowiadają odpowiednio żywym i martwym komórkom. (C, D) Status bioenergetyczny sferoidów HepG2 po zastosowaniu RK. Komórki HepG2 traktowano RK przez 24 i 48 h, a zmiany  $\Psi_m$  analizowano przy użyciu wrażliwego na potencjał błony mitochondrialnej (MMP) kationowego barwnika JC-1. (C) Analiza cytometrii przepływowej ujawniła dwie populacje komórek o wysokim (czerwony) i niskim (zielony) potencjale, które odpowiadają odpowiednio agregatom i monomerom barwnika. Wykres słupkowy przedstawia stosunek monomerów JC-1 do agregatów w warunkach traktowania. (D) Jednocześnie przeprowadzono analizę

mikroskopową z wykorzystaniem tego samego barwnika (**E, F**) Analiza indukcji stresu oksydacyjnego w sferoidach komórek HepG2. Detekcja cytoplazmatycznych RFT w sferoidach inkubowanych z RK (stężenia 80 i 200  $\mu$ M). Produkcja RFT była badana metodą cytometrii przepływowej z użyciem barwnika H<sub>2</sub>DCFDA i oceniono intensywność fluorescencji. Dane są przedstawione jako wykres słupkowy z trzech niezależnych eksperymentów i jako reprezentatywny histogram. (**F**) Analiza mikroskopowa indukcji stresu oksydacyjnego została przeprowadzona po 24 i 48 h traktowania sferoidów. Stres oksydacyjny wykazano za pomocą barwienia MitoSOX (ex/em: 510/570-600 nm). Wszystkie wyniki przedstawione są jako średnie  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna: (ns) nieistotne, (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

### 4.3. Wpływ rybozydu kinetyny na produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach glejaka wielopostaciowego

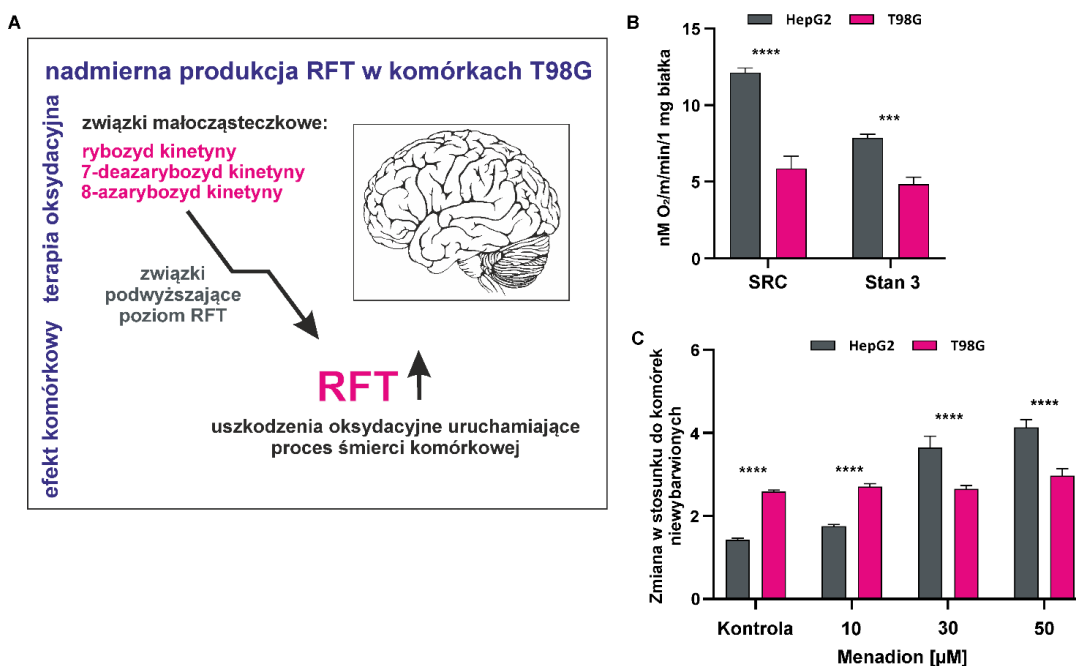
#### 4.2.8. *Związki małowcząsteczkowe jako element terapii oksydacyjnej w komórkach GBM: Profile metaboliczne i analiza porównawcza mitochondrialnych RFT w komórkach T98G vs. HepG2*

Badania wpływu RK na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych, przeprowadzono wykorzystując linię glejaka wielopostaciowego T98G. Biorąc pod uwagę, że w glejaku, mechanizmy komórkowe redoks są silnie zaburzone, a komórki GBM mają wysokie tempo metabolizmu i wytwarzają wysoki poziom RFT, to adaptacja metaboliczna w tych komórkach odgrywa istotną rolę w odporności komórek na śmierć, indukowaną stresem oksydacyjnym, co stanowiło dodatkowe wyzwanie w badaniu mechanizmu RK.

Komórkowy status redoks to równowaga pomiędzy dostarczaniem i zużyciem tlenu, oraz wydajnością tych procesów, co zapobiega uszkodzeniom oksydacyjnym komórek. Reaktywne formy tlenu (RFT) są stale wytwarzane podczas oddychania komórkowego i stymulują różne szlaki sygnałowe w komórkach nowotworowych [183]. Wiadomo też, że komórki glejaka wielopostaciowego (GBM), mają wysokie tempo metabolizmu i wytwarzają wysoki poziom RFT, co sprzyja progresji guza i oporności na leki. Najłatwiejszą metodą indukowania śmierci komórkowej w komórkach GBM jest osiągnięcie progu redoks i ominięcie mechanizmów obrony antyoksydacyjnej. W konsekwencji komórki stają się bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny (SO) wywołane przez czynniki zewnętrzne (**Rys. 18A**).

W badaniach testowano trzy analogi adenozyiny (w tym jeden naturalnie występujący-rybozyd kinetyny), które zwiększają poziom RFT w linii komórkowej T98G. Założono, że związki te mogą być obiecującą alternatywą w terapii oksydacyjnej, która koncentruje się na komórkowym środowisku redoks GBM i indukcji apoptozy (**Rys. 18**). W pierwszej kolejności, określono status energetyczny komórek HepG2 i T98G, poprzez pomiar respiracji komórkowej przy użyciu elektrody tlenowej typu Clarka. Tempo oddychania komórek HepG2 było znacznie wyższe niż komórek T98G, przekraczając 50% w oddychaniu podstawowym i osiągając prawie 80% w oddychaniu maksymalnym. Wyniki ujawniły, że komórki HepG2 miały o 62,5% bardziej intensywną fosforylację oksydacyjną (OXPHOS) i 106,8% większą rezerwę pojemności oddechowej mitochondriów niż komórki T98G (**Rys. 18B**). Wyniki te sugerują wyższą aktywność glikolityczną w komórkach T98G, w tym wyższy poziom beztlenowej produkcji ATP.

Mitochondria są jednym z głównych źródeł RFT, które generowane są przede wszystkim w postaci anionorodników ponadtlennokowych ( $O_2^{\cdot-}$ ), jako produkt uboczny metabolizmu oksydacyjnego, przyczyniający się do uszkodzenia mitochondriów [225]. Za pomocą cytometrii przepływowej (zastosowanie barwnika MitoSOX), przeprowadzono również porównawczą indukcję mitochondrialnego SO komórek T98G i HepG2, traktowanych menadionem, powszechnie stosowanym induktorem RFT. Fluorescencja tego czerwonego barwnika jest wyzwalana selektywnie w mitochondriach w obecności nadtlennków (**Rys. 18C**). Po 30 minutach traktowania wzrastającym stężeniem menadionu: 10, 30 i 50  $\mu\text{M}$ , analiza wykazała, że związek ten indukował produkcję nadtlennku w komórkach HepG2 i wpływał na nie w sposób istotny, z prawie trzykrotnym wzrostem poziomu produkcji RFT. Komórki T98G wykazywały zwiększony podstawowy poziom RFT bez zmian w przesunięciu fluorescencji po indukcji menadionem; może to być związane z opornością na leki i aktywacją antyoksydacyjnego mechanizmu obronnego przez komórki nowotworowe (**Rys. 18C**).



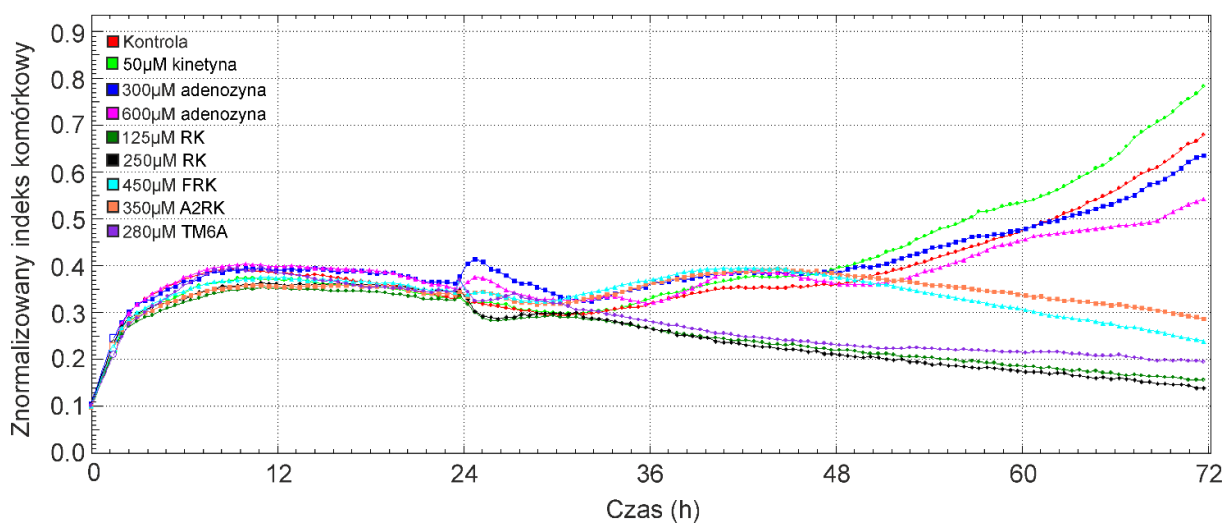
**Rysunek 18: Status tlenowy komórek glioblastoma (T98G) i komórek nowotworu wątrobowokomórkowego (HepG2).** (A) Zaangażowanie małych związków w terapię oksydacyjną komórek T98G. (B) Porównanie zapasowej pojemności oddechowej (SRC, ang. spare respiratory capacity) i stanu oddechowego związanego z fosforylacją oksydacyjną (stan 3) komórek T98G (szary) vs. komórek HepG2 (różowy) przy użyciu systemu Oxygraph+. (C) Cytometryczna analiza porównawcza indukcji mitochondrialnego stresu oksydacyjnego w komórkach T98G (szary) i HepG2 (różowy) po traktowaniu menadionem. Zmiana intensywności fluorescencji jest przedstawiona jako wykres słupkowy (średnia  $\pm$  SD) z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna jest zaznaczona gwiazdkami: (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .



#### 4.2.9. Poszukiwanie analogów RK wykazujących podobne powinowactwo do kinazy adenozynej (ADK)

Kolejny etap badań obejmował poszukiwania związków małowcząsteczkowych o bardziej selektywnych niż rybozyd kinetyny właściwościach przeciwnowotworowych w komórkach glejaka wielopostaciowego. W wyniku pierwszego dokowania molekularnego uzyskano pochodne posiadające modyfikacje zarówno w pierścieniu purynowym jak i w obrębie reszty cukrowej (np. rybozyd 2-aminokinetyny, N<sup>6</sup>-((Tien-2-ylo) metylo) -adenozyna, rybozyd 2-fluorokinetyny, arabinozyd kinetyny, N<sup>6</sup>-((Furan-3-ylo) metylo) -adenozyna).

W reakcji *in vitro* oceniono poziom fosforylacji rybozydu kinetyny (RK) i jego pochodnych przez kinazę adenozynej (ADK) (wyniki niepokazane), a z wykorzystaniem systemu XCelligence oceniono, które związki są najskuteczniejszymi inhibitorami proliferacji tych komórek (**Rys. 19**). Żadna z zaproponowanych pochodnych nie wykazywała silniejszego efektu działania na komórki nowotworowe w porównaniu do RK, dlatego przeprowadzone zostało kolejne dokowanie molekularne z wykorzystaniem innego programu oraz modelowania homologicznego (zastosowanie formy półotwartej kinazy adenozynej).

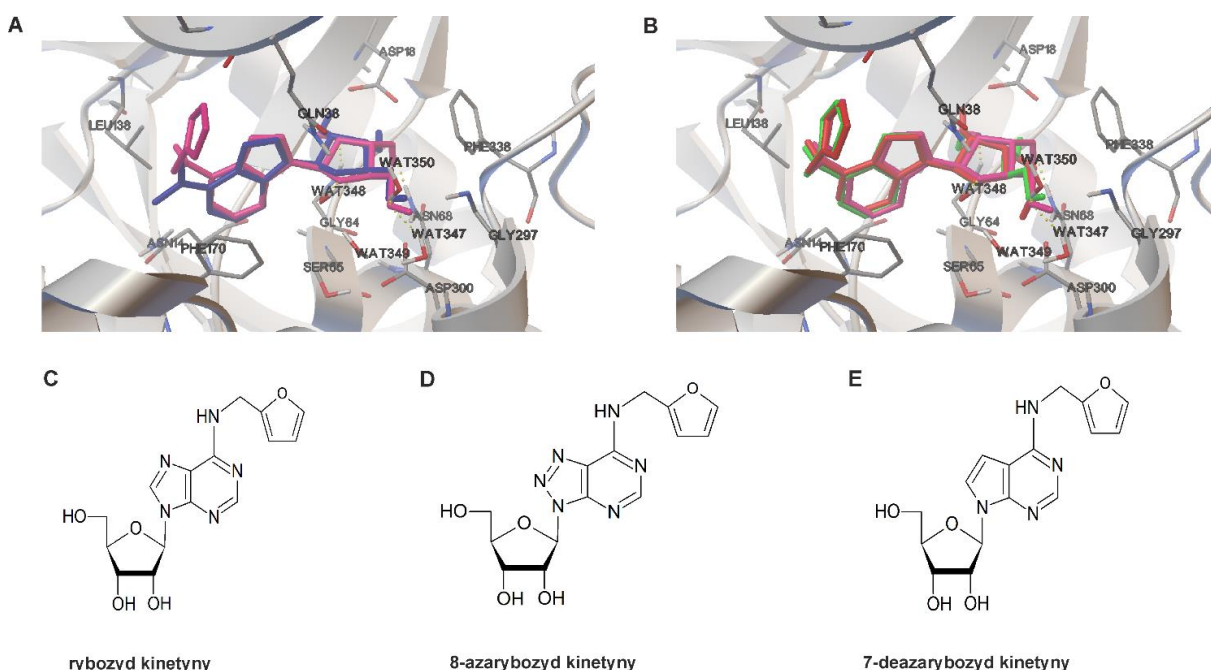


**Rysunek 19: Proliferacja komórek T98G w czasie rzeczywistym w obecności RK i jego pochodnych. W**

wyniku pierwszego dokowania molekularnego uzyskano pochodne posiadające modyfikacje zarówno w pierścieniu purynowym jak i w obrębie reszty cukrowej. Wpływ RK, FRK (rybozyd 2-fluorokinetyny), A2RK (arabinozyd kinetyny), TM6A (N<sup>6</sup>-((Tien-2-ylo) metylo) -adenozyna) oraz dwóch związków kontrolnych, tj. adenozyiny i kinetyny (zastosowane stężenia odpowiadają wartościom IC<sub>50</sub> badanych związków) na proliferację komórek T98G, monitorowano za pomocą systemu xCELLigence przez 72 h w odstępach 30 min. Wyniki są reprezentatywne dla co najmniej trzech niezależnych eksperymentów.

Oszacowana energia wiązania, obliczona przez program AutoDock Vina dla liganda referencyjnego dimetyloadenozyny, pochodząca ze struktury krystalicznej ADK (*Toxoplasma gondii*; 2A9Y), wynosiła -9,4 vs -9,2 dla RK. Oba konformery były dobrze nałożone na siebie z zachowaniem wszystkich kluczowych oddziaływań białko-ligand (**Rys. 20A**). Można więc przypuszczać, że obecność grupy N<sup>6</sup>-furfurylowej w RK nie osłabia zdolności cząsteczki do przyjęcia właściwej konformacji i zmieszczenia się w miejscu wiązania. Ponadto, wyniki dokowania sugerują, że grupa N<sup>6</sup>-furfurylowa w RK może tworzyć dodatkowe hydrofobowe oddziaływanie z łańcuchem bocznym Leu138.

Spośród analizowanych związków, dwa z nich, tj. 8-azarybozyd kinetyny (8-azaRK) i 7-deazarybozyd kinetyny (7-deazaRK), wykazały wysokie dopasowanie do miejsca aktywnego modelowanej struktury ADK (**Rys. 20B**). Ponadto, przewidywano też, że dodatkowy atom azotu w 8-azaRK będzie tworzył dodatkowe polarne oddziaływania z łańcuchami bocznymi Cys123 i Gln38. Szacowane energie wiązania obliczone przez AutoDock Vina dla obu pochodnych, były niższe niż dla RK, z wartościami -9,6 i -9,3 odpowiednio dla 8-azaRK i 7-deazaRK, co wskazuje, że te dwie pochodne RK mogą mieć podobne powinowactwo do ADK jak sam RK. Pochodne RK otrzymano zgodnie z wcześniej opisaną procedurą syntezy w publikacji [215] (**Rys. 20C-E**).



**Rysunek 20: Wyznaczenie analogów rybozydu kinetyny charakteryzujących się podobnym powinowactwem do kinazy adenozyny. (A)** Zestawienie zadokowanych pozycji RK (różowy) i liganda referencyjnego dimetyloadenozyny (niebieski) w miejscu wiązania modelowanej, półotwartej konformacji

struktury ludzkiej ADK, przedstawionej za pomocą wstążek. Wiązania wodorowe przedstawione są jako żółte przerywane linie. Reszty pozostające w bliskim kontakcie z ligandami pokazane są jako pałeczki. **(B)** Zestawienie zadokowanych pozycji RK (różowy), 8-azaRK (czerwony) i 7-deazaRK (zielony) w miejscu wiązania modelowanej półotwartej konformacji struktury ludzkiego ADK, reprezentowanej przez wstążki. Wiązania wodorowe są przedstawione jako żółte przerywane linie. Reszty pozostające w bliskim kontakcie z ligandami pokazane są jako pałeczki. **(C-E)** Struktura rybozydu kinetyny i jego dwóch pochodnych, 8-azaRK i 7-deazaRK, o podobnym powinowactwie wiązania do ludzkiej ADK.

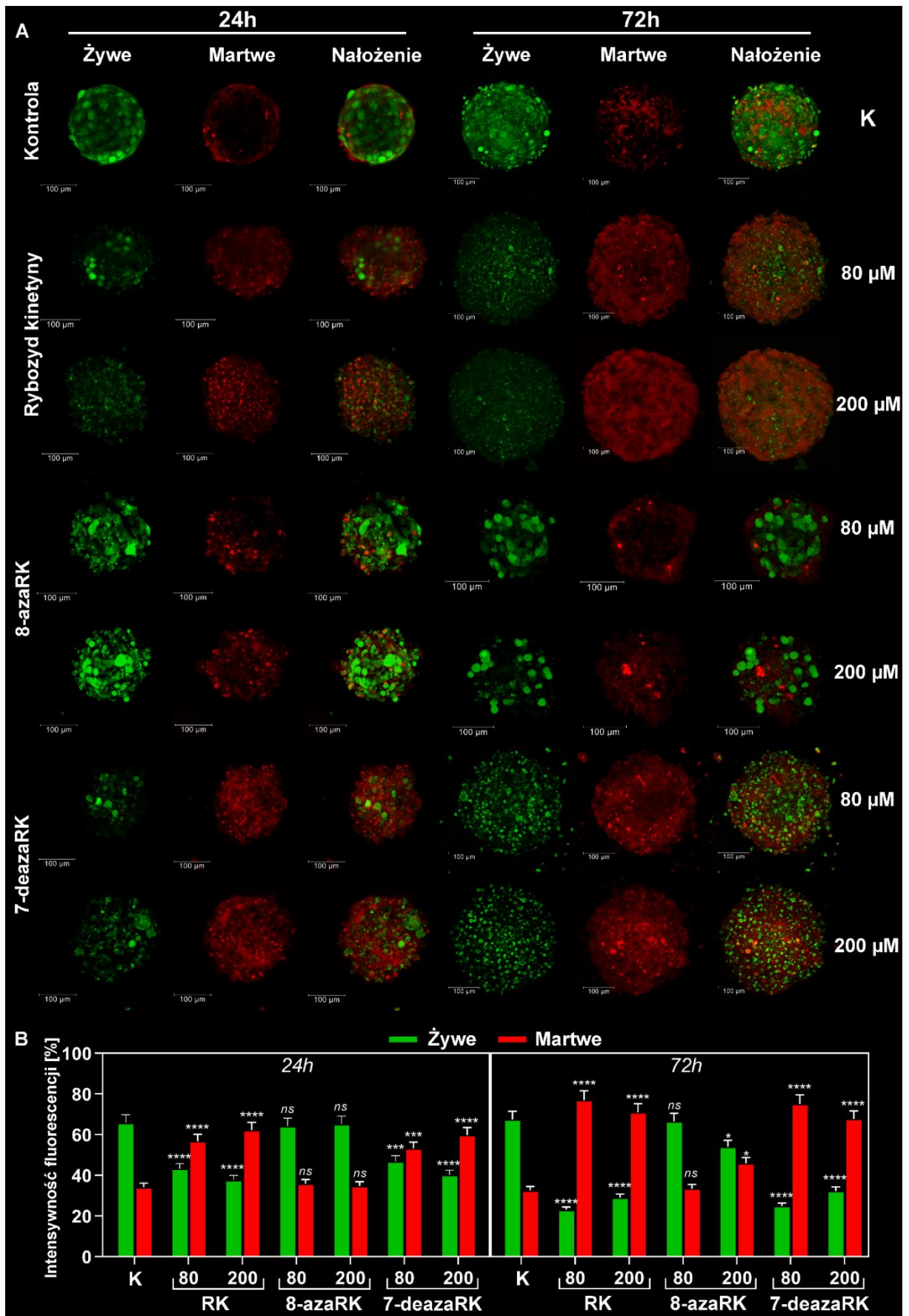
#### 4.2.10. Wpływ RK, 8-azaRK i 7-deazaRK na żywotność sferoidów komórek T98G

Kultury komórkowe 3D (sferoidy) komórek T98G, które mimikują mikrośrodowisko zewnątrzkomórkowe guza, zostały użyte do uzyskania bardziej precyzyjnej oceny związków, ich aktywności *in vivo* i stanowiły pierwszy krok do selekcji pochodnych RK. Żywotność komórek w sferoidach analizowano przy użyciu barwienia LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit za pomocą mikroskopii konfokalnej **(Rys. 21A)**, a następnie oceniano intensywność fluorescencji **(Rys. 21B)**. Barwienie z wykorzystaniem homodimeru etydyny-1 było używane do wskazania utraty integralności błony komórkowej (czerwona fluorescencja), podczas gdy fluorescencja kalceiny AM wykazywała obecność żywych komórek (zielona fluorescencja). Dzięki temu, zbadano rozmieszczenie żywych i martwych komórek po podaniu 80 i 200  $\mu\text{M}$  RK, 8-azaRK i 7-deazaRK, a wyniki wykazały, że wszystkie trzy związki wpływały na żywotność komórek w sposób zależny od czasu i stężenia.

Po 24 h inkubacji najsilniejszy efekt był widoczny po zastosowaniu RK i 7-deazaRK, niezależnie od stężenia, co było obserwowane jako wzrost czerwonej fluorescencji martwych komórek **(Rys. 21A)**. Ponadto zaobserwowano zahamowanie proliferacji komórek oraz pęknięcie zewnętrznej warstwy sferoidów. Obserwowane minimalne zmiany (nieistotne statystycznie) w intensywności czerwonej fluorescencji barwnika wykazały, że 8-azaRK nie zakłócał żywotności sferoidów.

Odsetek martwych komórek (barwionych homodimerem etydyny-1) po traktowaniu RK i 7-deazaRK wzrósł ponad dwukrotnie, co było związane się zmianą intensywności fluorescencji w porównaniu z komórkami nietraktowanymi, dla najwyższych stężeń związków **(Rys. 21B)**. Analiza żywotności komórek po 72 h wykazała, że RK i 7-deazaRK w stężeniu 80  $\mu\text{M}$  wykazały silny efekt **(Rys. 21A)**. Co więcej, po traktowaniu tymi związkami w stężeniu 200  $\mu\text{M}$  struktura sferoidu była już rozluźniona i mniej zwarta, co mogło prowadzić do rozpadu sferoidu i wycieku barwników. Traktowanie 200  $\mu\text{M}$  8-azaRK przez 72

h spowodowało niewielki wzrost intensywności fluorescencji w porównaniu z intensywnością dla komórek nietraktowanych, które pozostały żywotne, jednakże doszło do indukcji śmierci komórkowej (**Rys. 21A, B**).



**Rysunek 21: Analiza żywotności sferoidów T98G po traktowaniu RK, 8-azaRK i 7-deazaRK. (A)**

Wizualizacja mikroskopowa żywotności komórek T98G rosnących w kulturze 3D, przeprowadzona za pomocą testu LIVE/DEAD. Zielona (ex/em: 490/505-550 nm) i czerwona fluorescencja (ex/em: 530/600-660 nm) odpowiadają odpowiednio żywym i martwym komórkom. Połączone obrazy pokazane są na prawych panelach.

**(B)** Analiza intensywności fluorescencji sferoidów. Wyniki przedstawione są jako średnie  $\pm$  SD z trzech niezależnych pomiarów. Istotność statystyczna: (ns) nieistotne, (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

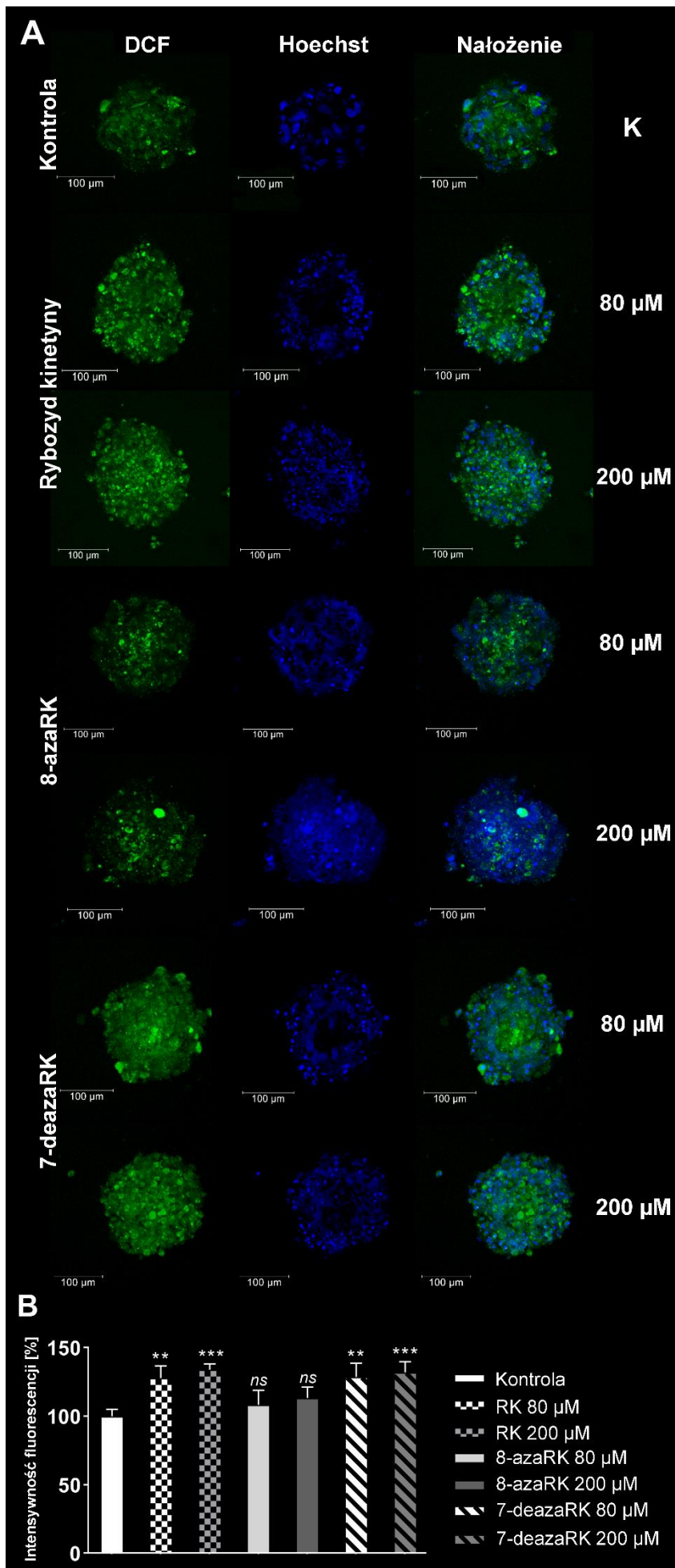
**4.2.11. Indukcja cytoplazmatycznego i mitochondrialnego stresu oksydacyjnego w sferoidach T98G po podaniu RK, 8-azaRK i 7-deazaRK**

Aby określić i potwierdzić, czy podanie 80 i 200  $\mu$ M RK, 8-azaRK i 7-deazaRK indukuje generowanie cytoplazmatycznych RFT, przeprowadzono wizualizację mikroskopową sferoidów komórkowych T98G, podwójnie barwionych diaoctanem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCFDA) i Hoechstem 33342 (w celu wizualizacji jąder komórkowych) (**Rys. 22**). H<sub>2</sub>DCFDA po reakcji z RFT tworzy związek fluorescencyjny. W trakcie 24-godzinnego traktowania zaobserwowano wzrost fluorescencji pochodzącej z utlenionego barwnika do około 30% przy najwyższych stężeniach RK i 7-deazaRK, wykazując w ten sposób indukcję SO (**Rys. 22A, B**). W przypadku 8-azaRK nie zaobserwowano znaczących zmian intensywności fluorescencji barwnika. Była ona porównywalna do reakcji sferoidów nietraktowanych, wskazując w ten sposób, że 8-azaRK nie zakłóca statusu redoks sferoidów inkubowanych ze związkiem.

Następnie, za pomocą mikroskopii konfokalnej analizowano indukcję stresu oksydacyjnego mitochondrialnego w sferoidach T98G, wywołanego przez wszystkie trzy związki. Obecność nadtlenku w mitochondriach jest odzwierciedlona przez emisję czerwonej fluorescencji przez barwnik MitoSOX. Wykazano, że RK, 8-azaRK i 7-deazaRK wpływały na homeostazę redoks mitochondriów w sposób zależny od stężenia i czasu (**Rys. 23**). Zaobserwowano, że traktowanie komórek 80 i 200  $\mu$ M RK i 7-deazaRK efektywnie indukowało produkcję nadtlenku, a efekt ten był silniejszy i bardziej widoczny wraz ze wzrostem czasu inkubacji (**Rys. 23A**). Po 72 h traktowania obydwoma związkami zaobserwowano wzrost fluorescencji emitowanej przez utleniony barwnik do około 50% w porównaniu do komórek nietraktowanych (**Rys. 23B**). Inkubacja komórek przez 24 i 48 h z 8-azaRK nie wykazała spektakularnego wzrostu mitochondrialnego SO, niezależnie od stężenia. Efekt ten był ostatecznie obserwowany po 72 h inkubacji i nieznacznie wzrastał w porównaniu z efektem dla komórek kontrolnych (**Rys. 23A, B**).

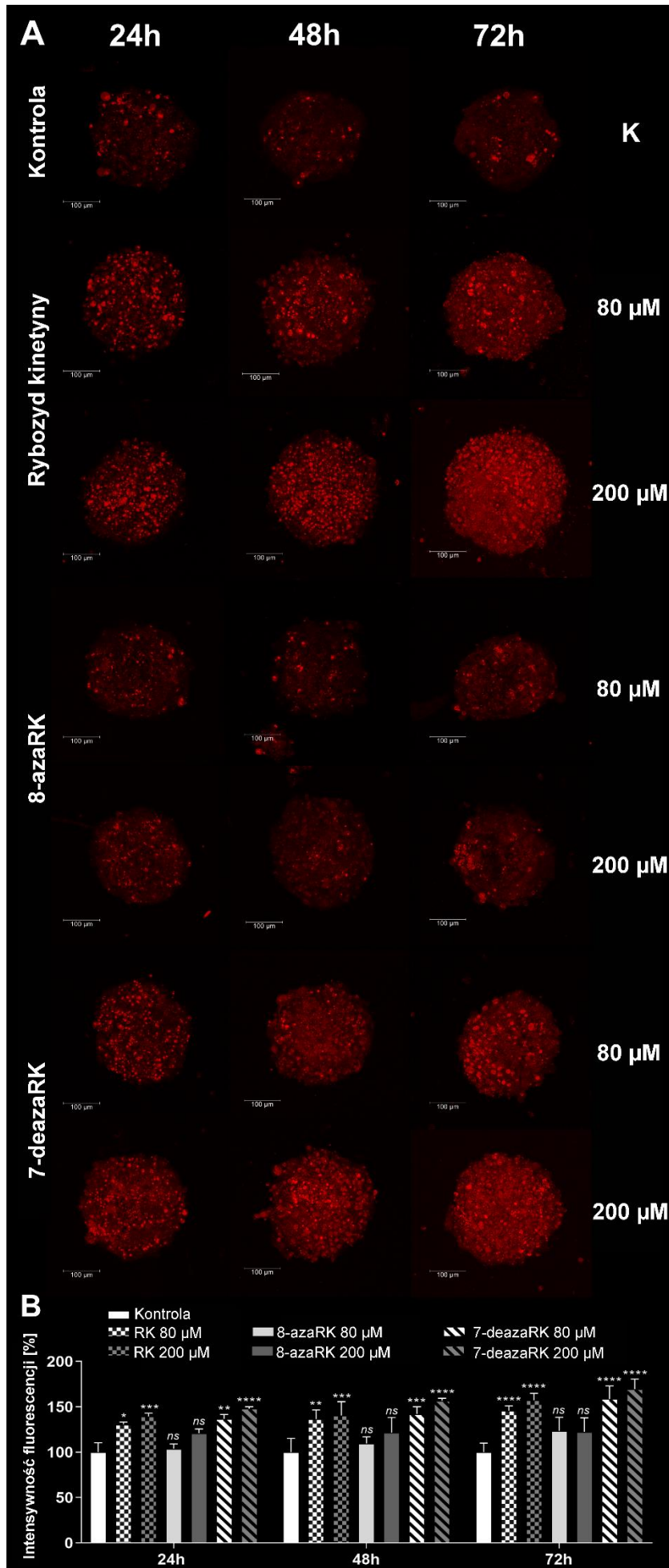
Podsumowując, zastosowanie sferoidów T98G pozwoliło na wyselekcjonowanie jednej pochodnej RK o aktywności przeciwnowotworowej, zbliżonej do rybozydu kinetyny, a także wykazało kompleksowe działanie tych związków. Do dalszych, szczegółowych badań wybrano 7-dezaRK, aby porównać jego działanie z działaniem RK oraz zbadać potencjał obu tych związków w terapii oksydacyjnej GBM.







**Rysunek 22: Analiza indukcji stresu oksydacyjnego w sferoidach komórek T98G.** (A) Analiza mikroskopowa została przeprowadzona po 24 h traktowania 80 i 200  $\mu$ M RK, 8-azaRK i 7-deazaRK. Stres oksydacyjny wykazano za pomocą barwienia H<sub>2</sub>DCFDA (ex/em: 498/505-550 nm). Jądra komórkowe barwiono Hoechstem 33342 (ex/em: 405/430-480 nm). Połączone obrazy są przedstawione na prawym panelu. (B) Analiza zmiany intensywności fluorescencji sferoidów po indukcji. Wyniki przedstawione są jako średnia intensywność fluorescencji  $\pm$  SD z trzech pomiarów. Istotność statystyczna: (ns) nieistotne, (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ .



**Rysunek 23: Analiza mitochondrialnego stresu oksydacyjnego w sferoidach T98G.** (A) Analiza mikroskopowa przeprowadzona po 24, 48 i 72 h inkubacji z RK, i 7-deazaRK (80 i 200  $\mu$ M), określona przez barwienie MitoSOX (ex/em: 510/570-600 nm). (B) Analiza zmian w intensywności fluorescencji sferoidów. Wyniki przedstawione są jako średnia intensywność fluorescencji  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna: (ns) nieistotne, (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

#### ***4.2.12. Kinaza adenozyne jako kluczowy enzym dla uzyskania pełnej aktywności i toksyczności pochodnej adenozyne poprzez szlak rezerwowy***

Celem badania było wykazanie, że RK i 7-deazaRK są obiecującymi związkami przeciwnowotworowymi i mogą być potencjalną alternatywą w terapiach oscylujących w zakresie komórkowego środowiska redoks glejaka wielopostaciowego i indukcji apoptozy w nieprawidłowych komórkach, poprzez aktywację szlaku rezerwowego biosyntezy puryn (**Rys. 24A**).

Pierwszy etap stanowiło przeprowadzenie reakcji fosforylacji *in vitro*, katalizowanej przez ADK, powyższych rybozydów (**Rys. 24B**) oraz wykonanie chromatografii cienkowarstwowej w celu wizualizacji procesu. Dla RK zastosowano wcześniej ustalone i optymalne stężenie 2 mM (dane niepokazane), natomiast dla jego nowej pochodnej przeprowadzono selekcję stężenia podczas trwania reakcji fosforylacji. Następnie określono względne wartości reakcji fosforylacji w odniesieniu do powstającego metabolitu – 5'-monofosforanu rybozydu kinetyny (KMP). Analiza wykazała, że najbardziej wydajna fosforylacja zachodzi przy zastosowaniu najwyższego stężenia (4 mM) 7-deazaRK (fosforylacja pochodnej była o 18,5% niższa niż dla RK), ale efekt ten był proporcjonalnie silniejszy wraz ze wzrostem stężenia. Ponadto, zastosowanie inhibitora kinazy adenozykowej, 5'-jodotubercydyny, odwracało reakcję. Stężenie inhibitora również zostało wcześniej określone i wybrano optymalne stężenie (**Rys. 24B**).

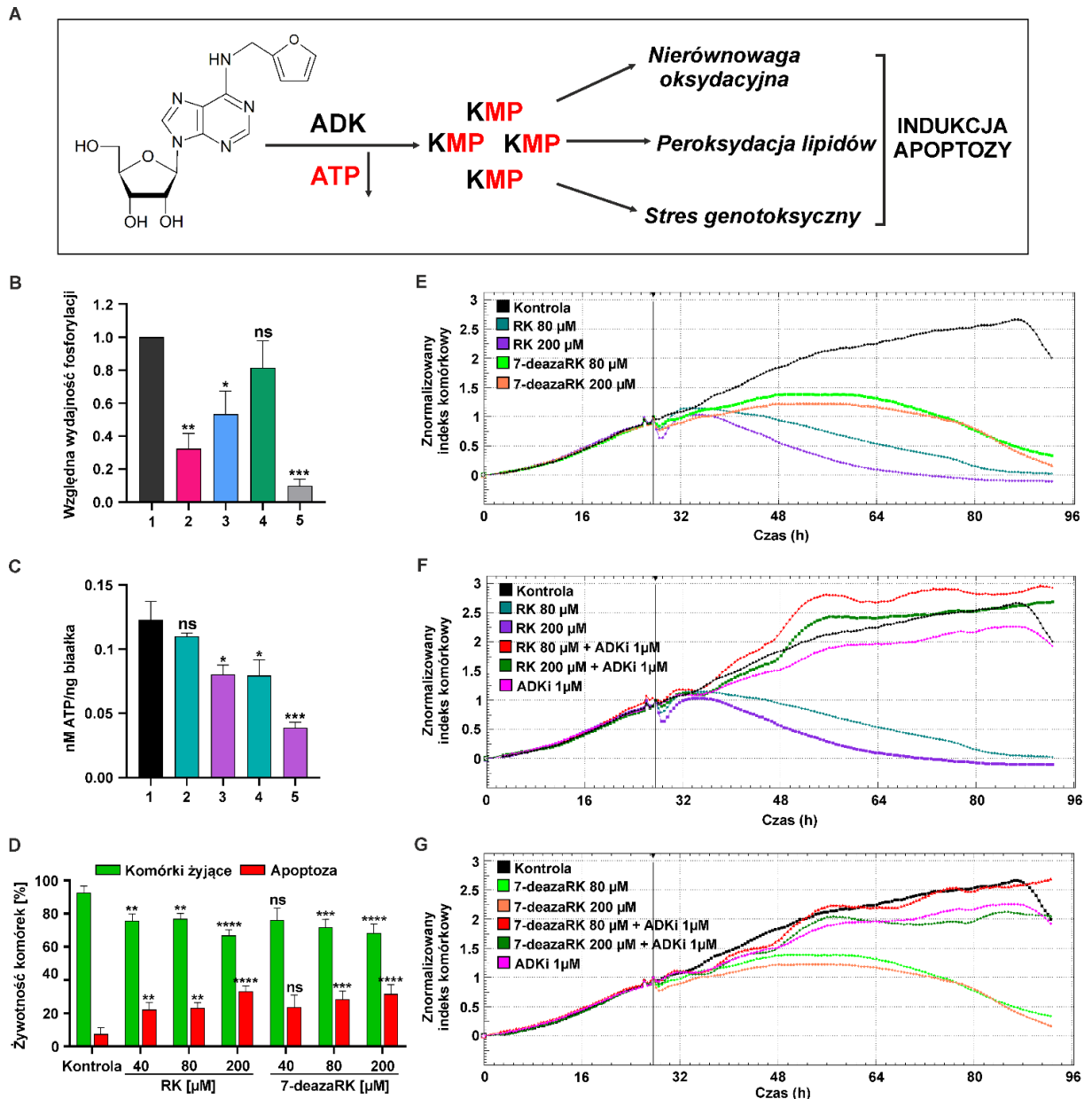
W celu oszacowania zawartości komórkowego ATP, wykonano test bioluminescencyjny, który ujawnił spadek poziomu ATP w komórkach T98G traktowanych obydwoma związkami (**Rys. 24C**). Po 6 h zaobserwowano gwałtowny spadek poziomu ATP, a w przypadku 200  $\mu$ M RK wynosił on ponad 33%. Efekt był jednak większy po inkubacji komórek z 200  $\mu$ M 7-deazaRK, gdzie spadek poziomu ATP osiągnął 75% w porównaniu do komórek kontrolnych. Co ciekawe, traktowanie komórek 80  $\mu$ M 7-deazaRK prowadziło do spadku poziomu ATP o 42%, co jest porównywalne z tym uzyskanym przy najwyższym stężeniu RK (**Rys. 24C**). Wybrano optymalne stężenia związków i warunki czasowe, po

których oznaczano ilość ATP, wydłużenie czasu inkubacji nie powodowało wyraźnego spadku ATP.

Następnie zbadano proliferację komórek w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu xCELLigence i oceniono apoptozę komórek metodą cytometrii przepływowej (**Rys. 24E-G**). Śledzenie wzrostu komórek T98G umożliwiło porównanie toksycznego działania RK i 7-deazaRK. Żywotność komórek T98G monitorowano przez 96 h co 30 min (**Rys. 24E**), a podanie związków przeprowadzono po pierwszych 24 h wzrostu komórek od momentu przytwierdzenia komórek do podłoża. Kinetyka pomiaru żywotności komórek dostarczyła informacji o wpływie badanych związków. Zaobserwowano znaczący spadek wartości CI (indeks komórkowy) komórek T98G, który nastąpił po 24 h traktowania 200  $\mu$ M RK, podczas gdy jego pochodna jedynie spowalniała proliferację komórek i wykazywała mniej spektakularny efekt. Pochodna 7-deazaRK wykazywała słabszy wpływ na hamowanie proliferacji komórek w porównaniu z niższym stężeniem RK (**Rys. 24E**). Wskazywało to, że komórki T98G były wrażliwe na oba związki, ale indeks i szybkość reakcji były różne. Ponadto, aby po raz kolejny wykazać znaczenie fosforylacji rybozydów przez ADK, użyto jej inhibitora (1  $\mu$ M 5'-jodotubercydyny) i udowodniono w ten sposób, że jest to kluczowy etap dla uzyskania toksycznego efektu. Sam inhibitor (linia w kolorze różowym na wykresie) nie jest toksyczny dla komórek i skutecznie zatrzymywał fosforylację, co nie prowadziło do spadku tempa proliferacji komórek (**Rys. 24F, G**).

W celu zbadania, czy RK i jego pochodna indukują apoptozę w komórkach T98G, przeprowadzono analizę cytometryczną, przy użyciu podwójnego barwienia odczynnikami CellEvent® Caspase-3/7 Green ReadyProbes® Reagent i PI. RK i 7-deazaRK wpływały na żywotność i proliferację komórek T98G w sposób zależny od stężenia i czasu (**Rys. 24D**). 24-godzinna ekspozycja na RK w zakresie stężeń 40-200  $\mu$ M podniosła odsetek komórek apoptotycznych do 25,8% w porównaniu z komórkami kontrolnymi (7,34%), natomiast po traktowaniu komórek 7-deazaRK efekt ten był podobny jak w przypadku RK i wynosił 24,4% dla najwyższych stężeń związków (**Rys. 24D**).

Wyniki te sugerują, że szybkie i wyraźne wyczerpanie ATP jest jedną z wczesnych konsekwencji ekspozycji na pochodne purynowe i prowadzi do utraty żywotności komórek.



**Rysunek 24: Aktywność i toksyczność rybozydu kinetyny i 7-deazarybozydu kinetyny w komórkach T98G**

zależy od aktywności ADK. (A) Fosforylacja rybozydu kinetyny przez ADK promuje jego toksyczność komórkową, prowadząc do indukcji apoptozy. (B) Fosforylacja *in vitro* 7-deazaRK (1-4 mM, słupki 2-4, odpowiednio) przez ADK. Dane przedstawione są jako średnie  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. Słupki nr 1 to kontrola pozytywnej wydajności fosforylacji- 2 mM RK, jako substratu dla enzymu. Kontrolę negatywną stanowi 0,5 mM 5-jodotubercydyna- inhibitor ADK (słupki nr 5). (C) Określenie poziomu ATP w komórkach po traktowaniu 80 i 200  $\mu$ M RK oraz 7-deazaRK (odpowiednio słupki o numerach 2-5) w porównaniu do kontroli (słupki nr 1). Wyniki znormalizowane dla 1 mg białka są przedstawione jako średnie  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. (D) Analiza cytometryczna apoptozy/nekrozy w komórkach T98G po 24 h inkubacji z RK i 7-deazaRK (40-200  $\mu$ M). Zielone słupki oznaczają żywe komórki, podczas, gdy czerwone reprezentują komórki wchodzące w wczesną i późną apoptozę. Dane są przedstawione jako średnia procentowa  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna jest oznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ . (E-G) Proliferacja komórek T98G w czasie rzeczywistym

w obecności RK i 7-deazaRK. Wpływ RK i 7-deazaRK (80 i 200  $\mu\text{M}$ ) na proliferację komórek HepG2 (**E**) z dodatkiem inhibitora ADK (1  $\mu\text{M}$  jodotubercydyny; **F, G**) monitorowano za pomocą systemu xCELLigence przez 120 h w odstępach 30 min. Wyniki są reprezentatywne dla co najmniej trzech niezależnych eksperymentów.

#### **4.2.13. Zaburzenie parametrów oksydacyjnych w komórkach T98G po działaniu RK i 7-deazaRK. Wpływ związków na aktywację metabolicznego SO i mechanizmów obrony antyoksydacyjnej**

W kolejnym kroku przeanalizowano, czy metaboliczne RFT na poziomie patologicznym zaburzają funkcjonowanie komórek powodując uszkodzenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Cytoplazmatyczny poziom RFT oceniano za pomocą barwienia  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  i cytometrii przepływowej (**Rys. 25A, B**). Komórki T98G traktowane wzrastającym stężeniem obu związków przez 24 h, wykazały wzrost fluorescencji emitowanej przez barwnik do 85% przy najwyższym stężeniu RK, podczas gdy w przypadku traktowania 200  $\mu\text{M}$  7-deazaRK wynosił on około 30% (**Rys. 25A**). Wzrost intensywności fluorescencji barwnika odzwierciedla indukcję SO, jak zaobserwowano na histogramach uzyskanych w wyniku analizy cytometrycznej (**Rys. 25B**).

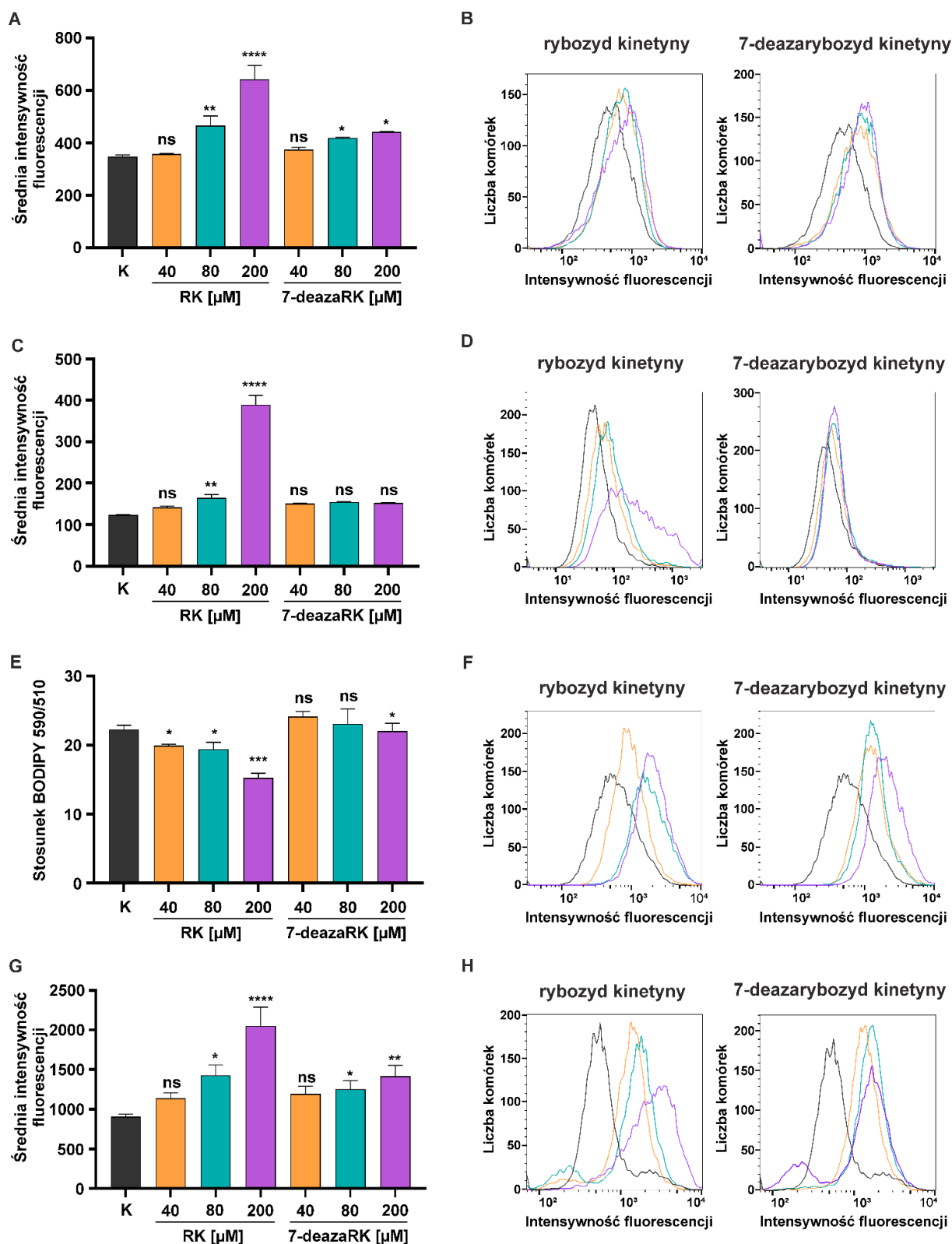
Za pomocą cytometrii przepływowej, zaobserwowano również, że zastosowanie RK i 7-deazaRK pociągnęło za sobą aktywację mitochondrialnego SO w komórkach T98G (barwienie MitoSOX) (**Rys. 25C, D**). Wyniki wskazują, że zastosowanie 200  $\mu\text{M}$  RK gwałtownie zwiększyło mitochondrialną generację nadtlenu, podczas gdy wpływ ten nie był tak znaczący w niższych stężeniach (**Rys. 25C**). Ponadto, niezależnie od stężenia, 7-deazaRK powodował, że komórki wykazywały wzrost fluorescencji o ponad około 1,3-krotny w porównaniu do komórek kontrolnych (**Rys. 25C**). Generowanie mitochondrialnych RFT w komórkach T98G jest również widoczne na histogramach jako przesunięcie fluorescencji (**Rys. 25D**).

Intensywnemu stresowi oksydacyjnemu zwykle towarzyszy degradacja lipidów i ostatecznie może to powodować bezpośrednie uszkodzenie błony komórkowej [229, 230], dlatego oceniono indukcję peroksydacji lipidów po traktowaniu RK i 7-deazaRK (**Rys. 25E, F**). Efektywność peroksydacji lipidów badano przy użyciu odczynnika 581/591 C11, który lokalizuje się w błonie żywych komórek. Utlenianie wielonienasyconej części butadienylowej tego barwnika powoduje przesunięcie pików emisji fluorescencji z  $\sim 590$  nm do  $\sim 510$  nm, co służy do oznaczenia stosunku peroksydacji. Oszacowano, że stosunek 590/510, na podstawie danych pochodzących z czerwonej i zielonej fluorescencji, uzyskanych za pomocą cytometrii

przepływowej, był odwrotnie proporcjonalny do ilości peroksydowanych lipidów (**Rys. 25E**). Analiza wykazała, że tylko RK aktywnie powodował peroksydację lipidów, a spadek stosunku był proporcjonalny do wzrastającego stężenia związku. RK w stężeniu 200  $\mu\text{M}$  wykazywał najwyższą efektywność peroksydacji, na co wskazuje najniższy stosunek 590/510 (spadek o około 32% w porównaniu do komórek T98G nietraktowanych; **Rys. 25E**). Komórki traktowane 7-deazaRK wykazywały peroksydację lipidów porównywalną z komórkami kontrolnymi, a związek ten powodował niewielkie obniżenie stosunku 590/510 tylko w najwyższym stężeniu. Aktywacja peroksydacji lipidów w komórkach T98G jest również pokazana na histogramach uzyskanych w wyniku analizy cytometrycznej, jako pojedyncza długość fali przesunięcia czerwonej fluorescencji pochodzącej od barwnika (**Rys. 25F**). Wzrost intensywności czerwonej fluorescencji jest skorelowany z ilością utlenionych lipidów, co stanowi odwrotność wartości uzyskanych po przeliczeniu stosunku 590/510.

Ponadto, zaobserwowano, że inkubacja z RK i 7-deazaRK, „zmusiła” naturalne antyoksydacyjne systemy obronne komórek T98G do ochrony przed nadmiernie powstałymi RFT (**Rys. 25G, H**). Zaobserwowano wzrost zawartości zredukowanego glutationu (GSH), który został zmierzony poprzez barwienie niefluorescencyjnym barwnikiem Thiolite Green. Wzrost komórkowego stężenia GSH po traktowaniu 200  $\mu\text{M}$  RK był najbardziej znaczący, co korelowało z ponad 2,3-krotnym wzrostem fluorescencji, w porównaniu z tym w komórkach kontrolnych (**Rys. 25G**). Efekt pochodnej RK był podobny i porównywalny z efektem 80  $\mu\text{M}$  RK, gdzie obserwowano 1,6-krotnie wyższy wzrost intensywności fluorescencji (**Rys. 25H**).

Wyniki te zdecydowanie sugerują, że stres oksydacyjny wywołany przez RK i 7-deazaRK, może być czynnikiem wyzwalającym apoptozę komórek T98G (**Rys. 25**). Co więcej, RK wykazywał większy wpływ na indukcję mitochondrialnego SO z jednoczesną aktywacją peroksydacji lipidów.



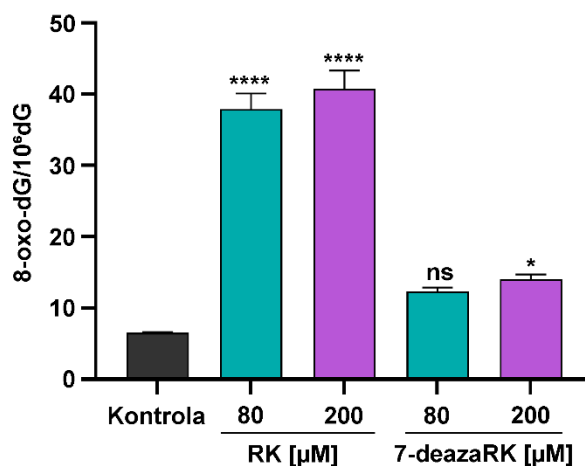
**Rysunek 25: Wpływ rybozydu kinetyny i 7-deazarybozydu kinetyny na parametry oksydacyjne w komórkach T98G. (A, B)** Detekcja cytoplazmatycznych RFT w komórkach inkubowanych z RK i 7-deazaRK (stężenia w zakresie 40-200 μM). Produkcja RFT była badana metodą cytometrii przepływowej z użyciem barwnika H<sub>2</sub>DCFDA i oceniono intensywność fluorescencji. Dane są przedstawione jako wykres słupkowy z trzech niezależnych eksperymentów (średnia ± SD, A) lub jako reprezentatywne histogramy (B). (C, D) Analiza



cytometryczna indukcji mitochondrialnego SO w komórkach T98G po traktowaniu RK i 7-deazaRK (40-200  $\mu\text{M}$ ) przy użyciu wskaźnika fluorescencyjnego MitoSOX. Zmiana intensywności fluorescencji została wykreślona na wykresie słupkowym (średnia  $\pm$  SD; **C**) i jest przedstawiona jako reprezentatywny histogram trzech niezależnych eksperymentów (**D**). (**E**, **F**) Indukcja peroksydacji lipidów w komórkach T98G po traktowaniu RK i 7-deazaRK (40-200  $\mu\text{M}$ ) analizowana za pomocą cytometrii przepływowej. Po utlenieniu, fluorescencja emisyjna sondy BODIPY 581/591 przesuwana się z 590 do 510 nm; stosunek intensywności fluorescencji 590/510 jest przedstawiony jako wykres słupkowy (średnia  $\pm$  SD) z trzech pojedynczych eksperymentów (**E**). Przesunięcie fluorescencji jest również pokazane jako reprezentatywne histogramy (**F**). (**G**, **H**) Jednoczesna analiza komórkowej zawartości GSH mierzonej przez barwienie niefluorescencyjnym barwnikiem Thiolite™ Green. Zmiany intensywności fluorescencji podano na wykresie słupkowym z trzech niezależnych eksperymentów (średnia  $\pm$  SD; **G**) lub przedstawiono jako reprezentatywne histogramy (**H**). Istotność statystyczna jest zaznaczona gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

#### **4.2.14. Wpływ RK i 7-deazaRK na utlenianie DNA**

Dodatkowym parametrem, który został oceniony był poziom wewnątrzkomórkowych RFT, powodujących uszkodzenia kwasów nukleinowych. W tym celu oznaczono zawartość 2'-deoksy-8-oksoguanozyny (8-oxo-dG) w enzymatycznych hydrolizatach DNA uzyskanych z komórek T98G, inkubowanych z badanymi związkami. 2'-deoksyguanozyna jest uważana za związek najbardziej podatny na utlenianie spośród czterech kanonicznych nukleozydów, a 8-oxo-dG jest głównym produktem utleniania w DNA. Zawartość 8-oxo-dG mierzono metodą HPLC-UV-ED, a liczbę cząsteczek 8-oxo-dG obliczono na  $10^6$  dG, rezultaty pokazano na wykresie (**Rys. 26**). Działanie RK znacząco zwiększyło liczbę cząsteczek 8-oxo-dG w porównaniu z komórkami kontrolnymi, a zastosowanie obu stężeń (80 i 200  $\mu\text{M}$ ) wykazało ponad 5,5- do 5,7-krotnie wyższą liczbę cząsteczek 8-oxo-dG w komórkach T98G (odpowiednio  $37,89 \pm 2,205$  i  $40,725 \pm 2,58$  na  $10^6$  dG). 7-deazaRK wykazywał słabszy wpływ na liczbę cząsteczek 8-oxo-dG; dla stężeń 80 i 200  $\mu\text{M}$  wynosiła ona odpowiednio  $12,325 \pm 0,575$  i  $14,035 \pm 0,710$  na  $10^6$  dG w porównaniu z liczbą dla komórek nietraktowanych.

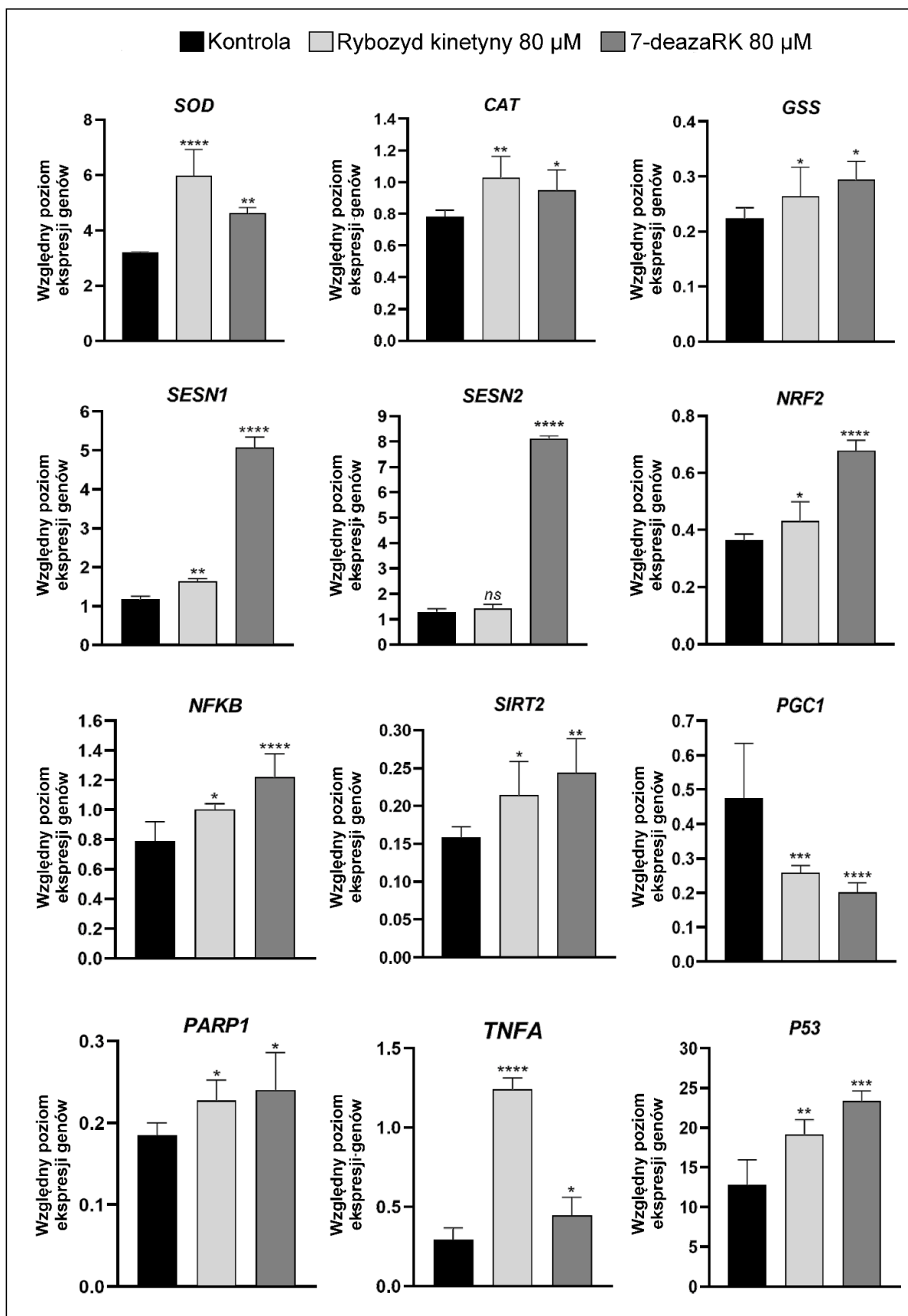


**Rysunek 26:** Analiza ilościowa zawartości 8-oxo-dG w komórkach T98G za pomocą metody HPLC-UV-ED po traktowaniu komórek RK i 7-deazaRK. Liczba reszt 8-okso-dG na  $1 \times 10^6$  par zasad w DNA została obliczona w komórkach po 24-godzinnej inkubacji z RK i 7-deazaRK (80 i 200  $\mu\text{M}$ ). Komórki kontrolne hodowano wyłącznie w pełnowartościowym podłożu wzrostowym. Istotność statystyczną oznaczono gwiazdkami: (ns)  $p > 0,05$ , (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

#### **4.2.15. Wpływ RK i 7-deazaRK na poziom ekspresji genów biorących udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny w komórkach T98G**

Ostatni etap badań stanowiło przeanalizowanie zmian poziomu ekspresji genów, kilku enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym i będących wskaźnikami dobrostanu komórkowego, w obecności RK i 7-deazaRK (**Tabela 3; Rys. 27**). Stwierdzono, że zarówno RK jak i 7-deazaRK aktywowały enzymatyczne mechanizmy zaangażowane w obronę antyoksydacyjną (tzw. „zmiatacze wolnych rodników”; SOD, CAT i GSS). Po zastosowaniu obu związków zaobserwowano wzrost poziomu ich ekspresji, co może być związane z ochroną przed nadmiernym powstawaniem RFT. Najbardziej znaczącą zmianę zaobserwowano dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), co było skorelowane z ponad 3-krotnym wzrostem ekspresji, w porównaniu do komórek kontrolnych (**Rys. 27**). Zaobserwowano jednak, że 7-deazaRK miała większy wpływ na geny związane ze stresem oksydacyjnym, takie jak SESN1, SESN2, NRF2 i NFKB, i znacząco zwiększyła poziom ekspresji tych genów w porównaniu do odnotowanego dla RK. Poziom ekspresji SESN2 pozostał niezmienny po inkubacji komórek z RK. Wykazano również, że obie pochodne obniżały poziom ekspresji krytycznego regulatora mitochondrialnego metabolizmu energetycznego, PGC-1 $\alpha$ , co z kolei powodowało aktywację innych genów należących do grupy wskaźników dobrostanu komórkowego (SIRT2, PARP1, TNFA i p53) (**Rys. 27**). RK

wykazał większy wpływ na poziom ekspresji TNFA (TNF- $\alpha$ ), który uległ ponad pięciokrotnej zmianie w porównaniu do poziomu ekspresji dla komórek kontrolnych (**Rys. 27**).



**Rysunek 27: Analiza poziom ekspresji wybranych genów, po inkubacji komórek T98G z RK i 7-deaza-RK (oba związki w stężeniu końcowym 80  $\mu$ M).** Względną analizę real-time PCR przeprowadzono dla genów SOD, CAT, GSS, SESN1, SESN2, NRF2, NFKB, SIRT2, PGC1, PARP, TFA i p53, po 24 h traktowania komórek obydwojma związkami. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SD uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych i trzech niezależnych powtórzeń eksperymentalnych dla każdego z nich. Istotność statystyczna: (ns) nieistotne, (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

**Tabela 3:** Zestawienie zmian w poziomie ekspresji genów analizowanych metodą real-time PCR, z uwzględnieniem funkcji kodowanego białka, a także ich implikacji w główne procesy komórkowe. Strzałka w górę oznacza wzrost ekspresji, strzałka w dół, to spadek ekspresji; liczba strzałek koreluje z siłą wzrostu/spadku ekspresji.

Znaczenie komórkowe	Gen	Pełna nazwa genu	Zmiany w poziomie ekspresji		Funkcja kodowanego białka
			RK	7-deazaRK	
Enzymatyczne zmiatacze RFT zaangażowane w obronę antyoksydacyjną	<i>SOD</i>	Dyzmutaza ponadtlenkowa	↑↑↑	↑↑	Zaangażowany w obronę antyoksydacyjną przed stresem oksydacyjnym; SOD katalizuje dysmutację anionu ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru.
	<i>CAT</i>	Katalaza	↑↑	↑	Kluczowy enzym antyoksydacyjny katalizujący rozkład nadtlenku wodoru na wodę i tlen.
	<i>GSS</i>	Syntetaza glutationu	↑	↑↑	Ważny enzym komórkowej obrony antyoksydacyjnej; bierze udział w drugim etapie biosyntezy glutationu (GSH), którego jedną z funkcji jest ochrona komórek przed uszkodzeniem oksydacyjnym przez wolne rodniki.
Czynniki regulujące związane ze	<i>SESN1</i>	Sestrina 1	↑	↑↑↑	Sestriny są indukowane przez białko p53 i odgrywają rolę w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA i stres oksydacyjny.
	<i>SESN2</i>	Sestrina 2	bez zmian	↑↑↑	

stresiem oksydacyjnym	<i>NRF2</i>	Jądrowy czynnik erytroidalny 2	↑	↑↑↑	Czynnik transkrypcyjny, który reguluje ekspresję białek antyoksydacyjnych zaangażowanych w ochronę przed uszkodzeniami oksydacyjnymi.
	<i>NFKB</i>	Jądrowy czynnik kappa B	↑↑	↑↑↑	Regulator transkrypcji, który jest aktywowany przez różne bodźce wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe, w tym wolne rodniki oksydacyjne.
Wskaźniki „dobrobytu komórkowego”	<i>PGC-1a</i>	Koaktywator PPARG 1 alfa	↓↓↓	↓↓↓	Transkrypcyjny koaktywator genów zaangażowanych w metabolizm energetyczny. Oddziałuje z jądrowymi czynnikami oddechowymi (NRFs) i reguluje ich aktywność.
	<i>SIRT2</i>	Sirtuina 2	↑↑	↑↑	Uczestniczy w ochronie przed różnymi rodzajami stresu komórkowego m.in. oksydacyjnego (np. zwiększa ekspresję docelowego genu FOXO3, zmniejszając poziom RFT); bierze udział w naprawie DNA.
	<i>PARP1</i>	Polimeraza poli(ADP-Rybozy) 1	↑	↑↑	Bierze udział w regulacji procesów molekularnych związanych z odbudową komórek po uszkodzeniach DNA.
	<i>TNFA</i>	Czynnik martwicy nowotworów alfa	↑↑↑	↑	Wielofunkcyjna cytokina prozapalna, zaangażowana w regulację szerokiego spektrum procesów biologicznych, w tym proliferacji komórek, różnicowania, apoptozy i metabolizmu lipidów.
	<i>p53</i>	Czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego	↑↑	↑↑↑	Białko odpowiadające na różne stesy komórkowe, regulujące ekspresję genów docelowych, indukując w ten sposób zatrzymanie cyklu komórkowego, apoptozę, senescencję, naprawę DNA lub zmiany w metabolizmie.

## 5. DYSKUSJA

### 5.1. Wpływ rybozydu kinetyny na metabolizm puryn

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono kompleksowe podejście prowadzące do poznania i wyjaśnienia mechanizmu działania związku, będącego pochodną adenozy. Biorąc pod uwagę to, iż rybozyd kinetyny jest transformowany w komórkach nowotworowych przez enzymy wszystkich trzech szlaków metabolizmu puryn, skupiono się nie tylko na wpływie tego związku na śmierć komórek, ale także na procesach enzymatycznych, w które RK może być zaangażowany.

Moje badania pokazały, że rybozyd kinetyny jest związkiem, który w komórkach eukariotycznych wykazuje złożone działanie. Przede wszystkim jego cytotoksyczność jest związana z zaburzeniem funkcji mitochondriów, ale z drugiej strony interesujące jest jakie są tego reperkusje i jakim przemianom metabolicznym ulega w komórce.

RK selektywnie inhibuje proliferację komórek nowotworowych oraz indukuje ich apoptozę poprzez aktywację szlaku wewnątrzkomórkowego, bezpośrednio związanego z mitochondriami (**Rys. 2**). Wykazano, że rybozyd kinetyny jest w stanie zakłócić balans energetyczny w komórkach [68], a efekt ten wydaje się być selektywny w kontekście komórek nowotworowych i nienowotworowych [82].

Kilka pochodnych puryn, co wcześniej już zostało wspomniane w niniejszej pracy, jest szeroko stosowanych w leczeniu nowotworów (np. fludarabina, 8-chloroadenozy, 6-merkaptopuryna) [116], a do badania mechanizmów działania tych związków zastosowano różne podejścia. Każda z pochodnych wydaje się mieć silny wpływ na funkcjonowanie komórek poprzez oddziaływanie na zdefiniowane cele molekularne lub szlaki metaboliczne [5, 109]. Związki te mają specyficzny i unikalny sposób działania, który może obejmować aktywację odpowiedzi komórkowej na stres oraz utrzymanie równowagi metabolicznej komórki [4].

Dotychczas mechanizm działania rybozydu kinetyny w komórkach nowotworowych nie był znany, a jeden z proponowanych dotyczył konwersji pochodnych adenozy przez kinazę adenozy (ADK), co związane jest z toksycznością RK, a następnie indukcją śmierci na drodze apoptozy. Aby w sposób kompleksowy przeanalizować wpływ RK na funkcjonowanie komórek nowotworowych poprzez oddziaływanie na szlaki metaboliczne, badania zrealizowano w trzech głównych, wzajemnie się uzupełniających etapach.

W pierwszej kolejności, przeanalizowano wewnątrzkomórkowy metabolizm N<sup>6</sup>-furfuryloadenozy w komórkach nowotworu wątroby, reprezentowanego przez linię

komórkową HepG2. Wykazano, że RK, jako pochodna adenozyiny, wpływa na metabolizm puryn oraz indukuje przepływ metaboliczny poprzez aktywację głównych szlaków biosyntezy puryn (*de novo*, rezerwowy i kataboliczny) (**Rys. 1**), a po drugie, RK oraz jego pochodne powstające w trakcie enzymatycznych reakcji, są wbudowywane do DNA (**tabela uzupełniająca S2**). Wreszcie, rybozyd kinetyny aktywuje asocjację purynosomów, poprzez zaburzenie równowagi poziomu adenozyiny w komórkach nowotworowych (**Rys. 8**).

Metabolizm nukleotydów purynowych opiera się na trzech podstawowych szlakach: syntezie *de novo* (ściśle związanej z cyklem komórkowym), szlaku rezerwowym (związanym z przemianami pośrednich produktów nukleotydowych) oraz szlaku katabolicznym (odpowiedzialnym za degradację pochodnych purynowych do kwasu moczowego) [96]. Wszystkie te szlaki są odpowiedzialne za syntezę nukleotydów oraz utrzymanie homeostazy ATP/ADP/adenozyina i sieci metabolicznych [97].

Puryny, a zwłaszcza adenozyina, są kluczowymi nukleozydami, szczególnie dla utrzymania równowagi wewnątrzkomórkowej i wspierania sygnalizacji komórkowej [109]. Adenozyina jest produkowana zarówno wewnątrzkomórkowo, jak i zewnątrzkomórkowo. Wewnątrzkomórkowa adenozyina jest wytwarzana z jej bezpośredniego prekursora, 5'-adenozyino-monofosforanu (5'-AMP). Ponadto może być też metabolizowana do inozyiny i hipoksantyny przez deaminazę adenozyiny oraz do kwasu moczowego przez oksydazę ksantynową. Adenozyina może być również przekształcana z powrotem do 5'-AMP w wyniku działania enzymu kinazy adenozyiny, a następnie do ADP i ATP [231]. Dlatego stężenie komórkowe adenozyiny musi być ściśle regulowane, ponieważ nukleozyd ten inicjuje złożoną kaskadę sygnalizacyjną w komórce. Między innymi odpowiada za reakcje związane z tworzeniem cząsteczek sygnałowych, takich jak cykliczny adenozyino-monofosforan (cAMP), a także wykazuje właściwości neuromodulujące i wywołuje szeroki zakres fizjologicznych odpowiedzi w tkankach ssaków poprzez interakcję z receptorami adenozyiny [51]. Ze względu na to, że adenozyina wykazuje tendencję, aby „resetować” bilans energetyczny komórki, nazwano ją „metabolitem odwetowym” [221]. Jest to związane z tym, że powstawanie adenozyiny jest konsekwencją stanu metabolicznego wewnątrz komórki, co ma miejsce w przypadku metabolitów regulatorowych, takich jak cytrynian czy AMP.

Fizjologicznie, funkcja adenozyiny polega na umożliwieniu każdej komórce, dostosowanie zasobów energii, tak aby nie doszło do nadmiernego rozpadu ATP pod wpływem działania bodźca zewnętrznego [232]. Enzymami, które regulują równowagę adenozyiny w komórkach są kinaza adenozyiny (ADK) i deaminaza adenozyiny (ADA), które

katalizują fosforylację i deaminację adenozyne, w celu wytworzenia odpowiednio AMP i inozyne [51, 233].

W niniejszej pracy, wielokrotnie wykazano, że RK ulega fosforylacji przez kinazę adenozyne [51], stanowiącą pierwszy enzym szlaku rezerwowego, co prowadzi do wytworzenia monofosforanu rybozydu kinetyne (KMP), dzięki wykorzystaniu ATP jako źródła fosforanów (**Rys. 1 i 3; Rys. 24B, F, G**). ADK jest ważnym regulatorem zewnątrzkomórkowego poziomu adenozyne [51], oscylującego w granicach stężeń 0,01-0,1  $\mu\text{M}$ , a przekroczenie tego zakresu może powodować poważne zaburzenia metabolizmu komórkowego. ADK jest także kluczowym elementem purynomu, formy sygnalizacji zewnątrzkomórkowej purynergicznej, w której pośredniczą nukleotydy purynowe i nukleozydy, takie jak ATP i adenozyne [234]. Purynom stanowi bogate źródło celów terapeutycznych, ale zawiera również duży zbiór różnorodnych białek, które podobnie jak kinazy białkowe wiążą puryny (purynom), albo jako substraty, albo jako kofaktory w postaci NAD, NADP i koenzymu A, a których inhibicja może mieć niekorzystne skutki dla komórki [61]. Poszukiwanie leków w obrębie purynomu powinno zatem obejmować strategię, które umożliwiają szeroką ocenę selektywności w całym purynomie [234]. Jak dotąd gleevec (imatinib) jest jednym z leków ukierunkowanych na białko, ponieważ jest inhibitorem receptorów kinaz tyrozynowych, wykorzystywanym w terapii nowotworów krwi [61].

Przekształcanie pochodnych adenozyne na drodze fosforylacji prowadzi do usunięcia nadmiaru rybozydów purynowych z cytozolu [53, 54]. ADK wykazuje szeroką selektywność w stosunku do substratów nukleozydowych, dlatego enzym ten często wykazuje nawet wyższą wydajność fosforylacji antymetabolitów niż adenozyne [235]. W komórkach poddanych działaniu RK obserwuje się szybkie wyczerpanie puli ATP, co przyczynia się między innymi do aktywacji apoptozy (**Rys. 2F, B i 3D**), spowodowanej zaburzeniami bioenergetycznymi i nieprawidłowościami w syntezie kwasów nukleinowych. Zastosowanie inhibitora ADK potwierdziło, że ADK jest kluczowym elementem biosyntezy puryn, który łączy bioenergetykę mitochondrialną z indukcją apoptozy w komórkach nowotworowych. Farmakologiczna inhibicja ADK, była równie skuteczna jak ta, którą zastosował Cabello i wsp. [68], poprzez zatrzymanie deplecji ATP za pomocą technologii siRNA. Ponadto, postawiono wtedy hipotezę, że RK po zależnej od ADK fosforylacji i aktywacji, zaburza syntezę i metabolizm ATP, w sposób analogiczny do innych pochodnych adenozyne, tj. 2-chloro- i 8-chloroadenozyne [68, 236] (8-chloroadenozyne obecnie została zawieszona między I a II fazą badań klinicznych; jako środek przeciwnowotworowy leczenia ostrej białaczki szpikowej (identyfikator [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) NCT00714103), gwałtownie obniża



poziom komórkowego ATP poprzez hamowanie mitochondrialnej syntazy ATP [237]. Wykazano także, że zwiększona podatność szybko proliferujących komórek nowotworowych, na wyczerpanie energii, w połączeniu z „upośledzoną” ich zdolnością do mitochondrialnej produkcji energii, może stanowić potencjalny cel dla terapii przeciwnowotworowej [236, 238, 239].

Wśród N<sup>6</sup>- podstawionych pochodnych adenozyiny, są też takie związki, które wykazują odmienny mechanizm działania. Przykład stanowi inna naturalnie występująca aromatyczna cytokinina- 2OH3MeOBAR (N<sup>6</sup>-(2-hydroksy-3-metoksybenzylo)adenozyina), która indukując śmierć komórek, nie doprowadza do wyraźnego wyczerpania ATP. Ponadto wykazano, że jej 5'-monofosforan, hamuje białko DNPH1, odpowiedzialne za wbudowanie nieprawidłowych nukleotydów do DNA [79].

Fosforylacja rybozydów cytokinin przez ADK jest warunkiem ich cytotoksycznego działania zarówno w komórkach zwierzęcych [240], jak i roślinnych [80]. W przeciwieństwie do takich analogów nukleotydów, które są przekształcane do trójfosforanów nukleotydów, dominującymi metabolitami rybozydów cytokinin są odpowiadające im monofosforany [240]. Zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki, wskazują jednak na to, że RK wykazuje mechanizm działania charakterystyczny dla antymetabolitów, które po fosforylacji bezpośrednio ingerują w syntezę kwasów nukleinowych, przechodząc przez kolejne etapy enzymatycznej konwersji.

Powstały monofosforan rybozydu kinetyny ulega dalszym przemianom enzymatycznym w komórkach. W celu ich prześledzenia zastosowano znakowany [<sup>13</sup>C]RK (N<sup>6</sup>-Furfuryl-[1'-<sup>13</sup>C] adenozyina). W wyniku reakcji enzymatycznych, katalizowanych przez szereg kinaz (**Rys. 1**), wykazano obecność w ekstraktach komórkowych wszystkich trzech form (mono-, dwu- i trój-) fosforanów <sup>13</sup>C-rybozydu kinetyny, należących zarówno do rybonukleotydów i deoksyrybonukleotydów (**Rys. 4, 5A, B i 6C**). Ich następcza fosforylacja prowadziła również do powstania KDP (5'- difosforan rybozydu kinetyny) (**Rys. 4C**).

Reduktaza rybonukleotydowa jest enzymem limitującym tempo metabolizmu nukleotydów, który funkcjonuje jako łącznik pomiędzy światem RNA i DNA. Jest enzymem zaangażowanym zarówno w szlak rezerwowy, jak i syntezy DNA *de novo*, w których katalizuje kluczowy etap: konwersję dwufosforanów nukleotydów do dwufosforanów 2'-deoksynukleotydów [113] (**Rys. 1 i 6A-C**). Stosując dokowanie molekularne udowodniono, że KDP dopasowuje się do centrum katalitycznego RNR i jest właściwym substratem dla tego enzymu, który przyczynia się do powstania dKDP (**Rys. 6A i B**). Stwierdzono, że dKTP jest wytwarzany w wyniku fosofrylacji dKDP, poprzez działanie kinazy dwufosforanów

nukleozydów (NDPK) i następnie służy jako substrat dla polimerazy DNA. W konsekwencji zaobserwowano wbudowanie dKMP do DNA (**Rys. 6C**), co może prowadzić do mutagenезy oraz zaburzeń w cyklu komórkowym [29, 241] (**Rys. 6D**). Większość analogów nukleozydów blokuje fazę S cyklu komórkowego ze względu na wbudowywanie się do łańcucha DNA [112]. Zaobserwowano, że RK zaburza kinetykę cyklu komórkowego i zatrzymuje komórki HepG2 w fazach S i G2/M, prowadząc do apoptozy (**Rys. 6D**); tym samym potwierdzono wcześniejsze dane dotyczące pośredniczenia w proliferacji komórek przez RK (**Rys. 2A i 3A**).

W wyniku działania tego samego enzymu- kinazy difosforanów nukleozydów (NDPK), wykazano obecność KTP (5'- trójfosforan rybozydów kinetyny) w ekstraktach komórkowych, które są potencjalnymi substratami dla polimerazy RNA II (**Rys. 4D**). Transkrypcja *in vitro* (**Rys. 5B**) wykazała, że cały nukleotyd kinetyny został włączony przez polimerazę z bardzo wysoką wydajnością. Ponadto, zaobserwowano, że względna ilość AMP w transkrybowanym RNA w obecności trójfosforanu rybozydu kinetyny (KTP), była zmniejszona o około 50% w porównaniu do RNA kontrolnego. Wynik ten pozwolił na wykazanie, że [<sup>13</sup>C]KMP (monofosforan RK) jest obecny w całkowitym RNA pochodzącym z komórek HepG2 w wyniku traktowania [<sup>13</sup>C]RK. Komórkowe RNA może być silnie modyfikowane zarówno przez stres oksydacyjny [242], jak i włączanie niewłaściwych metabolitów. Pojawienie się analogów kwasów nukleinowych w komórce może być również źródłem dodatkowych modyfikacji RNA które mogą zmieniać funkcję transkryptu i są wspólnie określane jako epitranskryptom [243].

Metabolizm nukleotydów purynowych odgrywa kluczową rolę w fizjologii komórek zarówno prokariotów, jak i eukariotów. Anomalie w tym procesie determinują zaburzenia równowagi komórkowej, które prowadzą do śmierci komórek i są przyczyną chorób człowieka. Jednakże zastosowanie pochodnych purynowych, takich jak RK, może prowadzić do kontrolowanej śmierci komórek nowotworowych. Stwierdzono, że RK bierze udział w przemianach enzymatycznych generujących niespecyficzne zmiany w równowadze komórkowej. W związku z tym skupiono się na syntezie i składzie DNA. Zastosowano warunki eksperymentalne, które wywierały efekt pośredni lub indukowały apoptozę. Dodatkowo zastosowano inhibitor ADK (ADKi), aby zahamować fosforylację RK i zapobiec deficytowi energii mitochondrialnej (**Rys. 7G-J**). W efekcie, zaobserwowano nagromadzenie szerokiej gamy modyfikacji w DNA oraz wykryto dziewięć [<sup>13</sup>C] reprezentatywnych metabolitów w cytozolu komórek HepG2, zaangażowanych we wszystkie szlaki metaboliczne adenozyiny, spowodowanych aktywnością RK w komórkach nowotworowych (**tabela**

**uzupełniająca S2 i S3).** Ponadto, wykazano, że pod jego wpływem zwiększa się ilość rybozydów i rybonukleotydów w komórce (takich jak: XMP, XDP, XTP, IMP, IDP, ITP, inozyna). Sam rybozyd kinetyny nie jest ich źródłem, ale *triggerem* dla licznych reakcji enzymatycznych szlaku rezerwowego puryn. W komórkach wystąpił niedobór adenozyne, wydaje się więc, że jej funkcje mogą być przejęte przez inne analogi nukleotydów. Obserwacje te dowodzą, że system naprawy DNA jest niewydolny, a wbudowywanie nukleotydów poprzedzone jest oddziaływaniem analogów nukleotydów z replikacyjnymi polimerazami DNA [116]. Obliczono (analiza ilościowa) udział zmodyfikowanych nukleotydów w DNA (**tabela uzupełniająca S2**), które pochodziły z insercji rybonukleotydów, wbudowania całych nukleotydów pochodzących z [<sup>13</sup>C]RK oraz w znacznym stopniu, z deaminacji nukleotydów adeniny, guaniny, cytozyny i 5-metylocytozyny, w wyniku czego powstały odpowiednio inozyna i hipoksantyna, ksantyna, uracyl i tymina (**Rys. 7G-J**).

W komórkach traktowanych 80 μM [<sup>13</sup>C]RK obserwowano znaczący wzrost liczby modyfikacji w DNA, które prawdopodobnie mogłyby być zredukowane przez system naprawczy. Przy wyższym stężeniu [<sup>13</sup>C]RK, które aktywuje duże zmiany bioenergetyczne, stwierdzono dużą liczbę różnych modyfikacji w DNA. Traktowanie komórek HepG2 200 μM [<sup>13</sup>C]RK w połączeniu z ADKi, powodowało mniejsze uszkodzenia DNA, ponieważ ADK była nieaktywna, a oddychanie mitochondrialne pozostawało stabilne (**Rys. 7G-J**). Zastosowanie inhibitorów- forodezyny i EHNA (**Rys. 7A-D**), spowodowało brak kluczowych metabolitów dla szlaku *de novo* biosyntezy puryn, tj. R5P, PRPP czy inozyny i tym samym potwierdziło udział fosforylasy nukleotydów purynowych (PNP) i deaminazy adenozyne w metabolizmie rybozydu kinetyny w komórkach nowotworowych. Forodezyna jest stosunkowo nowym, silnym inhibitorem PNP (IC<sub>50</sub>= 0,48-1,57 nM), skutecznym w leczeniu nowotworów T-komórkowych. W przeciwieństwie do innych analogów nukleotydów purynowych, forodezyna nie działa poprzez bezpośrednią inkorporację do DNA, ale wykazuje wysoce selektywną inhibicję PNP ze względu na unikalną strukturę [244]. Chlorowodorek EHNA jest z kolei, selektywnym inhibitorem deaminazy adenozyne, posiada aktywność przeciwwirusową, ale przede wszystkim uważa się, że potęguje aktywność przeciwnowotworową analogów adenozyne [245].

Nagromadzenie nieprawidłowych metabolitów w komórkach w wyniku zaburzeń metabolizmu puryn, może być główną przyczyną obserwowanych uszkodzeń DNA, ale inne czynniki, takie jak błędy replikacji lub generowanie reaktywnych form tlenu (RFT), mogą również odgrywać znaczącą rolę w tym procesie [246]. Komórka aktywuje zatem

mechanizmy odpowiadające za naprawę takich zaburzeń, przede wszystkim w celu utrzymania homeostazy AMP/ATP i ADP/ATP. Różne enzymy, w tym także ADK, ściśle regulują poziom adenozy, AMP, ADP i ATP. Stres komórkowy, spowodowany np. chemioterapią, zwiększa stosunek AMP:ATP poprzez zahamowanie produkcji ATP i aktywację AMPK (czynnik odpowiedzialny za komórkową homeostazę energetyczną, kinaza aktywowana AMP) [117, 247]. McDermott i wsp. [117] przeprowadzili szereg eksperymentów mających na celu potwierdzenie udziału AMPK w odpowiedzi na działanie RK i wykazali, że nie wymaga on sygnalizacji tej konkretnej kinazy, aby indukować śmierć komórkową. Stanowi to potwierdzenie eksperymentu pilotażowego (analiza cytometryczna dla apoptozy/nekrozy) przeprowadzonego z wykorzystaniem inhibitora kinazy AMPK i RK (wyniki nie są włączone do niniejszej pracy doktorskiej). Zastosowanie inhibitora AMPK nie wpłynęło na procentowy wzrost liczby komórek apoptotycznych w porównaniu do komórek traktowanych tylko RK. Zagadnienie to wymaga jednak dalszej i bardziej dokładnej analizy, ze względu na złożoność procesu i ścieżki sygnalizacyjnej, w który zaangażowane są także kinazy mTOR oraz PI3K.

Obecność zmodyfikowanej pochodnej adenozy w komórkach powoduje również powstawanie purynosomu, co ma miejsce w efekcie zaburzonej syntezy puryn. Pirofosforan fosforybozylu (PRPP) jest bezpośrednim substratem dla enzymu należącego do tej dużej jednostki organizacyjnej (**Rys. 8**). Purynosom został odkryty w 2008 roku i reprezentuje nowy poziom metabolicznej organizacji enzymów w komórkach, odpowiedzialny jest za regulację metabolizmu puryn na drodze energochłonnej ścieżki *de novo* [248]. Purynosom składa się z dziesięcioetapowej reakcji katalizowanej przez sześć enzymów (opisane w **tabeli nr 1**, w podrozdziale 1.3.5.), prowadzącej do syntezy monofosforanu inozyny (IMP). Purynosom został sklasyfikowany jako *metabolon*, ponieważ stanowi tymczasowy mechanizm regulacyjny, wykorzystywany przez komórki w celu zaspokojenia ich bioenergetycznych i biomolekularnych potrzeb.

Metabolity purynowe nie tylko służą jako budulec dla DNA i RNA, ale także dostarczają komórkom niezbędnej energii i kofaktorów, które sprzyjają ich przetrwaniu i proliferacji. Poznanie w jaki sposób metabolizm puryn może napędzać progresję nowotworu, ujawniło nowe perspektywy dla wyjaśnienia zagadnienia jak komórka reguluje zapotrzebowanie na puryny. Ustalenie mechanizmów deregulacji metabolizmu puryn w chorobach, takich jak nowotwory, otwiera możliwości opracowania nowych strategii terapeutycznych [100].

Dotychczas badania obrazujące asocjację purynosomów, prowadzono stosując głównie wizualizację mikroskopową. W niniejszej pracy, po raz pierwszy pokazano zastosowanie innej metody wykrywania i aktywności purynosomów, tj. cytometrię przepływową. Wykorzystując immunofluorescencję (znakowane przeciwciała) i transfekcję komórek z wykorzystaniem wektorów ekspresyjnych, po raz pierwszy pokazano też, jak specyficzny związek, RK, wpływa na aktywację tego multienzymatycznego kompleksu.

Przeanalizowano aktywację trzech enzymów tworzących rdzeń purynosomu w komórkach ssaków - amidotransferazy PRPP (PPAT), trójfunkcyjnego białka biosyntezy puryn - adenozy-3 (GART) oraz syntazy fosforybozylformyloglicynoamidyny (FGAMS). Zaobserwowano, że w komórkach traktowanych RK wzrasta aktywność enzymów PPAT i FGAMS, co potwierdza ich udział w tworzeniu purynosomów, natomiast maleje GART (**Rys. 8**). Może to wynikać z faktu, że GART przeprowadza niesekwencyjne etapy szlaku *de novo* (tzn. reakcje nie zachodzą jedna po drugiej, ponieważ enzym ten katalizuje reakcje numer 2, 3 oraz 5; **Schemat 21** w podrozdziale 1.3.5.) w szlaku biosyntezy puryn *de novo*. Ponadto PPAT i FGAMS odgrywają kluczową rolę w szlaku *de novo*. Uważa się, że PPAT jest pierwszym enzymem ograniczającym tempo reakcji zachodzących na drodze *de novo*. Istnieje również hipoteza, że regulacja allosteryczna enzymu PPAT stanowi swoisty przełącznik pomiędzy szlakiem *de novo* i rezerwowym. Z kolei enzym FGAMS jest odpowiedzialny za powstawanie substratu potrzebnego do reakcji niesekwencyjnej, prowadzonej przez GART w biosyntezie puryn [249]. Ostatnie badania wskazują również, że PPAT i FGAMS oddziałują z białkiem Hsp90. Wykazano, że, białko to prowadzi do „przetwarzania” tych dwóch enzymów w celu promowania asocjacji kompleksu, przy jednoczesnym niestabilizowaniu rdzenia purynosomu. Może to być powodem, dla którego nie obserwowano aktywacji enzymu GART podczas analizy cytometrii przepływowej (**Rys. 8B**) [249].

Ponadto wiele badań wskazuje na wzrost aktywności szlaku biosyntezy puryn *de novo* podczas progresji cyklu komórkowego. Liczba komórek zawierających purynosomy ulega fluktuacji w trakcie cyklu komórkowego, dlatego może to być powodem obserwacji wzrostu ekspresji GART, tylko podczas analizy Western Blot, a nie udało się tego wykazać podczas analizy cytometrycznej. Zróżnicowanie w zależnym od cyklu komórkowego procesie tworzenia purynosomów zaobserwowano również pomiędzy różnymi modelami komórkowymi, co można przypisać różnicom w mechanizmie biosyntezy puryn [123]. Potwierdzeniem powyższych rozważań są także rezultaty uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy proteomicznej (**Rys. 9**).

Jednym z dowodów na aktywność purynosomu może być pojawienie się IMP w ekstraktach komórkowych (**Rys. 7B i tabela uzupełniająca S2**), który następnie jest przekształcany do AMP przez być może inny enzym ścieżki *de novo*. IMP może również powstawać w wyniku przekształcenia hipoksantyny przez HGPRT, reakcji, która zachodzi podczas szlaku rezerwowego biosyntezy puryn.

Ponadto, wszystkie wyniki uzyskane przez mnie, świadczą nie tylko o tym, że purynosom jest przejściową, bardzo dynamiczną strukturą powstającą w specyficznych warunkach [222], ale również, że RK jako czynnik zewnętrzny, jest zaangażowany w metaboliczny przepływ puryn.

Jednoczesne traktowanie ADKi i RK powodowało znaczną aktywację formowania purynosomu, co korelowało z poważnym deficytem puryn, spowodowanym blokadą aktywności ADK. Wysokie stężenie antymetabolitu RK powodowało upośledzenie metabolizmu puryn ukierunkowanego na konwersję analogu adenozyiny, a nie samej adenozyiny (**Rys. 8**). Sama obecność ADKi indukowała zaburzenie aktywacji purynosomów, choć nie było to istotne statystycznie, wskazując jedynie na perturbacje związane z brakiem fosforylacji adenozyiny przez ADK; jej funkcje są wówczas realizowane przez inne, znacznie wolniejsze kinazy, takie jak kinaza adenylanowa, AMPK i kinazy pokrewne [250].

Początkowa aktywacja purynosomów i ich grupowanie (**Rys. 8**), może być wynikiem odpowiedzi na obecność hipoksantyny i jej wpływ na nukleotydy w puli komórkowej [121]. W niskich stężeniach (1-10  $\mu\text{M}$ ) hipoksantyna jest w stanie hamować szlak *de novo* poprzez wpływ na poziom adenozyiny w komórce. Prawdopodobnie moduluje ona aktywność PPAT, jak również syntetazy PRPP [121], co również zaobserwowano w trakcie realizacji badań do niniejszej pracy doktorskiej.

Ponadto, w ekstrakcie komórkowym wykazano obecność [ $^{13}\text{C}$ ]IMP, który jest końcowym produktem szlaku *de novo* (**Rys. 7A-C**). Wydaje się, że aktywacja asocjacji purynosomów spowodowana jest negatywnym wpływem RK na metabolizm puryn poprzez jego zaburzenie w wyniku wyczerpania ATP i nadmiaru metabolitów pośrednich. Dodatkowo wpływ rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów oraz obniżenie poziomu ATP można powiązać z zarówno przestrzenną jak i funkcjonalną kolokalizacją, purynosomów i mitochondriów. Istnieje bowiem synergia między zależną od ATP syntezą puryn przez purynosomy, a zapotrzebowaniem na prekursorzy nukleotydów purynowych dla produkcji energii w mitochondriach [100, 108].

W warunkach fizjologicznych, większość puryn generowana jest przez szlak rezerwowy, opierający się na recyklingu zdegradowanego DNA lub RNA, co prowadzi do

uwolnienia wolnych zasad purynowych w postaci adeniny, guaniny i hipoksantyny. Następnie, powyższe zasady przyłączane są do pirofosforanu fosforybozylu (PRPP), tworząc monofosforany nukleozydów purynowych (AMP, IMP, GMP). PRPP stanowi krytyczny prekursor biosyntezy puryn, ponieważ odgrywa ważną rolę w utrzymaniu zarówno biosyntezy *de novo*, jak i szlaku rezerwowego [251].

Kiedy zapotrzebowanie na puryny, przekracza możliwości ich odzyskiwania na drodze szlaku rezerwowego, tj. w komórkach intensywnie proliferujących lub nowotworowych, następuje aktywacja biosyntezy puryn *de novo* [108]. Ścieżka ta wykorzystując aminokwasy (glutamina, kwas asparaginowy, glicyna), kofaktory (NAD<sup>+</sup>) oraz ATP i GTP, prowadzi do przekształcenia PRPP w IMP, po czym następuje jego podział do AMP i GMP. Reakcje tych przemian metabolicznych katalizowane są przez sześć enzymów tworzących w cytoplazmie komórek, metabolom określane jako purynosom [252].

Metabolomy uważane są za tzw. biosyntetyczne „gorące punkty” (ang. „hotspots”) w komórce. Jednakże, eksperymentalne wykazanie ich obecności i funkcji jest trudnym zadaniem [252].

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono podejście eksperymentalne, polegające na nadaniu badanemu związkowi, RK, izotopowej „etykiety”. Znacznik ten umożliwił prześledzenie przemian metabolicznych, którym RK uległ w komórce oraz wyznaczenie metabolitów pośrednich, które w wyniku tych przemian powstały. Ponadto, wykazał on, że rybozyd kinetyny jako pochodna adenozy, zaburzyła biosyntezę puryn, przyczyniając się do powstania modyfikacji w DNA. Stanowi to potwierdzenie wyników licznych badań, wskazujących, że antymetabolity oraz powstające w wyniku ich konwersji, endogenne metabolity pośrednie, indukują śmierć komórki [253].

Kolejne metody eksperymentalne, wykorzystane w powyższych badaniach oraz umożliwiające obserwację metabolomu, stanowiły mikroskopia konfokalna oraz cytometria przepływowa. Zastosowane przez nas analizy cytometryczne, okazała się być innowacyjnym podejściem oraz bardziej precyzyjnym narzędziem do określenia wpływu RK na enzymy tworzące tzw. rdzeń purynosomu (PPAT, GART i FGAMS). Dotychczas, w badaniach nad purynosomem wykorzystywano wizualizację mikroskopową [108], umożliwiającą pokazanie przestrzennego rozmieszczenia purynosomów w sieci mitochondrialnej.

Biosynteza puryn *de novo* nie tylko dostarcza prekursorów nukleotydów niezbędnych do mitochondrialnej produkcji ATP, ale również odwrotnie, sama wymaga ATP do swojego działania. Wskazuje to na istnienie synergicznej relacji pomiędzy purynosomami i

mitochondriami i daje początek rozważaniom czy taka zależność funkcjonalna może być kluczowa dla komórek, które preferencyjnie wykorzystują fosforylację oksydacyjną do produkcji ATP.

Synteza nukleotydów jest tylko jednym z wielu szlaków biosyntezy, od których zależy wzrost komórki. Aby metabolizm puryn mógł dostarczać substratów do kolejnych reakcji enzymatycznych, musi być uzupełniony przez inne szlaki metaboliczne, takie jak glikoliza, metabolizm aminokwasów oraz mitochondrialny, z których wszystkie stanowią potencjalne cele terapeutyczne.

Wyniki moich badań, opisane w podrozdziale 4.1., wykazały wpływ rybozydu kinetyny na metabolizm nukleozydów purynowych. Stanowiły one istotny wstęp do bardziej skomplikowanych i zaawansowanych analiz. Potwierdziły też, że związek ten działa na wielu poziomach organizacji komórki, zaburzając nie tylko kluczowy szlak biosyntezy *de novo*, ale również wpływając negatywnie na funkcjonowanie mitochondriów, metabolizm komórek nowotworowych oraz prowadząc do indukcji śmierci komórkowej.

Zagadnienie metabolomiki w kontekście badania mechanizmu działania rybozydu kinetyny, jest dalej rozbudowywane o kolejne analizy (publikacja w przygotowaniu: *Involvement of kinetin riboside as an adenosine derivative in the metabolic flux determining the serious cellular consequences leading to apoptosis*). Obejmują one między innymi ilościową analizę składu metabolitów (ang. Metabolite Set Enrichment Analysis), tak aby możliwe było ustalenie wzorców zmian metabolitów (analiza ilościowa) powstających w wyniku przemian enzymatycznych RK. Dzięki wstępnej analizie, udało się stwierdzić, że obecność RK w komórkach nowotworowych, wpłynęła również na metabolizm aminokwasów czy pirymidyn (dane niepokazane). Ponadto moim celem jest również rozbudowanie analizy proteomicznej, która obejmie identyfikację białek związanych nie tylko z formowaniem purynosomu, ale także z procesami omawianymi w dalszej części *Dyskusji* niniejszej rozprawy doktorskiej.

## **5.2. Wpływ rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów**

Ostatnie badania związane z wykorzystaniem związków małowcząsteczkowych w terapiach przeciwnowotworowych, wykazały, że ukierunkowanie na określone struktury molekularne lub całe szlaki metaboliczne, silnie zaburza funkcjonowanie komórek nowotworowych [254]. Związki takie posiadają specyficzny mechanizm działania, który często jest bardzo złożony i może polegać na aktywacji lub inaktywacji szlaków biologicznych związanych z regresją nowotworu. Związki małowcząsteczkowe mogą również



wpływać na aktywację maszynerii komórkowej poprzez bezpośrednie oddziaływanie na mitochondria [255]. Zastosowanie małych związków, w tym pochodnych nukleozydów, może być obiecującym podejściem terapeutycznym. Polega ono na aktywacji odpowiedzi komórkowej na stres oraz utrzymaniu równowagi metabolicznej i energetycznej w komórce [4, 5].

Mitochondria odgrywają kluczową rolę w regulacji metabolizmu energetycznego komórki, ponieważ kontrolują wytwarzanie ATP, homeostazę redoks oraz szlak apoptotyczny. Mitochondria są uważane za ważny element w procesie onkogenezy, poprzez elastyczne przełączanie szlaków metabolicznych, pomiędzy glikolizą a fosforylacją oksydacyjną (OXPHOS). Ta zdolność w ich metabolicznym fenotypie, zapewnia przeżycie komórek nowotworowych i kompensuje wysokie zapotrzebowanie na energię [256]. W ostatnim czasie opracowano wiele strategii ukierunkowanych na mitochondria, w tym zastosowanie związków zaburzających łańcuch transportu elektronów (ETC, ang. electron transport chain), szlak apoptotyczny lub homeostazę RFT [255]. Wiele inhibitorów ETC, takich jak metformina, tamoksyfen, bursztynian  $\alpha$ -tokoferylu ( $\alpha$ -TOS) i 3-bromopirogronian (3BP), działa poprzez zaburzanie funkcji kompleksów oddechowych ETC i indukowanie wysokiego poziomu RFT, w celu zabicia komórek nowotworowych. Z kolei białka BCL-2, BCL-xL, Bax i Bak odgrywają ważną rolę w wewnątrzpochodnym szlaku apoptotycznym, a związki takie jak Gossypol, Navitoclax, ABT-737 i  $\alpha$ -TOS działają jak mimetyki domen BCL-2, co umożliwia aktywację mitochondrialnej sygnalizacji apoptotycznej. Łańcuch transportu elektronów jest głównym miejscem produkcji RFT, a wysoki poziom stresu oksydacyjnego powoduje uszkodzenie komórek. Kapsaicyna, kastycyna i mirycetyna wykazują aktywność przeciwnowotworową poprzez zwiększanie generacji RFT, co prowadzi do zaburzenia potencjału błony mitochondrialnej w komórkach nowotworowych [255].

Obecnie, wyzwaniem jest fakt, że komórki nowotworowe mogą również nabywać fenotyp hybrydowy, co umożliwia im wykorzystywane zarówno glikolizy, jak i OXPHOS. Fenotyp ten ułatwia plastyczność metaboliczną komórek nowotworowych, a w szczególności inwazyjność, tworzenie przerzutów i oporność na terapię [256]. Dlatego też poszukiwanie nowych terapii opartych o związki upośledzające funkcje mitochondriów, stanowi duże wyzwanie, ale też posiada wiele ograniczeń, związanych z wrażliwością komórek nowotworowych na leki [257].

Rozpatrując metabolizm komórek nowotworowych w szerszym kontekście, a nie tylko z poziomu mitochondriów, należy pamiętać, że właściwości metaboliczne komórek nowotworowych są zmienione w stosunku do komórek prawidłowych [258, 259]. W

przypadku zmienionej aktywności metabolicznej komórek nowotworowych, obowiązują dwa następujące pojęcia: "przeprogramowanie metaboliczne" oraz "onkometabolicy". Drugie z nich jest stosunkowo nowym terminem i odnosi się do udziału metabolitów w powstawaniu fenotypu złośliwego.

W niniejszej pracy doktorskiej skupiono się przede wszystkim na zagadnieniu "przeprogramowania metabolicznego", które obejmuje takie ścieżki sygnalizacyjne, które są wzmacniane lub tłumione przez mutacje nowotworowe i inne czynniki, jak pojawienie się czynnika zewnętrznego [259]. Klasycznym przykładem „przeprogramowanego” szlaku metabolicznego w nowotworach jest efekt Warburga lub inaczej glikoliza tlenowa. Promuje on zwiększony anabolizm, który obejmuje syntezę nukleotydów, aminokwasów i lipidów, oraz wpływa na ekspresję genów w sposób zależny od metabolizmu, aby wspierać ich proliferację i utrzymać homeostazę [260].

Komórki nowotworowe posiadają podwyższoną zdolność wychwytu glukozy i opierają swoje funkcjonowanie i wzrost, głównie na glikolizie, nawet w obecności tlenu i w pełni funkcjonalnych mitochondriów [148]. Zjawisko to, znane jako efekt Crabtree (**Schemat 25**), jest jedną z wielu strategii metabolicznych i zapewnia przeżycie w niekorzystnych warunkach metabolicznych [141]. Jest ono także interpretowane jako spadek respiracji mitochondrialnej wraz z wprowadzeniem substratu glikolizującego (np. glukozy). Choć mechanizm, w jaki komórki nowotworowe poddają się efektowi Crabtree, pozostaje nieznanym, zakłada się, że wiele czynników jest zaangażowanych w tę zmianę. Między innymi, jedna z hipotez sugeruje, że efekt Crabtree występuje, gdy enzymy glikolityczne (kinaza fosfoglicerynowa i kinaza pirogronianowa) konkurują o wolny cytoplazmatyczny ADP z mitochondriami. Jeśli glikoliza jest nadaktywna, może, teoretycznie, znacząco zmniejszyć rolę mitochondriów w kwestii pobierania ADP (**Schemat 25**). Ze względu na to, że jest ono jednym z substratów fosforylacji oksydacyjnej, a tym samym jednym z substratów dla syntazy ATP, to w konsekwencji oddychanie byłoby obniżone [143]. Efekt Crabtree w komórkach nowotworowych może być jednak wyeliminowany przez dodanie fosforanu (Pi) *in vitro* i z tego powodu został on zaproponowany jako faktyczny czynnik wyzwalający to zjawisko metaboliczne [261]. Wydaje się to być zgodne z gwałtownym spadkiem poziomu Pi obserwowanym po dodaniu glukozy do komórek nowotworowych [262].

Choć glikoliza jest stosunkowo mało wydajna w generowaniu ATP w porównaniu z OXPHOS [140], to dostarcza ona wystarczającej ilości produktów do biosyntezy nukleotydów, NADPH, NADH i aminokwasów [263]. Wykazano, że podłoże zawierające glukozę (zarówno wysokie, jak i niskie stężenia) stanowi optymalne środowisko dla

prolifracji komórek nowotworowych i inwazji guza, ale upośledza cytotoksyczność leków terapeutycznych i uniemożliwia ocenę ich skuteczności [141, 264]. Z tym utrudnieniem zetknęłam się również w moich badaniach, testując związki o potencjalnym wpływie na dysfunkcję mitochondriów. Dlatego też, aby pokonać ograniczenia efektu Crabtree i zbadać toksyczność mitochondrialną indukowaną lekami, należy „przekształcić” metabolizm energetyczny komórek nowotworowych. Powszechnie stosowaną strategią zwiększania toksyczności związków, jest zastąpienie glukozy galaktozą w podłożu hodowlanym jako jedynym utleniającym substratem [265]. W komórkach hodowanych w takich warunkach dochodzi do powolnej oksydacji galaktozy podczas glikolizy, przez co zmuszone są one do aktywacji mitochondrialnej OXPHOS w celu wytworzenia ATP i stają się bardziej wrażliwe na toksyny mitochondrialne [266]. Dotychczas ta strategia badawcza była testowana wyłącznie w kontekście dobrze poznanych mitotoksykantów, w tym inhibitorów łańcucha oddechowego lub leków powodujących tzw. polekowe uszkodzenie wątroby (głównie wykazujących działanie przeciwcukrzycowe) [267]. Obecnie znaczny rozwój zaawansowanych technologii umożliwił dokonanie nowych odkryć związanych z metabolizmem nowotworów, poprzez stosowanie ilościowego oznaczania metabolitów (np. analiza NMR) lub pomiar aktywności szlaków metabolicznych (badania z wykorzystaniem izotopów). Możliwe też stało się zintegrowanie tego typu badań z genomiką funkcjonalną, w celu lepszego zrozumienia słabych punktów metabolicznych komórek nowotworowych [259]. Niniejsze badania koncentrowały się jednak na tym, jak zewnątrzpochodny związek wpływa na funkcjonowanie komórki i mogą one służyć jako wstęp do bardziej szczegółowych analiz związanych z wpływem związku na indukcję różnych rodzajów śmierci komórkowych.

N<sup>6</sup>-furfuryloadenozyna (RK), będąca pochodną puryny, wpływa na metabolizm komórek nowotworowych i ich bioenergetykę poprzez ingerencję w metabolizm puryn, co zostało przedyskutowane powyżej. Wykorzystując odpowiedni model badawczy, tj. komórki HepG2 hodowane w obecności galaktozy, starano się udowodnić, że RK indukuje apoptozę poprzez aktywację wewnątrzpochodnego szlaku związanego bezpośrednio z mitochondriami.

Jak już wspomniano, analogi nukleozydów purynowych są ważną klasą leków stosowanych w leczeniu nowotworów. Antymetabolity to rodzina związków, które są podstawą w chemioterapii nowotworów, a ich struktury chemiczne są podobne do folianów lub nukleotydów, które są budulcem DNA [268].

RK wykazuje działanie przeciwnowotworowe i znacząco zaburza równowagę energetyczną w komórkach, indukuje genotoksyczny stres komórkowy oraz wykazuje silne działanie antyproliferacyjne i apoptogenne wobec różnych ludzkich linii komórkowych

nowotworów: HepG2 (nowotwór wątroby), T98G i A172 (glejak wielopostaciowy), T47D (nowotwór piersi) [93], MIA PaCo-2 (nowotwór trzustki), A375 (czerniak), HCT-116 oraz HT29 (nowotwór jelita grubego) [68]. RK zaburza potencjał błony mitochondrialnej (MMP), indukuje uwalnianie cytochromu c i aktywuje kaspazę-3 [94]. Wykazano, że ekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2 ulega zmniejszeniu, podczas, gdy ekspresja proapoptotycznego białka Bax ulega zwiększeniu pod wpływem RK. Wykazano również, że RK jest silnym inhibitorem CCND2, którego aktywacja prowadzi do deregulacji cyklin D1 i D2 [68]. Ponadto, efekty te wydają się być selektywne i promują śmierć w komórkach nowotworowych [82]. RK i kilka pochodnych purynowych, które są szeroko stosowane w leczeniu nowotworów, mają specyficzny i unikalny sposób działania, który może obejmować aktywację odpowiedzi komórkowej na stres i utrzymanie równowagi metabolicznej komórek [4]. Mechanizm działania analogów puryn, opisany w podrozdziale 5.1., prowadzi do śmierci komórki i obejmuje wyłącznie ufosforylowane metabolity, których aktywność jest zależna od kinazy adenozynowej (ADK), a także pozostałych kinaz wchodzących w skład szlaków: rezerwowego, *de novo* i katabolicznego, oraz wymaga wewnątrzkomórkowego gromadzenia mono-, di- i trójfosforanów [88].

W niniejszej pracy wykazano, że zastosowanie inhibitora ADK całkowicie hamuje apoptozę i cytotoksyczność indukowaną przez RK, co sugeruje, że selektywność wobec komórek nowotworowych może być osiągnięta w oparciu o znaną nadekspresję. Sugeruje to również, że bioaktywacja RK poprzez metaboliczną konwersję do formy nukleotydowej jest niezbędna dla jego cytotoksyczności [68]. Poza zastosowaniem w chemioterapii, wykazano, że RK i jego pronukleotydy aktywują także związaną z chorobą Parkinsona, kinazę serynowo-treoninową PINK1 (ang. PTEN-induced putative kinase 1), niezależnie od depolaryzacji błony mitochondrialnej. Podkreśla to potencjał zmodyfikowanych nukleozydów i ich proleków (fosforanowych), jako środków leczniczych w chorobach neurodegeneracyjnych [218].

W dotychczasowych badaniach, znane związki będące mitotoksykantami, takie jak rotenon, oligomycyna czy FCCP, wykazywały silniejsze działanie na komórki rosnące w podłożu zawierającym galaktozę i obserwowano znaczny spadek żywotności komórek, w porównaniu z komórkami rosnącymi w podłożu glukozowym [147]. Podobne efekty obserwowano w przypadku RK. Wyniki badań porównano z wynikami uzyskiwanymi w komórkach nowotworowych poddanych działaniu metforminy, która jest uważana za potencjalny środek przeciwnowotworowy i adiuwant chemioterapeutyczny [263, 269]. W porównaniu z RK, metformina ma inną strukturę chemiczną, jest lekiem z grupy biguanidów,

ale badania w warunkach hodowlanych w obecności glukozy, również napotkały kilka ograniczeń. Pozbawienie komórek glukozy nasila przeciwnowotworowe działanie metforminy, prowadząc do zaburzeń bioenergetyki komórek poprzez zmniejszenie produkcji ATP i hamowanie szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za przeżycie komórki [148, 263].

W niniejszej pracy rozszerzono wcześniejsze obserwacje dotyczące aktywności przeciwnowotworowej RK. Przeprowadzono serię eksperymentów porównujących działanie RK w komórkach HepG2 hodowanych zarówno w podłożu glukozowym, jak i galaktozowym i wykazano jego silniejsze i szybsze działanie w warunkach wymuszających OXPHOS. Ponadto, efekt Crabtree nie jest ograniczony jedynie do komórek hodowanych w podłożu wysoko glukozowym, ale występuje również w komórkach hodowanych w podłożu nisko glukozowym [141]. Zostało to potwierdzone również w naszych badaniach. Podstawowym podłożem hodowlanym dla komórek HepG2 jest pożywka EMEM, które zawiera 1000 mg/l D-glukozy i według dostępnych danych, jest już uważana za podłoże o niskiej zawartości glukozy. Tak więc, wszystkie zaprojektowane eksperymenty mające na celu porównanie zachowania się komórek nowotworowych w obecności glukozy, były prowadzone w tym właśnie podłożu hodowlanym bez rozróżnienia na podłoże nisko- i wysoko glukozowe vs. podłoże zawierające galaktozę.

Potwierdzono, że RK indukuje toksyczność komórek, hamuje ich proliferację i inicjuje apoptozę zarówno w warunkach pozbawionych glukozy, jak i wzbogaconych w glukozę, przy czym efekt ten jest większy i szybszy w środowisku zawierającym galaktozę (**Rys. 10A, B**). Potwierdza to również zmniejszona liczba mitochondriów w komórkach poddanych działaniu RK i jednocześnie hodowanych w obecności galaktozy, ponieważ bioenergetyczna pojemność mitochondriów jest ściśle skorelowana z morfologią i patologią mitochondriów (**Rys. 10C-E; 17F**) [270].

W celu potwierdzenia, że komórki HepG2 hodowane w środowisku galaktozy są zmuszone do wykorzystania OXPHOS, przeprowadzono analizę fenotypowania energetycznego komórek, przy użyciu analizatora Seahorse Analyzer. Urządzenie to dokonuje pomiaru glikolizy, poprzez analizę wskaźnika zakwaszenia zewnątrzkomórkowego (ECAR), a także mierzy mitochondrialną fosforylację oksydacyjną na podstawie wskaźnika zużycia tlenu (OCR). Analiza odbywa się w czasie rzeczywistym i dotyczy żywych komórek.

Udowodniono, że metabolizm galaktozy nie jest w stanie zapewnić wystarczającej ilości ATP z glikolizy, dlatego wzrost wydolności tlenowej obserwowano w komórkach, które w przeważającej mierze opierają się na OXPHOS. Porównano wartości OCR i ECAR w

obu środowiskach hodowlanych, co wskazuje na wyższy potencjał ECAR komórek hodowanych w glukozie i większe wykorzystanie tlenu w galaktozie (**Rys. 10H, I**).

Stosując fluorescencyjny analog glukozy, 2-NBDG, wykazano, że jego pojawienie się w podłożu galaktozowym (**Rys. 10G**) natychmiast zmuszało komórki do glikolizy. Pobranie glukozy przez komórki odzwierciedla wzrastająca fluorescencja, która była proporcjonalna do wzrastającego stężenia RK [271]. Oznacza to, że wychwytywanie 2-NBDG przez komórki, może być stosowane do pomiaru zmian podczas glikolizy i ma potencjał do wykorzystania we wczesnych fazach opracowywania leków (**Rys. 10F, G**). Może to świadczyć o tym, że komórki aktywnie ulegają efektowi Crabtree, gdy w środowisku komórkowym pojawiają się czynniki cytotoksyczne.

Powyższe wyniki wskazują, że żywotność komórek HepG2 po traktowaniu RK jest ściśle związana z indukcją śmierci na drodze wewnątrzpochoźnego szlaku apoptotycznego (**Rys. 10B, 11A**). W celu porównania efektu działania RK w komórkach, przeanalizowano indukcję apoptozy/nekrozy w różnych liniach komórkowych wykazujących efekt Crabtree i udowodniono, że zamiana glukozy na galaktozę wpływa na toksyczność RK. Wykazano również, że obserwowany efekt zależy od typu komórki (**Rys. 11A-D**). Inne badania wykazały, że zwiększona śmierć komórkowa komórek raka piersi występowała, gdy były one traktowane metforminą przy jednoczesnym braku glukozy w podłożu hodowlanym [272]. Ponadto, stosując tylko pożywkę z glukozą, potwierdzono, że nasilenie toksycznego działania RK jest zależne nie tylko od badanych stężeń, ale również od wydłużonego czasu inkubacji (**Rys. 11F**).

Leki, które wpływają na metabolizm energetyczny komórek, uważane są za obiecujące środki w terapii przeciwnowotworowej [273]. Wśród tych leków znajduje się 2-deoksy-D-glukzoza (2-DG), będąca inhibitorem heksokinazy (HK), która fosforyluje glukozę w pierwszej reakcji, a także ogranicza tempo glikolizy (**Schemat 37**). Działanie 2-DG ma na celu zatrzymanie glikolizy poprzez hamowanie jej pierwszej reakcji, a także zaburza reakcje anaboliczne [134, 274]. Stwierdzono także, że 2-DG może zmniejszać zużycie tlenu i znosić efekt Crabtree [275, 276]. Z drugiej strony, w oparciu o obserwacje Otto Warburga, 2-DG nie może być traktowana jako środek monoterapeutyczny ze względu na jej przejściowy wpływ, ponieważ większość komórek nowotworowych ma zdolność do wykorzystywania alternatywnych źródeł węgla poprzez fosforylację oksydacyjną [134]. Ponadto, leczenie za pomocą 2-DG obniża potencjał antyoksydacyjny komórek nowotworowych i wywołuje stres energetyczny poprzez zmniejszenie przepływu metabolitów przez cykl kwasu cytrynowego (TCA) [277].

Zaobserwowano, że strategia oparta na substytucji cukrów z następującym po niej traktowaniem RK, jest bardziej efektywna w indukowaniu apoptozy, niż hamowanie glikolizy za pomocą 2-DG i jednoczesne traktowanie komórek RK (**Rys. 12A, B**). Zastosowanie 2-DG stanowi potwierdzenie obserwacji, że rybozyd kinetyny wpływa na mitochondrialny szlak śmierci komórki, jednakże mechanizm działania 2-DG w komórkach nowotworowych jest bardzo złożony i wymaga dalszych badań. Bezpośrednie inhibicja glikolizy okazała się mniej skuteczna niż wymuszenie OXPHOS w komórkach, ale nadal związki, które celują zarówno w glikolizę, jak i w fosforylację oksydacyjną, stanowią obiecujące przeciwnowotworowe podejście terapeutyczne. Potwierdzeniem tego są badania, które wykazały, że połączenie metforminy i 2-DG, powoduje obniżenie poziomu ATP i wykazuje synergistyczny efekt terapeutyczny w stosunku do komórek raka trzustki [255].

Analizę zmian potencjału błony mitochondrialnej przeprowadzono za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej (**Rys. 13**). Podobnie do wyników uzyskanych w teście apoptozy/nekrozy, zbadano wpływ RK na zmiany stanu redoks mitochondriów w komórkach HepG2, rosnących w podłożu galaktozowym i glukozowym. Zaobserwowano silny efekt działania RK w podłożu zawierającym galaktozę, który powodował depolaryzację błony mitochondrialnej (**Rys. 13A-D**). Dodatkowo potwierdzono, że komórki linii HepG2, najlepiej nadają się do analizy tego typu procesów, pod wpływem działania związków małocząsteczkowych, ze względu na zawartość dużej liczby mitochondriów [267].

Wielokrotnie wykazano, że RK może zaburzać równowagę energetyczną w komórkach w wyniku reakcji fosforylacji katalizowanej przez ADK, co jest kluczowe dla toksyczności rybozydu kinetyny [81, 117, 143, 254]. Wykazano również, że w odpowiedzi na indukcję RK w medium galaktozowym, komórki HepG2 ulegają rozległej apoptozie, co jest prawdopodobnie bezpośrednią konsekwencją gwałtownego spadku poziomu ATP w komórkach (**Rys. 13E**). Stwierdzono, że niski poziom glukozy i leczenie komórek nowotworowych metforminą prowadzi do śmierci komórek poprzez zmniejszenie produkcji ATP [274], a takie wyniki obserwowano również podczas traktowania komórek 2-DG, przy jednoczesnej hodowli w warunkach odstawienia glukozy [150]. RK obniża poziom komórkowego ATP, co może być skorelowane z zaburzeniami stanu oddechowego związanego z syntezą ATP. Dlatego, aby to potwierdzić dokonano oceny fizjologicznego wpływu rybozydu kinetyny na komórki nowotworowe. Wiązało się to z wyznaczeniem parametrów określających status energetyczny mitochondriów komórek rosnących w pożywce zawierającej glukozę i traktowanych RK, przy wykorzystaniu elektrody tlenowej

Clarka (system Oxygraph Hansatech). W efekcie zaobserwowano, że RK powoduje zaburzenie funkcjonowania łańcucha oddechowego, a tym samym przyczynia się do zmniejszenia prędkości zużycia tlenu. Największe zmiany dotyczyły stanu 3, bezpośrednio związanego z syntezą ATP, co może być skutkiem zmniejszonego zapotrzebowania komórek na ATP lub inaktywacji syntazy ATP (**Rys. 15E**).

Podobną odpowiedź obserwowano w przypadku inhibitorów łańcucha transportu elektronów [147]. Istnieją także inne ADK-zależne pochodne adenozyne, powodujące spadek ATP, takie jak 2-chloro- i 8-chloroadenozyne [236], które zaburzają syntezę ATP. Działają one poprzez strukturalne hamowanie mitochondrialnej syntazy ATP.

Ostatecznie, w niniejszej pracy, udowodniono, że RK w pożywce galaktozowej wyzwała śmierć komórek na drodze apoptozy, nie tylko poprzez zaburzenie wytwarzania ATP w komórce (**Rys. 13A-D**), ale również poprzez indukcję stresu oksydacyjnego (**Rys. 14A**). RFT są wewnątrzkomórkowymi indywiduami chemicznymi, które zawierają tlen z niesparowanym elektronem lub wiązania O-O, a należą do nich między innymi: anion nadadtlenkowy ( $O_2^-$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) i rodnik hydroksylowy (OH $\cdot$ ). Komórki nowotworowe mają wysoki poziom stresu oksydacyjnego [136], który jest wywołany przez nagromadzone RFT, co może być indukowane przez hipoksję, defekty metaboliczne i stres retikulum endoplazmatycznego [269]. Komórki nowotworowe mogą utrzymywać ekspresję zmiataaczy RFT (białek antyoksydacyjnych) na stałym, wysokim poziomie, w odpowiedzi na podwyższone stężenie wolnych rodników. Dlatego też promowanie mitochondrialnej produkcji RFT w celu indukcji śmierci komórek nowotworowych może wzmocnić działanie chemioterapii [79]. W odpowiedzi na stres energetyczny indukowany przez RK, doszło do powstania produktów ubocznych metabolizmu tlenowego, wewnątrzkomórkowych RFT (poziom generacji wewnątrzkomórkowych RFT analizowano za pomocą barwienia  $H_2DCFDA$ ), ze znacznym obniżeniem poziomu zredukowanego glutationu w komórkach HepG2 (**Rys. 14B**).

Zaobserwowano, że pozbawienie glukozy i zastąpienie jej galaktozą (**Rys. 14A**) samoistnie podnosi poziom RFT, poprzez zmniejszenie ich degradacji przy jednoczesnym zwiększeniu ich generacji. Glukoza w podłożu hodowlanym jest niezbędna do detoksykacji RFT [134], ale wzrastające stężenie RK zaburza ten proces, co dodatkowo nasila jego cytotoksyczność względem komórek (**Rys. 14A**). Odwrócenie jego działania możliwe było poprzez zastosowanie inhibitora ADK, co po raz kolejny potwierdziło rolę tego enzymu. W przypadku ludzkich komórek fibroblastów MRC-5, indukcja stresu oksydacyjnego pod



wpływem RK nie była obserwowana (**Rys. 14E**), co potwierdza wcześniejsze doniesienia dotyczące selektywności związku [82].

Przeanalizowano również mitochondrialną produkcję RFT (**Rys. 14C, D**). Zaobserwowano wzrost poziomu nadtlenu wraz ze wzrostem stężenia RK. Produkcja RFT przez mitochondria prowadzi do uszkodzenia mtDNA i mutacji, co z kolei może prowadzić do postępującej dysfunkcji łańcucha oddechowego i w konsekwencji dalszego wzrostu produkcji RFT [278].

Wykazano, że zmiany w metabolizmie glukozy oraz pojawienie się czynnika zewnętrznego, jakim jest RK, zaburzają prawidłowe funkcjonowanie komórek i wpływają na cytoplazmatyczny i mitochondrialny potencjał redoks oraz generację ATP [279]. Wydawać by się mogło, że obserwacje takie jak zwiększenie stresu oksydacyjnego przy jednoczesnym zmniejszeniu MMP są sprzeczne. Jednak kilka związków, takich jak kapsaicyna, kastycyna i mirycetyna, wykazuje ten mechanizm działania i aktywność przeciwnowotworową poprzez zwiększenie generacji RFT, prowadząc do zaburzenia mitochondrialnego potencjału transmembranowego w komórkach nowotworowych [255]. Wiele inhibitorów ETC, wspomnianych wcześniej, działa poprzez indukcję wysokiego poziomu RFT.

Rybozyd kinetyny powoduje śmierć komórkową na drodze apoptozy zależnej od mitochondriów. Mimo to, rozpoczęto analizę mającą na celu sprawdzenie czy związek zaangażowany jest również w promowanie innych rodzajów śmierci.

W związku z tym przeprowadzono eksperymenty, które wykazały, że RK powoduje także indukcję autofagii komórek HepG2. Autofagia jest wewnątrzkomórkowym procesem degradacyjnym, który ma miejsce w stresujących warunkach, takich jak np. uszkodzenie organelli, obecność nieprawidłowych białek i niedobór składników odżywczych. Mechanizm autofagii inicjuje powstawanie autofagosomów, które wychwytyją zdegradowane składniki, a następnie łączą się z lizosomami w celu recyklingu tych składników [165]. Proces ten odgrywa podwójną rolę w supresji, ale też promocji nowotworzenia, i może być obserwowany wraz z apoptozą w tej samej komórce i w tym samym czasie [280].

Wykazano, że RK indukuje autofagię w komórkach HepG2 (**Rys. 15A**), co poprzedza apoptozę. Analiza proteomiczna wykazała wzrost ekspresji białek związanych z procesem autofagii, w tym PARK7, które zaangażowane jest w regulację transkrypcji genów i obronę antyoksydacyjną (dane niepokazane). Być może wzrost ekspresji tego białka związany jest z ucieczką przed śmiercią komórkową, ponieważ PARK7 uważany jest za „czujnik redoks”, ochraniający komórki nowotworowe przed stresem oksydacyjnym [281].

Coraz częściej postrzega się te dwa procesy w sposób interaktywny, przy czym aktywacja lub inhibicja jednego z nich przez leki przeciwnowotworowe jest zawsze równoznaczne z przemianami drugiego. W konsekwencji oba mają wpływ na efekt działania zastosowanego związku, a przedłużająca się w komórkach autofagia prowadzi do indukcji programowanej śmierci komórki typu II (Mele, 2020). Przykładem związku, który może powodować podobny efekt jak RK, jest inny antymetabolit- fluorouracyl (5-FU), analog pirymidyny, który działa przede wszystkim jako inhibitor syntazy tymidylanowej. Indukuje apoptozę komórek wraz z autofagią poprzez aktywację szlaku p53-AMPK-mTOR. Działanie przeciwnowotworowe 5-FU może być znacznie poprawione przez nasilenie apoptozy w połączeniu z 3-metyloadenioną, powszechnie znanym i stosowanym inhibitorem autofagii [280].

Obserwowane zmiany morfologii mitochondriów pod wpływem RK, mogą również być powiązane z indukcją autofagii selektywnej, związanej z mitochondriami- tzw. mitofagią. Uważa się, że proces ten jest współodpowiedzialny wraz z procesami fuzji/fizji mitochondriów, za ich degradację [162]. Zaobserwowano, że RK w najwyższym z zastosowanych stężeń powoduje indukcję tego procesu, ale też przyczynia się do zaburzenia gospodarki wapnia (**Rys. 15C**). Podobnie jak doksoCYklina, RK powoduje deregulację poziomu wapnia, co prowadzi do wzrostu stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego, generacji RFT i indukuje apoptozę w komórkach HepG2 [282]. Co więcej, RK znacząco zaburza utrzymanie odpowiedniego poziomu NAD w komórce, co jest kluczowe dla modulacji komórkowego statusu redoks (**Rys. 15D**).

W moich badaniach wykorzystano także trójwymiarowe hodowle komórek Hepg2 *in vitro* (sferoidy), aby ocenić toksyczność i skuteczność działania rybozydu kinetyny. Kultury 3D wykazują cechy guza w jego wczesnej fazie wzrostu ze względu na wielokomórkową budowę oraz możliwości kontaktów między komórkami. Rybozyd kinetyny w przypadku sferoidów działa podobnie jak w kulturach 2D komórek HepG2 i powoduje obniżenie ich przeżywalności, a także wpływa na zaburzenie balansu energetycznego komórek, poprzez obniżenie potencjału błony mitochondrialnej, wzrost poziomu RFT oraz uszkodzenia mitochondriów (**Rys. 17**).

Wykorzystując komplementarne analizy oparte na komórkach, zbadano wpływ RK na funkcje mitochondrialne. Zwiększona toksyczność w komórkach nowotworowych przez odstawienie glukozy może również wskazywać, że wiele ścieżek, na które wpływa RK, wzmacnia się wzajemnie w celu promowania śmierci komórek nowotworowych. Powyższe badania pokazują, że zastosowany model metaboliczny (wykorzystanie galaktozy oraz

komórek HepG2), służy jako skuteczne narzędzie do wyjaśnienia dysfunkcji mitochondriów traktowanych toksycznymi związkami. Wykorzystanie galaktozy, która wymusza OXPHOS i omija efekt Crabtree, jest podejściem metodologicznym, które pozwala na lepsze badania przesiewowe leków skierowanych na mitochondria.

Moje wyniki sugerują, że plastyczność metaboliczna większości komórek nowotworowych stanowi wyzwanie w testowaniu leków indukujących upośledzenie funkcji mitochondriów. RK może wywoływać zaburzenia w deficycie energetycznym komórek nowotworowych, chociaż samo odstawienie glukozy nie jest oczywiście realnym podejściem terapeutycznym. Stworzenie modelu *in vivo* w ten sposób jest niemożliwe, ponieważ galaktoza, zastosowana w diecie, nie wpłynie na poziom glukozy w organizmie i nie można nią manipulować tak jak w hodowli komórkowej. Pojawiły się jednak propozycje potencjalnych podejść klinicznych, które naśladują podobne warunki poprzez jednoczesne stosowanie inhibitorów szlaku PI3K/Akt i metforminy [283].

Powyższy schemat eksperymentalny, nie został zaprojektowany w celu zbadania klinicznego efektu RK, ale w celu wykazania, że galaktoza w medium hodowlanym sprawia, że komórki stają się bardziej zależne od OXPHOS (zużycie tlenu podwaja się w medium galaktozowym), a tym samym stają się podatne na potencjalne toksyny mitochondrialne. Ponadto, użyto komórek HepG2 posiadających odpowiednie właściwości, predysponujące je do eksperymentów *in vitro* i do oceny indukowanej lekami, dysfunkcji mitochondriów.

Istnieje kilka zatwierdzonych przez FDA terapii przeciwnowotworowych, które są specyficznie ukierunkowane na mitochondria i ucieczkę od apoptozy, terapie te uzyskały obiecujące wyniki w badaniach klinicznych w różnych nowotworach [89, 90]. Obecne badania pozwoliły zrozumieć mechanizm oporności komórek nowotworowych na leczenie RK i wskazują, że wpływa on na wiele parametrów komórkowych (hamowanie proliferacji, stres oksydacyjny, fenotyp energetyczny komórek, indukcja apoptozy), co pośrednio prowadzi do stresu mitochondrialnego i zaburzeń metabolizmu energetycznego. Udowodniono, że pochodne puryny mogą być również skutecznym mitotoksykaniem i mogą być potencjalnie wykorzystane w terapiach bazujących na wrażliwości metabolicznej komórek nowotworowych.

Z pewnością wykazano pośredni wpływ RK na mitochondria, a tak szybka ścieżka stwarza możliwości dalszego zgłębiania tego tematu poprzez analizę kaskady reakcji enzymatycznych, które są związane między innymi z aktywacją szlaków onkogennych. Ta kompleksowa analiza wykazała, że wszystkie mechanizmy biorące udział w upośledzeniu funkcji mitochondriów, takie jak zaburzenie parametrów oksydacyjnych, depolaryzacja błony

mitochondrialnej, obniżenie poziomu ATP oraz indukcja apoptozy, są wynikiem działania RK.

Rybozyd kinetyny jest selektywnym inhibitorem proliferacji komórek nowotworowych oraz indukuje ich apoptozę poprzez aktywację szlaku wewnątrzpochodnego, bezpośrednio związanego z mitochondriami. Ukierunkowanie terapii na mitochondria, wydaje się być obiecującą strategią dla indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych. Aktywacja szlaku mitochondrialnego przywraca komórkowy metabolizm energetyczny do fenotypu charakterystycznego dla komórek nienowotworowych, a także promuje produkcję RFT przez mitochondria, co może zwiększać podatność komórek nowotworowych na apoptotyczną śmierć komórki. Istniejąca interakcja pomiędzy regulatorami apoptozy a mitochondrialnym metabolizmem energetycznym mitochondriów, powinna być zatem brana pod uwagę w poszukiwaniu nowych leków przeciwnowotworowych [284].

### **5.3. Wpływ rybozydu kinetyny na produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach glejaka wielopostaciowego**

Glejak wielopostaciowy (ang. glioblastoma multiforme; GBM) jest pierwotnym i najbardziej inwazyjnym nowotworem ośrodkowego układu nerwowego, występującym w populacji osób dorosłych [168], o charakterystycznej heterogenności genetycznej i wysokim stopniu złośliwości [285]. Glioblastomy mogą być klasyfikowane jako pierwotne lub wtórne [174], jednak istnieją różne podtypy, a najczęściej stosowaną metodą klasyfikacji (opracowaną przez Światową Organizację Zdrowia) tych nowotworów jest ich stopniowanie, polegające na łączeniu stopnia złośliwości z rodzajem nowotworu [230]. Najczęściej występującymi guzami GBM są guzy pierwotne, które rozwijają się z prawidłowych komórek glejowych, jednak istnieją dowody na to, że prekursorami GBM mogą być również neuronalne komórki macierzyste (ang. neural stem cells - NSCs) oraz komórki prekursorowe oligodendrocytów (ang. oligodendrocyte precursor cells - OPCs) [286]. Wykazano również, że glejaki niższego stopnia mają tendencję do różnicowania się, ale dopiero te IV stopnia, prowadzą do powstania glejaka i glejakomięsaka (ang. gliosarcoma), które reprezentują postacie o wysokiej ekspresji złośliwości. Guzy te uważane są za najbardziej agresywne ze względu na duży stopień proliferacji mikronaczyniowej i nekrozy, z dużą tendencją do tworzenia tzw. nacieków wzdłuż komórek i włókien nerwowych, czy naczyń krwionośnych, co prowadzić może do uszkodzeń mózgu [230].

Pomimo znacznych wysiłków i prowadzonych badań, w tym tych opartych na technologii RNAi [287, 288], GBM wykazuje wyjątkową odporność na wszystkie stosowane obecnie metody leczenia i pozostaje poza zasięgiem skutecznych terapii, co prowadzi do złego rokowania u chorych i wysokiego wskaźnika śmiertelności [169]. Intensywna proliferacja komórkowa, nieprawidłowe tworzenie struktur naczyniowych [230] oraz deregulacja kluczowych szlaków sygnałowych w komórkach nowotworowych [168], mogą być jednymi z głównych czynników odpowiedzialnych za oporność komórek nowotworowych na standardowe leczenie [175]. W ostatnim czasie pojawiła się ogromna potrzeba opracowania terapii indywidualnych, dlatego też prowadzone są badania nad wieloma lekami celowanymi, a także identyfikacja markerów molekularnych GBM. Podjęto pierwsze próby oceny skuteczności małych związków jako potencjalnych inhibitorów kluczowych szlaków sygnałowych w komórkach GBM [172]. Dotychczas, za obiecującego kandydata w kontekście terapii celowanej pacjentów z glejakiem, uznawano temozolomid (TMZ), który często stosowany jest w połączeniu z innymi małymi inhibitorami. Skojarzone

leczenie TMZ i kurkuminy wykazało hamujący wpływ na autofagię w komórkach GBM poprzez aktywację szlaków NF- $\kappa$ B i PI3K/Akt [289]. Ponadto zastosowanie łączonej terapii TMZ z rezweratolem, wpływało na aktywację AMPK i hamowało kinazę mTOR (ang. mechanistic target of rapamycin), prowadząc do apoptozy komórek glejaka [290]. Kinaza mTOR odpowiada za regulację takich procesów jak proliferacja, regulacja wzrostu, czy transkrypcja i translacja, a także integruje wiele innych szlaków sygnalizacyjnych odpowiedzialnych między innymi za stan redoks komórki [291, 292]. Lista terapeutyków ukierunkowanych na szlaki obejmujące czynniki wzrostu, które są często aktywowane w komórkach glejaka, wciąż się wydłuża, pojawiają się nowe, które są silniejsze i bardziej specyficzne wobec komórek glejaka [174]. Powszechne zmiany genetyczne w GBM obejmują amplifikację genu receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), mutacje w supresorach nowotworowych TP53 i PTEN oraz utratę heterozygotyczności (LOH, ang. loss of heterozygosity) na chromosomie 10 [293, 294].

Komórki nowotworowe rozwijają różnorodne mechanizmy, aby skutecznie unikać śmierci komórkowej i indukować wysoki wskaźnik proliferacji, poprzez zdolność do naprawy uszkodzeń DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego, zmiany w ekspresji onkogenów, indukcję autofagii, hipoksję [295], czy zmiany w metabolizmie guza [93]. Komórki GBM mają podwyższony poziom reaktywnych form tlenu, co wynika z upośledzenia mechanizmów związanych z produkcją i eliminacją RFT [229]. Tego typu niesprawności opierają się głównie na dysfunkcji mitochondriów lub niewydolnym funkcjonowaniu systemów antyoksydacyjnych [285]. RFT są produkowane we wszystkich typach komórek, przy czym istnieje kilka konstytutywnych źródeł odpowiedzialnych za ich wytwarzanie, wśród których mitochondria są tymi podstawowymi [296]. Ponadto, zmiany w homeostazie redoks, które przyczyniają się do rozwoju i progresji nowotworów, mogą również wynikać z przejścia jonów metali na inne stopnie utlenienia (np. reakcja Fentona), aktywności peroksydomów, stresu retikulum endoplazmatycznego lub aktywności oksydaz [230, 296]. Zaburzenie równowagi "gospodarki tlenowej" w GBM jest ściśle związane z czynnikami środowiskowymi, które promują wzrost, różnicowanie i przeżycie guza. Stres oksydacyjny (SO) jest czynnikiem wyzwalającym procesy patologiczne, w tym modyfikację składników komórkowych i kluczowych biomolekuł, co w konsekwencji prowadzi do genotoksyczności [229, 230]. Tym samym, SO sprzyja indukcji hipoksji i zmusza komórki do adaptacji w takich warunkach, co skutkuje opornością komórek nowotworowych na leczenie [179]. Wykazano między innymi, że komórki macierzyste obecne w masie guza, mogą być związane

z opornością GBM, ze względu na ich wzmocnioną ochronę przed SO i zwiększoną zdolność naprawy DNA [285].

Hipoksja w mikrośrodowisku guza, powoduje, że aktywność metaboliczna komórek nowotworowych ulega zmianie w porównaniu z komórkami prawidłowymi [230]. Modyfikacje te sprzyjają utrzymaniu właściwości charakterystycznych dla złośliwego nowotworu (wzrost naczyń krwionośnych w jego obrębie, szybkie tempo rozwoju, zdolność dawania przerzutów) i tworzą one wewnętrzny mechanizm oporności komórek związany z "przeprogramowaniem metabolicznym" [93]. Niezależnie od podwyższonego poziomu RFT, komórki GBM mogą przetrwać w takim środowisku, opierając się na fermentacji kwasu mlekowego, która jest związana z wysokim tempem beztlenowej glikolizy [296]. Ta strategia metaboliczna może dostarczyć odpowiednich półproduktów do biosyntezy nukleotydów i aminokwasów [263], a także jest zaangażowana w detoksykację RFT poprzez zmniejszenie aktywności fosforylacji oksydacyjnej- OXPHOS [93, 296].

Aby potwierdzić te obserwacje, przeprowadzono analizę porównawczą metabolizmu energetycznego w komórkach ludzkiego raka wątrobowokomórkowego (HepG2) i linii komórkowej ludzkiego glejaka (T98G) (**Rys. 18B**). Linia komórkowa HepG2 posiada odpowiednie właściwości dla eksperymentów *in vitro* obejmujących brak równowagi energetycznej i indukcję stresu oksydacyjnego [93], a linia komórkowa T98G jest natomiast, rutynowo wykorzystywana jako eksperymentalny standard, w badaniach poprawy strategii terapeutycznych dla GBM [297]. Wysokorozdzielcza analiza porównawcza prędkości zużycia tlenu przez nienaruszone komórki, ujawniła, że komórki HepG2 polegają na oddychaniu mitochondrialnym, a wykorzystanie przez nie tlenu jest natychmiastowe i szybsze niż przez komórki T98G (**Rys. 18B**). Analiza wykazała, że stan oddechowy 3 (ang. oligomycin-inhabitable respiration), czyli zużycie tlenu związane z syntezą ATP, jest wyższy w komórkach HepG2; wskazuje to na większy potencjał tych komórek do wejścia na ścieżkę fosforylacji oksydacyjnej (**Rys. 18B**). Wykazano również wysoki poziom zapasowej pojemności oddechowej (SRC; ang. spare respiratory capacity) w komórkach HepG2, co może stanowić większą adaptację tych komórek do metabolizmu mitochondrialnego. W przeciwieństwie do tego, niski poziom SRC w komórkach T98G, być może wskazuje na indukcję SO i wysoki poziom proliferacji [298] (**Rys. 18B**). Metabolizm mitochondrialny musi stale dostosowywać się do warunków stresowych, aby utrzymać poziom bioenergetyczny związany z funkcjami komórkowymi, a brak właściwej adaptacji, można zaobserwować np. w komórkach nowotworowych. Dlatego też często wykorzystywane są rezerwy mitochondrialne, aby zaspokoić rosnące potrzeby i zaadaptować się do nowych

warunków. Zapasowa pojemność oddechowa stanowi parametr oddechowy, który umożliwia ocenę rezerwy mitochondrialnej [298].

Powyższe wyniki potwierdziły to, że metabolizm komórek T98G opiera się głównie na beztlenowej glikolizie, co prowadzi do transformacji komórek glejaka i utrzymania równowagi pomiędzy produkcją i ochroną przed RFT, w ich nietoksycznym zakresie. Zdolność oparta na indukowanym przez glukozę hamowaniu oddychania komórkowego określana jest jako efekt Crabtree i wspomaga przeżycie komórek nowotworowych, prowadząc do lekooporności i wpływa negatywnie na testowanie chemioterapeutyków, w szczególności tych nacelowanych na mitochondria [140, 147]. Wcześniejsze wyniki, opisane w drugim podrozdziale *Dyskusji* (5.2.), potwierdziły również, że inne linie komórkowe GBM mogą ulegać efektowi Crabtree, co wykazano na przykładzie komórek A172, które są innym powszechnie stosowanym modelem badania właściwości glejaka [93]. Elastyczność metaboliczna komórek nowotworowych, może wzmacniać agresywność guza i aby przewyciężyć to ograniczenie, pożądana jest aktywacja mitochondrialnego fenotypu oksydacyjnego, podobnie jak w przypadku komórek HepG2 [150, 298]. Ponadto w komórkach GBM występują nieprawidłowości w strukturze mitochondriów, mutacje genomowe w mtDNA oraz zmieniony metabolizm energetyczny, dlatego niektóre z małych związków mogą pośrednio modulować zaburzenia metaboliczne, które są konsekwencją dysfunkcji mitochondriów [299].

Przeprowadzono również analizę porównawczą indukcji mitochondrialnych RFT w komórkach HepG2 i T98G, z jednoczesną suplementacją czynnikiem generującym SO, tj. z menadionem. Analiza wykazała, że komórki T98G manifestowały zwiększony poziom podstawowy RFT, który nie zmienił się po dodaniu menadionu, podczas gdy komórki HepG2 odpowiedziały na suplementację i doszło do indukcji stresu oksydacyjnego (**Rys. 18C**). Może to wskazywać na to, że stan redoks komórek GBM chroni je przed apoptozą, tworząc tym samym korzystne środowisko dla proliferacji komórkowej i indukując oporność na leki [178, 300].

Do powszechnie identyfikowanych aberracji genetycznych w komórkach GBM należą: nadekspresja i często mutacja genów kodujących białka: p53, PTEN, VEGF, EGFR (skrótów wyjaśnione w *Wykazie skrótów*) oraz mutacje genu PI3CA, kodującego kluczową kinazę, zaangażowaną m. in. we wzrost komórek. Niestety, zastosowanie inhibitorów tych celów w spersonalizowanym podejściu terapeutycznym, nadal ma ograniczenia w zakresie leczenia i sukcesu klinicznego [168]. Dlatego w ostatnim czasie opracowano wiele innych obiecujących terapii celowanych, w tym zastosowanie związków małocząsteczkowych, które



mogą modulować status redoks komórek glejaka [178]. Większość z tych związków działa poprzez aktywację wewnątrzkomórkowej produkcji RFT w komórkach nowotworowych, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki na drodze stresu oksydacyjnego oraz aktywacji szlaków apoptotycznych i nekrotycznych [301]. Komórki GBM cechuje wysokie tempo metabolizmu podstawowego [230], dlatego zaburzenie stanu redoks i stabilności komórki (generowanie vs. usuwanie RFT), może uwrażliwiać komórki GBM na działanie leków (**Rys. 18A**) [229]. Grupa związków przeciwnowotworowych, które wpływają na równowagę redoks komórek GBM i trwale niszczą komórki złośliwe, poszerza się, a wśród nich wyróżnić można kilka o ugruntowanej pozycji, takich jak chlorochina [302], temozolomid [303], kannabidiol [230], berberyna [304] i bromopirogronian [305].

Uważa się również, że naturalne małe związki selektywnie wpływają na różne etapy wewnątrzkomórkowych szlaków molekularnych, które są kluczowe dla proliferacji i śmierci komórek [81]. W niniejszej pracy wykazano już, że pochodne nukleozydów purynowych, mogą być potencjalnie wykorzystane do zwiększenia wrażliwości metabolicznej komórek nowotworowych, a związki te, jak udowodniono, wpływają na upośledzenie funkcji mitochondriów [93, 94] oraz indukują stres oksydacyjny [93]. Rybozyd kinetyny jest naturalnie występującym analogiem adenozyiny i wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe poprzez indukcję apoptozy [68, 82, 93, 94], co już wielokrotnie zostało podkreślone. RK i kilka innych pochodnych purynowych mają unikalny mechanizm działania, który negatywnie wpływa na równowagę metaboliczną komórek. RK może również wywoływać zaburzenia równowagi energetycznej poprzez reakcję fosforylacji katalizowanej przez kinazę adenozyiny (ADK). Związane jest to z toksycznością RK i prowadzi do akumulacji mono-, di- i trójfosforanów [88]. Niektóre z analogów puryn, takie jak 8-chloroadenozyina i 2-chlorodeoksyadenozyina, przyniosły już obiecujące wyniki w badaniach klinicznych [89, 90]. Rybozyd kinetyny został natomiast wykorzystany jako jedna z nowych alternatyw leczenia przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL), obejmująca nową generację pochodnych purynowych [91], a także jest proponowany jako silny inhibitor przejścia epithelialno- mezenchymalnego (EMT) w ludzkich komórkach prostaty, co hamuje progresję nowotworu [86]. Ponadto, w nawiązaniu do aktualnych wydarzeń związanych z pandemią COVID-19, RK jest uważany za obiecującego kandydata na agonistę receptora konwertazy angiotensyny typu II (ACE2, ang. angiotensin-converting enzyme 2) występującego na komórkach gospodarza atakowanych przez wirus SARS-CoV-2 [92].

W niniejszej pracy przedstawiono obserwacje dotyczące aktywności przeciwnowotworowej RK i wykazano, że komórki HepG2 ulegają rozległej apoptozie, która

jest bezpośrednią konsekwencją upośledzenia mitochondriów, wyczerpania ATP i zaburzenia parametrów oksydacyjnych [93]. Konsekwencją tego było rozszerzenie badań i sprawdzenie czy RK równie skutecznie wpływa na generowanie RFT w komórkach T98G i czy może być wykorzystany jako opcja terapeutyczna w leczeniu GBM (**Rys. 18A**). W tym celu, zaprojektowano i zsyntetyzowano nowe pochodne (**Rys. 19, 20**) rybozydu kinetyny i zbadano, czy analogi te były aktywnymi induktorami SO w komórkach T98G, w podobnym zakresie stężeń, jak związek wyjściowy- RK. Analogi adenozyne stanowią substraty dla ADK, dlatego kolejnym krokiem było sprawdzenie, poprzez zastosowanie dokowania molekularnego, jak dodanie grupy furfurylowej w pozycji N<sup>6</sup>, wpłynie na powinowactwo tych związków do ADK i czy mogłyby one być wykorzystane jako pochodne RK o lepszych właściwościach przeciwnowotworowych (**Rys. 20A**). Dwa z tych związków, a mianowicie 8-azarybozyd kinetyny (8-azaRK) i 7-deazarybozyd kinetyny (7-deazaRK), zgodnie z przewidywaniami, skutecznie zadokowały się do miejsca wiążącego kinazy ADK (**Rys. 20B**). Dotychczas wykazano, że związki takie jak 8-azaadenozyne oraz niektóre analogi adenozyne, zawierające pierścień 7-deaza (np. sangiwamycyna i tojokamycyna), są fosforylowane przez ADK i dalej wbudowywane do DNA i RNA, co przyczynia się do powstania ich właściwości przeciwnowotworowych [226-228]. Cecha ta czyni te dwie modyfikacje pierścienia adeninowego, szczególnie atrakcyjnymi w kontekście badania pochodnych RK. Ponadto wykazano, że 8-azaadenozyne ulega szybkiej deaminacji wewnątrz komórki, a jej cytotoksyczność wzmocniona jest, gdy komórki są wstępnie traktowane inhibitorem deaminazy adenozyne [226]. Stanowi to również potwierdzenie dla samego rybozydu kinetyny, ponieważ po zastosowaniu inhibitora EHNA, stwierdzono jego obecność, a nie metabolitów reakcji deaminacji (**Rys. 7D**). Obecność grupy furfurylowej w pozycji N<sup>6</sup> 8-azaRK, najprawdopodobniej zapobiega reakcji deaminacji, co mogłoby przyczynić się do zwiększonej siły działania 8-azaRK wewnątrz komórek w porównaniu z 8-azaadenozyną. Oszacowana energia wiązania wskazywała, że obie pochodne RK mogą mieć podobne powinowactwo do kinazy adenozyne.

Większość badań dotyczących testowania związków przeciwnowotworowych opiera się na eksperymentach z wykorzystaniem tradycyjnych dwuwymiarowych kultur komórkowych *in vitro* (2D), w których komórki hodowane są w monowarstwie. Wiedząc, że środowisko wzrostu komórek może mieć wpływ na ich odpowiedź na czynniki zewnętrzne, np. leki [306], przeprowadzono również analizy z wykorzystaniem hodowli komórkowych 3D (sferoidy), które naśladują naturalne mikrośrodowisko rosnącego guza (ang. tumor microenvironment, TME). Ponadto zapewniają one przestrzenne interakcje komórka-komórka

i komórka-ECM (macierz zewnątrzkomórkowa, ang. extracellular matrix) [307], a także dostęp do znacznie silniejszych efektów działania terapeutyków w porównaniu z odpowiedzią w hodowlach 2D [308]. Zastosowanie sferoidów komórek T98G pozwoliło na wyselekcjonowanie jednej pochodnej, o podobnej aktywności przeciwnowotworowej do RK (**Rys. 21-23**) oraz pokazało kompleksowe działanie związków. Przed podaniem badanych związków, sferoidy komórkowe były inkubowane przez 3 dni w świeżej pożywce (wymieniana codziennie), w celu podtrzymania zaopatrzenia zewnętrznych warstw komórkowych w substancje odżywcze, podczas gdy w wewnętrznej warstwie rosnących sferoidów rozwijała się nisza hipoksyjno-nekorozyjna [309]. W momencie osiągnięcia przez sferoidy odpowiednich rozmiarów, rozpoczęto traktowanie pożywką uzupełnioną związkami.

W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę sferoidów za pomocą mikroskopii konfokalnej, w celu porównania żywych i martwych komórek T98G tworzących sferoidy po traktowaniu rybozydami. Analiza wykazała, że wszystkie trzy rybozydy wpływały na żywotność komórek w sposób zależny od dawki i czasu, co było obserwowane jako wzrost czerwonej fluorescencji pochodzącej od komórek martwych (**Rys. 21**). Przeanalizowano również wpływ RK i jego pochodnych na indukcję wewnątrzkomórkowego i mitochondrialnego SO w komórkach T98G hodowanych w kulturach 3D (**Rys. 22 i 23**). Jak wspomniano powyżej, sferoidy wykazują różne odpowiedzi na leki, co może być spowodowane interakcjami komórka-ECM, które generują niszę RFT i w sposób ciągły rozwijającą się hipoksję. W konsekwencji, pozbawienie tlenu w obrębie masy guza prowadzi do zwiększonej produkcji RFT, co tworzy system wzajemnie ze sobą powiązany [129, 310].

Stres oksydacyjny zwiększa inwazyjność komórek nowotworowych, ale inkubacja z badanymi związkami zwiększa modyfikacje redoks w obrębie sferoidów GBM, co objawia się zahamowaniem proliferacji i różnicowania, prowadząc do pęknięcia zewnętrznej warstwy sferoidów komórkowych. Jedną z hipotez opisującą działanie reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych sugeruje, że gdy komórki te są poddane działaniu zewnętrznych czynników wytwarzających RFT, wewnątrzkomórkowy poziom RFT wzrasta dużo szybciej niż w przypadku komórek prawidłowych, aby osiągnąć próg i wywołać śmierć komórki [183]. Podsumowując, wyniki te wskazują, że 7-deazaRK wykazuje większą aktywność przeciwnowotworową wobec sferoidów komórkowych niż 8-azaRK. Co więcej, wpływ 7-deazaRK na indukcję śmierci komórek i zaburzenie równowagi oksydacyjnej jest porównywalny, ale wciąż nie tak znaczący jak w przypadku rybozydu kinetyny.

Zastosowanie hodowli jednowarstwowych w kolejnych eksperymentach, pomogło przede wszystkim zrozumieć prawdopodobny mechanizm działania RK i 7-deazaRK w

komórkach glejaka. Potwierdzono, że te dwa analogi adenozyiny indukują toksyczność w komórkach T98G, hamują proliferację komórek i inicjują apoptozę komórek w sposób zależny od dawki (**Rys. 24D-G**) poprzez aktywację szlaku rezerwowego metabolizmu puryn (**Rys. 24A**). Jednakże wpływ na proliferację komórkową został całkowicie wyeliminowany, gdy komórki były traktowane 5-jodotubercydyną, inhibitorem ADK (Rys. 24F, G); potwierdzając tym samym raz jeszcze, że wewnątrzkomórkowa fosforylacja większości puryn jest niezbędna do wywierania ich cytotoksyczności (**Rys. 24A, B**) [77, 79, 81].

Jak wspomniano powyżej, mechanizm działania pochodnych purynowych w komórkach nowotworowych jest bardzo złożony i zależy głównie od ADK [117] (**Rys. 24A**). Po wnikięciu do komórek, RK i 7-deazaRK są przekształcane do swoich monofosforanowych analogów, co wpływa na bilans energetyczny w komórkach nowotworowych i jest prawdopodobnie prostą konsekwencją szybkiego i znacznego spadku poziomu wewnątrzkomórkowego ATP (**Rys. 24C**) [68, 93]. Dotychczas, podobną odpowiedź odnotowano dla innej znanej pochodnej adenozyiny, AICAR (rybonukleotyd 5-aminoimidazolo-4-karboxyamidowy), która jest produktem pośrednim podczas powstawania monofosforanu inozyny; jest lekiem, który bezpośrednio aktywuje AMPK [134]. Ponadto AICAR reguluje metabolizm lipidów i glukozy, reakcje prozapalne, produkcję cytokin, proliferację komórek i apoptozę, wpływa na metabolizm komórkowy, a jej krótkotrwały efekt jest spowodowany wyczerpaniem ATP, co pokazano w embrjonalnych fibroblastach myszy [311]. Ponadto, głównymi procesami zaangażowanymi w aktywację apoptozy po zastosowaniu AICAR, są wyczerpanie ATP [150] oraz indukcja stresu oksydacyjnego [153].

W niniejszej rozprawie doktorskiej, udowodniono już, że RK może wywoływać apoptozę poprzez indukcję SO w komórkach HepG2 [93]. Co więcej, inny naturalnie występujący związek - berberyna - coraz częściej pojawia się jako środek terapeutyczny w leczeniu GBM i wykazuje podobną aktywność. Alkaloid ten jest uważany za potencjalny środek przeciwnowotworowy w leczeniu glejaka i podobnie jak RK i 7-deazaRK hamuje proliferację komórek i ostatecznie indukuje ich śmierć poprzez indukcję SO [304, 312, 313].

Wprowadzanie terapii, które wpływają na równowagę energetyczną i redoks w komórkach GBM stanowi wyzwanie pełne czynników limitujących, a wiele z tych ograniczeń polega na zmniejszonej wrażliwości komórek nowotworowych na leki [183]. Wiadomo też, że komórki nowotworowe niezłśliwe utrzymują umiarkowany poziom RFT, co przyczynia się do kontroli namnażania i ich różnicowania. W komórkach nowotworowych, a nawet w GBM, zwiększony poziom wewnątrzkomórkowych RFT promuje niestabilność genomu,

nadmierną proliferację i przerzuty [180]. Dlatego też przeprowadzono kompleksową analizę generowania RFT w komórkach T98G po traktowaniu ich rybozydem kinetyny i jego pochodną- 7-deazaRK (**Rys. 25**). Miało to na celu potwierdzenie czy związki te mogą być obiecującymi alternatywami dla innych leków, które wpływają na komórkowe środowisko redoks w GBM. Stres oksydacyjny podzielono na dwie główne grupy, ze względu na jego źródło i zbadano stres metaboliczny (**Rys. 25 A-F**) i genotoksyczny (**Rys. 26**). Ponadto, wiadomym jest, że aktywność antyoksydacyjna jest niezbędna w procesie nowotworzenia [314, 315], dlatego dodatkowo oceniono całkowitą zawartość zredukowanego GSH, który jest naturalnym składnikiem antyoksydacyjnego systemu obronnego (**Rys. 25G, H**). Reaktywne formy tlenu generowane są w sposób ciągły podczas oddychania komórkowego i stanowią mediatory różnych szlaków sygnałowych [178]; jednak nagromadzenie RFT powyżej progu przeżycia prowadzi do śmierci komórki [316]. W odpowiedzi na RK i 7-deazaRK powstały produkty uboczne metabolizmu tlenowego, tj. wewnątrzkomórkowe RFT, a równowaga redoks komórek T98G została zaburzona (**Rys. 25A**). Ponadto, silniejszy efekt obserwowano w przypadku zastosowania RK.

Podobnie w badaniach Palma i wsp. [304], zastosowanie berberyny, spowodowało wzrost poziomu RFT oraz innych markerów uszkodzenia komórek U87MG, takich jak supresja proliferacji, indukcja wczesnej apoptozy czy aktywacja AMPK.

Wykazano również, że związek z grupy flawonoidów- kemferol może indukować apoptozę ludzkich komórek glejaka poprzez zaburzenie komórkowej równowagi redoks [317].

Mitochondria są jednym z głównych źródeł wewnątrzkomórkowych RFT, które produkują je w postaci anionorodników ponadtlenkowych ( $O_2^{\cdot-}$ ), jako produkt uboczny metabolizmu oksydacyjnego [180]. Generowanie mitochondrialnych RFT może prowadzić do uszkodzenia mtDNA i mutacji, powodując tym samym dysfunkcję łańcucha oddechowego [278]. Dlatego też przeprowadzono analizę generowania mitochondrialnych RFT i zaobserwowano znaczący wzrost poziomu nadtlenu, gdy stężenie RK wzrosło, podczas gdy po zastosowaniu 7-deazaRK poziom nadtlenu wzrósł nieznacznie (**Rys. 25C, D**). To odkrycie potwierdziło wcześniejsze wyniki mówiące o tym, że RK wpływa na wiele parametrów komórkowych, co pośrednio prowadzi do stresu mitochondrialnego i zaburzenia równowagi redoks [93].

Reaktywne formy tlenu produkowane są podczas wielu procesów metabolicznych i ingerują w różne struktury wewnątrzkomórkowe, takie jak lipidy, białka i DNA, co prowadzi do niestabilności genomu, a w ostateczności do rozpadu komórki [163, 183].

Traktowanie komórek rybozydem kinetyny, indukowało znacząco wysoki poziom utlenionych lipidów, co było skorelowane z obniżeniem stosunku 590/510 intensywności fluorescencji barwnika (**Rys. 25E, F**). Po zastosowaniu 7-deazaRK, obserwowano, że poziom peroksydacji lipidów był porównywalny z poziomem peroksydacji komórek T98G nietraktowanych, czego odzwierciedleniem było niewielkie obniżenie stosunku 590/510 (**Rys. 25E**). Komórkowej peroksydacji lipidów towarzyszy zwykle ferroptoza, która stanowi nowo poznany rodzaj programowanej śmierci komórki i uaktywnia się, gdy homeostaza żelaza w komórkach zostaje zaburzona [318]. Indukcja ferroptozy opiera się głównie na reakcji Fentona, w której nagromadzone żelazo (II) jest utleniane do żelaza (III) przez nadtlenek wodoru, a nadtlenki lipidów są z kolei przekształcane w rodnik hydroksylowy [163]. Powyższe wyniki wskazują, że RK może być potencjalnym induktorem ferroptozy i działać podobnie jak erastyna, tj. indukując apoptotyczną śmierć komórek poprzez akumulację RFT [319]. Z kolei Hu i wsp. [318] wykazali, że ferroptoza może odgrywać istotną rolę w oporności glejaków na temozolomid, co może być potwierdzeniem dla wyników uzyskanych w przypadku 7-deazaRK. Ferroptoza jest bardzo złożonym procesem, w którym bierze udział wiele czynników i do wyjaśnienia pozostaje, to czy jest ona zaangażowana w fizjologię i rozwój komórek nowotworowych, czy też zachodzi po interwencjach farmakologicznych (terapia przeciwnowotworowa) [164, 318]. Dotychczas, niewiele badań wskazuje, czy ferroptoza może być zaangażowana w proces autofagii, opisywano ją również jako mechanizm poprzedzający apoptozę [320]. Tak więc, ferroptoza wymaga dalszych szczegółowych badań w kontekście analogów puryn i jej wpływu na peroksydację lipidów.

Poziom reaktywnych form tlenu regulowany jest poprzez tzw. zmiatacze enzymatyczne, które są kluczowymi uczestnikami systemu obrony antyoksydacyjnej, utrzymującymi wewnątrzkomórkową równowagę redoks poprzez redukcję RFT [321]. Homeostaza RFT *in vivo* jest kontrolowana głównie przez zredukowany glutation (GSH), który uczestniczy również w wielu innych procesach metabolicznych [322], takich jak różnicowanie komórek, proliferacja, odpowiedź immunologiczna i śmierć komórek [323]. GSH występuje w trzech głównych formach: zredukowanego GSH, który jest formą dominującą w warunkach fizjologicznych, disiarczku glutationu (GSSG) oraz mieszanych disiarczków glutationowo-białkowych (PSSG) [324]. GSH i inne zmiatacze RFT pełnią podwójną rolę w komórkach nowotworowych, zarówno utrzymując równowagę redoks, jak i promując progresję nowotworu i oporność na leki w celu uniknięcia śmierci komórki [323]. Komórki glejaka odporne na TMZ wykazywały wyraźnie podwyższone poziomy reduktazy glutationowej (GR) i GSH, co jest skorelowane z regulacją statusu redoks i odpowiedzią

komórek GBM na leki [183, 315]. Wykazano, że w odpowiedzi na leczenie RK i 7-deazaRK, komórki T98G wykazują szybki wzrost całkowitej zawartości GSH, co jest prawdopodobnie bezpośrednią konsekwencją wymuszenia detoksykacji podwyższonych RFT (**Rys. 25G, H**). W części poświęconej wpływowi RK na mitochondria, zaobserwowano odwrotny efekt i znaczne zubożenie zredukowanego GSH w komórkach HepG2 po indukcji RK [93]. Udowodniono jednak, że komórki HepG2 wykazują większą adaptację do metabolizmu mitochondrialnego i że wymuszenie fosforylacji oksydacyjnej zwiększa ich wrażliwość na RK. Potwierdzono również, że metabolizm komórek T98G opiera się głównie na glikolizie beztlenowej, co może prowadzić do indukcji oporności na leki (**Rys. 18B, C**). Tak więc, z pewnością wykazano, że poziom RFT i metabolizm są silnie powiązane [325]. Powyższe wyniki, pokazują, że generacja RFT wzrosła w komórkach T98G traktowanych RK i 7-deazaRK, prawdopodobnie z powodu aktywacji mechanizmów obrony antyoksydacyjnej, a tym samym chemooporności komórek nowotworowych (**Rys. 25**). Wykazano, że traktowanie czynnikiem zewnątrzpochodnym, zaburzyło równowagę redoks komórek T98G, co może być związane ze zwiększoną indukcją apoptozy (**Rys. 24D**).

Akumulacja RFT może bezpośrednio uszkadzać DNA i powodować zmiany oksydacyjne; 8-oxo-dG stanowi wiarygodny biomarker genotoksycznego stresu oksydacyjnego [285]. W normalnych warunkach, w genomie występuje jedna cząsteczka 8-oxo-dG na  $10^5$ - $10^6$  guanozyn, co odpowiada tysiącom cząsteczek 8-oxo-dG na komórkę [326]. Stwierdzono, że wszystkie badane związki znacząco podniosły liczbę cząsteczek 8-oxo-dG, w porównaniu do komórek kontrolnych; odkrycie to uzupełnia powyższe rozważania i potwierdza, że obie pochodne adenozyne indukują SO w komórkach T98G (**Rys. 26**). Castro i wsp. [327] również wykazali, że wysoka dawka askorbinianu powodowała indukcję genotoksycznego i metabolicznego SO w komórkach glejaka.

Zbadano również wpływ RK i 7-deazaRK na poziom ekspresji wybranych genów związanych z indukcją i odpowiedzią na SO w komórkach T98G. Poziom ekspresji ustalono za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym (**Rys. 27**). Zbadano geny specyficznie, związane z aktywacją systemu obrony antyoksydacyjnej oraz określono poziom ekspresji genów związanych z SO i wskaźnikami tzw. dobrostanu komórkowego. Zmiany w poziomie ekspresji wybranych genów oraz funkcje kodowanych białek podsumowano w **tabeli 2**, w podrozdziale 4.8. (w **tabeli 2** znajdują się również pełne nazwy badanych genów). Po pierwsze, potwierdzono wcześniejsze obserwacje dotyczące enzymatycznych zmiataczy RFT i stwierdzono, że zarówno RK jak i 7-deazaRK zwiększają poziom ekspresji tych genów, co może być związane z utrzymaniem homeostazy redoks i opornością na leki w komórkach

T98G [183, 315]. Zaobserwowano, że po inkubacji komórek z pochodnymi najbardziej znaczący efekt obserwowano dla SOD; we wcześniejszych badaniach wykazano również, że ekspresja SOD2 i związanego z nim białka Sp1 wzrastała w komórkach opornych na TMZ [328]. Podwyższenie poziomu ekspresji enzymów odpowiedzialnych za zmiatanie wolnych rodników, jest jedną z oznak złośliwości nowotworu i oporności komórek GBM. Łącznie wyniki te wskazują, że dochodzi do aktywacji genów stymulujących produkcję białek antyoksydacyjnych [329]. Tak więc, po zastosowaniu RK i 7-deazaRK, obserwowano wzrost poziomu ekspresji genów związanych z odpowiedzią na SO i potwierdzono, że gen NRF2 jest kluczowym regulatorem detoksykacji i chroni komórki przed indukcją uszkodzeń DNA [285], a ponadto sestriny działają również jako białka-sensory stresu [330]. Co więcej, powyższe wyniki wskazują, że wzrost ekspresji NF-KB jest nie tylko kluczowy dla stymulacji proliferacji komórek GBM [331], ale również jako część systemu obrony antyoksydacyjnej.

RK i 7-deazaRK wpływają również na aktywację wskaźników dobrostanu komórkowego, takich jak SIRT2, PARP1, TNFA i p53, jednak oba związki obniżały poziom ekspresji PGC-1a, który jest kluczowym regulatorem mitochondrialnego metabolizmu energetycznego [332] i modulatorem biogenezy mitochondriów [333]. Cho i wsp. [333] wskazali również, że PGC-1a jest skorelowany z dysfunkcją mitochondriów w GBM, co może prowadzić do progresji nowotworu, dlatego obniżenie jego ekspresji w wyniku traktowania komórek RK i 7-deazaRK, jest efektem pożądanym.

Wykazano pośredni wpływ RK i 7-deazaRK na stan redoks komórek T98G, co może być początkiem do dalszych, bardziej szczegółowych badań nad wykorzystaniem tych związków w terapiach przeciwnowotworowych. Wykazano już, że RK może być potencjalnym lekiem w spersonalizowanej terapii przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL) [91], przeprowadzono również doświadczenia *in vivo* z wykorzystaniem myszy, co wskazuje na jego właściwości przeciwnowotworowe, szczególnie w przypadku ludzkich nowotworów złośliwych cechujących się deregulacją cykliny D1 lub D2 [75, 77].

Zastosowanie komplementarnych testów komórkowych pozwoliło na zbadanie wpływu RK i jego pochodnych, 8-azaRK i 7-deazaRK, na funkcje komórek T98G. Zastosowanie sferoidów komórek T98G było punktem wyjścia do dalszych badań, które umożliwiły przeprowadzenie badań przesiewowych i wybór jednej pochodnej - 7-deazaRK. Prowadząc szczegółowe analizy, porównano aktywność przeciwnowotworową i prooksydacyjną RK i 7-deazaRK.

Przeprowadzone badania pozwoliły na poznanie mechanizmu oporności komórek T98G na działanie zastosowanych pochodnych adenozyliny, który jest związany głównie z



wysokim tempem metabolizmu komórek GBM i zwiększoną produkcją RFT. Powyższe wyniki wskazują, że oba te związki zwiększają ekspresję genów związanych z ochroną przed SO oraz wpływają na wiele parametrów komórkowych (hamowanie proliferacji komórek, wyczerpanie ATP, upośledzenie systemu obrony antyoksydacyjnej i indukcja apoptozy), co prowadzi do zaburzenia równowagi oksydacyjnej w komórkach T98G. W ten sposób udowodniono, że analogi puryn mogą być potencjalnie wykorzystane do zwiększania wrażliwości oksydacyjnej komórek nowotworowych.

Podsumowując tę część dyskusji, wyniki te pokazują, że RK i 7-deazaRK są czynnikami przeciwnowotworowymi i mogą służyć jako alternatywne metody terapii oksydacyjnej ukierunkowanej na status redoks komórek glejaka wielopostaciowego.

## 6. PODSUMOWANIE

Celem niniejszej pracy było poznanie mechanizmu działania i potwierdzenie właściwości proapoptotycznych rybozydu kinetyny (RK) oraz jego pochodnych w komórkach nowotworowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że:

1. mechanizm toksyczności RK oraz jego pochodnych związany jest z jego konwersją do monofosforanu (KMP), a reakcja ta katalizowana jest przez kluczowy enzym szlaku rezerwowego, tj. kinazę adenozyńską (ADK) (podrozdziały 4.1.-4.3.),
2. do tej pory nie przeanalizowano w tak kompleksowy sposób metabolizmu rybozydu kinetyny, nie koncentrując się wyłącznie na skutkach śmierci komórki związanej z mitochondriami, ale także na procesach enzymatycznych, w których związek ten uczestniczy, angażując wszystkie trzy szlaki metaboliczne związane z biosyntezą puryn (*biosynteza de novo, szlak rezerwowy i kataboliczny*) (podrozdziały 4.1.-4.3.).

### **Wpływ RK na metabolizm puryn:**

1. RK zaburza metabolizm nukleozydów purynowych w komórkach nowotworowych (podrozdział 4.1.). Moje badania wykazały, że RK, jest zaangażowany w każdy z etapów metabolizmu puryn, opisanych przeze mnie powyżej. Powstały monofosforan rybozydu kinetyny ulega dalszym przemianom enzymatycznym w komórkach, w które zaangażowane są reakcje kataboliczne, szlak syntezy puryn *de novo* i rezerwowy. RK działa jak większość antymetabolitów, tj. po fosforylacji bezpośrednio ingeruje w syntezę kwasów nukleinowych,
2. wykorzystanie techniki znakowania izotopem, a następnie analiza jakościowa HPLC-MS, umożliwia wykazanie obecności metabolitów pośrednich RK w lizatach komórek HepG2, a także licznych modyfikacji w DNA, co przyczynia się do zaburzeń cyklu komórkowego (podrozdział 4.1.),
3. rybozyd kinetyny oraz jego metabolity pośrednie inhibują proliferację komórek HepG2 oraz indukują ich apoptozę (podrozdział 4.1.),
4. RK wpływa na profil ekspresji genów w komórkach związanych z metabolizmem puryn (podrozdział 4.1.),
5. analiza HPLC-MS umożliwiła detekcję difosforanów (KDP) oraz trójfosforanów rybozydu kinetyny (KTP) - produktów reakcji katalizowanych przez kinazy monofosforanów i difosforanów nukleozydowych (podrozdział 4.1.),

6. powstałe KDP stanowiło potencjalny substrat dla reduktazy rybonukloetydowej, enzymu odpowiedzialnego za syntezę i naprawę DNA. Analiza składu nukleotydogo genomowego DNA wykazała w nim obecność kinetyny, co świadczy o tym, że trójfosforan deoksyrybozydu kinetyny powstały w wyniku kolejnej fosofrylacji i był substratem dla polimerazy DNA (podrozdział 4.1.),
7. analiza pozostałych szlaków metabolizmu puryn, w tym *szlaku katabolicznego*, w który zaangażowane są następujące enzymy: deaminaza AMP i adenozyne oraz fosforylaza nukleozydów purynowych (PNP), umożliwiła detekcję inozyny, rybozo-5-fosforanu, czy IMP, czyli substratów niezbędnych do zainicjowania *szlaku de novo* (podrozdział 4.1.),
8. egzogenna pochodna adenozyne- RK, wpływa na aktywację purynosomu (ścieżka *de novo* biosyntezy puryn), będącego przykładem metabolomu. Purynosom kształtuje się w komórce w odpowiedzi na stres, czyli w sytuacji zwiększonego zapotrzebowania komórki na puryny (podrozdział 4.1.). Wpływ RK na białka tworzące tzw. rdzeń purynosomu został potwierdzony za pomocą analizy mikroskopowej, proteomicznej oraz po raz pierwszy za pomocą cytometrii przepływowej,
9. istnieje potencjalna zależność między wpływem RK na zaburzenie funkcji mitochondriów a jego wpływem na formowanie purynosomu (podrozdział 4.1.),
10. istnieje powiązanie między zaangażowaniem RK w kluczowe szlaki enzymatyczne biosyntezy puryn a gwałtowną redukcją ilości ATP w komórkach nowotworowych (podrozdział 4.1 i 4.2.).

### **Wpływ RK na mitochondria i metabolizm komórek nowotworowych**

11. mechanizm działania RK jest procesem złożonym, który angażuje wiele poziomów organizacji komórkowej, a mitochondrialna śmierć komórki jest efektem kaskady powiązanych ze sobą zdarzeń (podrozdział 4.2.),
12. komórki nowotworowe wykazują plastyczność metaboliczną, co związane jest z efektem Crabtree. Przyczynia się to do lekooporności, utrudnia testowanie potencjalnych terapeutyków i stanowi mechanizm ucieczki komórek nowotworowych przed śmiercią komórkową (podrozdział 4.2.),
13. podejście eksperymentalne wykorzystujące galaktozę w pożywce oraz komórki HepG2 stanowi idealny model do wstępnego testowania mitotoksykantów (podrozdział 4.2.). Zamiana glukozy na galaktozę przyspiesza efekt działania związku (zmiany parametrów komórkowych, tj. spadek potencjału błony mitochondrialnej czy indukcja apoptozy, widoczne były po 6 h od podania związku),

14. rybozyd kinetyny powoduje zaburzenie funkcjonowania łańcucha oddechowego, a tym samym przyczynia się do zmniejszenia prędkości zużycia tlenu (podrozdział 4.2.). Wykazano za pomocą analizatora Seahorse oraz systemu Oxygraph Hansatech Instruments+,
15. związki małowcząsteczkowe zaburzające balans redox komórek GBM, mogą stanowić potencjalne terapeutyki w terapii oksydacyjnej (podrozdział 4.3.),
16. RK wpływa na indukcję wielu rodzajów śmierci komórkowych: apoptoza/nekroza, autofagia, mitofagia, ferroptoza (podrozdziały 4.2., 4.3.), co poprzedzone jest gwałtowną deplecją ATP oraz indukcją stresu oksydacyjnego,
17. terapie przeciwnowotworowe oparte na związkach małowcząsteczkowych umożliwiają nowe spojrzenie na leczenie nowotworów z uwzględnieniem zaburzeń funkcji mitochondrialnych oraz upośledzeniem balansu oksydacyjnego komórek nowotworowych (podrozdziały 4.2., 4.3.),
18. RK wpływa na ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym i będących wskaźnikami dobrostanu komórkowego (podrozdział 4.2.). Geny, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem rybozydu kinetyny są zaangażowane w szereg bardzo istotnych szlaków metabolicznych w komórkach, takich jak proliferacja czy indukcja śmierci komórkowej,
19. wykorzystanie kultur 3D (podrozdziały 4.1. oraz 4.3.), tzw. sferoidów umożliwiło symulację mikrośrodowiska guza i pokazanie skuteczności działania RK- w planach jest przeprowadzenie dalszych badań wykorzystujących sferoidy zawierające oprócz komórek nowotworowych, także komórki prawidłowe, aby jeszcze dokładniej odtworzyć warunki panujące w guzie (podrozdziały 4.1. oraz 4.3.).

## 7. WYKAZ SCHEMATÓW, RYSUNKÓW I TABEL

### Spis schematów

Schemat 1: Etapy procesu nowotworzenia, czynniki wywołujące oraz efekty transformacji nowotworowej

Schemat 2: Cechy komórek nowotworowych

Schemat 3: Oś czasu przedstawiająca 4 kluczowe punkty zwrotne we współczesnej onkologii

Schemat 4: Oś czasu przedstawiająca leki (w tym inhibitory małowcząsteczkowe) dopuszczone lub wskazane do leczenia nowotworów przez Agencję Żywności i Leków (FDA), na przykładzie niedrobnokomórkowego raka płuc

Schemat 5: Model odpowiedzi molekularnej i komórkowej, na inkorporację analogów nukleozydów, co prowadzi do zahamowania rozwoju widełek replikacyjnych

Schemat 6: Przykłady analogów nukleozydów purynowych

Schemat 7: Adenozyna działa jako regulator homeostazy działający poprzez wiele szlaków zależnych i niezależnych od receptorów adenozynowych

Schemat 8: Reakcje biochemiczne, w które zaangażowana jest adenozyna, obejmujące metabolizm zewnątrzkomórkowy oraz wewnątrzkomórkowy

Schemat 9: (A) Struktura N<sup>6</sup>-furfuryloadeniny (kinetyny), (B) będącej produktem oksydacyjnych uszkodzeń DNA. (C) Efekt przeciwstarzeniowy kinetyny na przykładzie ludzkich fibroblastów

Schemat 10: Struktury naturalnych rybozydów cytokininowych o aktywności przeciwnowotworowej

Schemat 11: Rybozyd kinetyny- struktura

Schemat 12: Jeden z proponowanych mechanizmów działania pochodnych adenozyny

Schemat 13: Metabolizm puryn obejmujący trzy kluczowe szlaki tworzenia nukleotydów purynowych

Schemat 14: Szlaki metabolizmu puryn i ich wzajemne powiązania z innymi procesami metabolicznymi

Schemat 15: Metabolizm i synteza nukleotydów adeninowych na drodze szlaku rezerwowego biosyntezy puryn

Schemat 16: (A) Podjednostka R1 ludzkiej reduktazy rybonukleotydowej (RRM1) w kompleksie z dATP i Mg. Struktura pochodzi z Protein Data Bank (doi:10.2210/pdb2WGH/pdb). (B) Schemat mechanizmu działania RNR prowadzący do utworzenia deoksyrybonukleotydów

Schemat 17: (A) Struktura krystaliczna ludzkiej kinazy adenozyny (doi: 10.2210/pdb1BX4/pdb) z dwiema związanymi cząsteczkami adenozyny (kolor szary). (B) Struktura kinazy adenozyny *Toxoplasma gondii* (doi: 10.2210/pdb1LII/pdb). Obie te struktury ADK umożliwiły poznanie mechanizmu reakcji enzymatycznej przeprowadzanej przez enzym (C) Unikalny mechanizm reakcji fosofrylacji katalizowanej przez kinazę adenozyny

Schemat 18: Struktury chemiczne endogenego substratu ADK - adenozyny oraz wybranych nukleozydowych i nienukleozydowych inhibitorów ADK

Schemat 19: Przebieg syntezy *de novo* puryn, który obejmuje dziesięć reakcji enzymatycznych, prowadzących do utworzenia IMP

Schemat 20: (A) Synteza *de novo* puryn obejmująca powstanie metabolonu- purynosomu. (B) Purynosomy powstające w komórkach HeLa transfekowanych FGAMS-GFP w podłożu ubogim w puryny (zdjęcie po lewej stronie) oraz kolokalizacja purynosomów (kolor różowy) z mitochondriami (zdjęcie po prawej stronie). (C) Stopniowy proces formowania purynosomu. (D) Przykład aktywatora formowania purynosomu- DMAT oraz inhibitora- TBB.

Schemat 21: Reakcje enzymatyczne zachodzące w obrębie purynosomu, prowadzące do powstania IMP w wyniku konwersji PRPP

Schemat 22: (A) Struktura wielokomórkowego sferoidu. (B) Trzyetapowy proces formowania sferoidu w warunkach *in vitro*

Schemat 23: Komponenty mikrośrodowiska guza

Schemat 24: (A) Glikoliza i metabolizm cyklu TCA stanowiące szlaki anaboliczne. Oba procesy wspierają wzrost komórek poprzez zasilanie szlaków odgałęzień wymaganych do anabolizmu. (B) W efekcie Warburga, glikoliza kończy się produkcją i wydzielaniem mleczanu, pomimo obecności tlenu

Schemat 25: Efekt Crabtree i potencjalne mechanizmy prowadzące do jego indukcji

Schemat 26: Przebieg metabolizmu komórek nowotworowych w zależności od dostępności składników odżywczych

Schemat 27: Komórki Hepg2 jako model *in vitro* służący identyfikacji dysfunkcji mitochondrialnych oraz zastąpienie glukozy galaktozą w pożywce hodowlanej, w celu uniknięcia indukcji efektu Crabtree w komórkach

Schemat 28: (A) Budowa mitochondrium komórki zwierzęcej. (B) Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów

Schemat 29: Klasyfikacja regulowanych śmierci komórkowych

Schemat 30: Porównanie apoptozy zewnątrzpochodnej i wewnątrzpochodnej, która jest bezpośrednia związana z mitochondriami

Schemat 31: (A) Przebieg procesu autofagii prowadzący do rozkładu cząsteczek chemicznych, fragmentów komórki i organelli komórkowych. (B) Główne szlaki zaangażowane w proces autofagii w komórkach nowotworowych

Schemat 32: Rodzaje autofagii

Schemat 33: Mechanizmy wpływające na lekooporność komórek nowotworowych

Schemat 34: Podstawowe ścieżki sygnałowe ulegające deregulacji w glejaku wielopostaciowym

Schemat 35: (1) Endogenne i egzogenne czynniki indukujące powstawanie reaktywnych form tlenu, co prowadzi do uszkodzenia struktur wewnątrzkomórkowych (2) oraz aktywacji mechanizmów sprzyjających nowotworzeniu (3)

Schemat 36: Hipotezy opisujące efekty działania RFT w komórkach nowotworowych

Schemat 37: Procedura formowania sferoidów oraz przygotowania do analizy cytometrycznej i wizualizacji mikroskopowej

Schemat 38: Procedura przygotowania komórek do indukcji fosforylacji oksydacyjnej z wykorzystaniem pożywki zawierającej galaktozę. Czasowe porównanie eksperymentów po wymianie pożywek i indukcji RK, a także wykaz parametrów komórkowych, które zostały poddane ocenie

Schemat 39: Porównanie struktur 2-deoksy-D-glukozy i glukozy oraz schemat obrazujący mechanizm działania inhibitora podczas pierwszej reakcji enzymatycznej glikolizy

## Spis rysunków

Rysunek 1: Szlaki enzymatyczne zaangażowane w metabolizm RK w komórkach ssaków

Rysunek 2: Biologiczny status komórek HepG2 w obecności RK

Rysunek 3: Właściwości 5'-monofosforanu rybozydu kinetyny w komórkach HepG2

Rysunek 4: Wykrywanie metabolitów enzymatycznych (<sup>13</sup>C)RK w komórkach HepG2 metodą HPLC-DAD-ESI/MS

Rysunek 5: Identyfikacja KMP w całkowitym RNA i transkrybowanym *in vitro*

Rysunek 6: Obecność pochodnej RK w DNA

Rysunek 7: Identyfikacja wybranych enzymatycznych metabolitów (<sup>13</sup>C)RK w komórkach HepG2

Rysunek 8: Aktywacja purynosmów w komórkach HepG2 po indukcji RK

Rysunek 9: Porównawcza analiza proteomiczna ekspresji białek w komórkach HepG2 traktowanych RK

Rysunek 10: Traktowanie komórek HepG2 rybozydem kinetyny (RK) jest wzmocnione przez zastąpienie glukozy galaktozą w podłożu hodowlanym

Rysunek 11: Porównanie wpływu RK w pożywce galaktozowej na przeżywalność komórek trzech różnych linii komórkowych wykazujących efekt Crabtree

Rysunek 12: Wpływ 2-deoksy-D-glukozy na żywotność komórek HepG2 po traktowaniu RK

Rysunek 13: Status bioenergetyczny komórek HepG2 rosnących w podłożu galaktozowym i glukozowym po zastosowaniu RK

Rysunek 14: Wymuszona galaktozą OXPHOS nasila deregulację statusu oksydacyjnego komórek traktowanych RK

Rysunek 15: RK indukuje autofagię, mitofagii i wpływa na funkcjonowanie łańcucha oddechowego oraz gospodarkę wapnia

Rysunek 16: Apoptoza/nekroza komórek HepG2 inkubowanych z RK, obserwowana w czasie rzeczywistym za pomocą holotomografu Nanolive.

Rysunek 17: Efekt RK na żywotność sferoidów HepG2

Rysunek 18: Status tlenowy komórek glioblastoma (T98G) i komórek nowotworu wątrobowokomórkowego (HepG2)

Rysunek 19: Proliferacja komórek T98G w czasie rzeczywistym w obecności RK i jego pochodnych

Rysunek 20: Wyznaczenie analogów rybozydu kinetyny charakteryzujących się podobnym powinowactwem do kinazy adenozyiny

Rysunek 21: Analiza żywotności sferoidów T98G po traktowaniu RK, 8-azaRK i 7-deazaRK

Rysunek 22: Analiza indukcji stresu oksydacyjnego w sferoidach komórek T98G

Rysunek 23: Analiza mitochondrialnego stresu oksydacyjnego w sferoidach T98G

Rysunek 24: Aktywność i toksyczność rybozydu kinetyny i 7-deazarybozydu kinetyny w komórkach T98G zależy od aktywności ADK

Rysunek 25: Wpływ rybozydu kinetyny i 7-deazarybozydu kinetyny na parametry oksydacyjne w komórkach T98G

Rysunek 26: Analiza ilościowa zawartości 8-oxo-dG w komórkach T98G za pomocą metody HPLC-UV-ED po traktowaniu komórek RK i 7-deazaRK

Rysunek 27: Poziom ekspresji wybranych genów analizowanych w hodowli 2D komórek T98G, inkubowanych z RK i 7-deaza-RK (oba związki w stężeniu końcowym 80  $\mu\text{M}$ )

## Spis tabel

Tabela 1: Sześć enzymów zidentyfikowanych jako kluczowe elementy dziesięciostopniowego szlaku biosyntezy puryn de novo, przekształcających pirofosforan fosforybozylu w monofosforan inozyny i odpowiedzialne za asocjację purynosomów w komórkach

Tabela 2: Lista starterów używanych do analizy PCR w czasie rzeczywistym (podrozdział 3.6.8.9.)

Tabela 3: Zestawienie zmian w poziomie ekspresji genów analizowanych metodą real-time PCR, z uwzględnieniem funkcji/działania kodowanego białka, a także ich implikacji/uwikłania w główne procesy komórkowe

## Materiały uzupełniające - rysunki i tabele

Rysunek uzupełniający S1: Identyfikacja KMP w całkowitym i *in vitro* transkrybowanym RNA metodą HPLC-ESI/MS

Rysunek uzupełniający S2: Analiza HPLC-ESI/MS zawartości podstawowych nukleotydów w RNA transkrybowanym *in vitro* w obecności lub nieobecności KTP

Rysunek uzupełniający S3: Identyfikacja enzymatycznych metabolitów ( $^{13}\text{C}$ )RK w komórkach HepG2 metodą HPLC-ESI/MS

Rysunek uzupełniający S4: Udział metabolitów rybozydu kinetyny R5P i PRPP w różnych komórkowych szlakach enzymatycznych

Rysunek uzupełniający S5: Identyfikacja enzymatycznych metabolitów ( $^{13}\text{C}$ )RK pochodzących ze szlaku katabolicznego w komórkach HepG2 metodą HPLC-ESI/MS

Rysunek uzupełniający S6: Wykrywanie enzymatycznych metabolitów ( $^{13}\text{C}$ )RK pochodzących ze szlaku syntezy nukleotydów purynowych de novo w komórkach HepG2 metodą HPLC-ESI/MS

Rysunek uzupełniający S7: Analiza HPLC-ESI/MS metabolitów enzymatycznych ( $^{13}\text{C}$ )RK pochodzących ze szlaku syntezy de novo nukleotydów pirymidynowych w komórkach HepG2

Rysunek uzupełniający S8: Analiza poziomu ekspresji wybranych genów po leczeniu RK

Tabela uzupełniająca S1: Lista starterów używanych do analizy PCR w czasie rzeczywistym

Tabela uzupełniająca S2: Zestawienie danych HPLC-DAD-ESI/MS dla wszystkich analizowanych metabolitów

Tabela uzupełniająca S3: Zestawienie względnej liczby zmodyfikowanych nukleotydów w całkowitym DNA komórek HepG2 po traktowaniu RK analizowanych metodą HPLC-DAD-ESI/MS



## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Siddhartha, M., *Cesarz wszech chorób. Biografia raka*. 2013: Wydawnictwo Czarne. 616.
2. Kennedy, S.R., Y. Zhang, and R.A. Risques, *Cancer-Associated Mutations but No Cancer: Insights into the Early Steps of Carcinogenesis and Implications for Early Cancer Detection*. Trends in cancer, 2019. **5**(9): p. 531-540.
3. Pucci, C., C. Martinelli, and G. Ciofani, *Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges*. Ecancermedicalsecience, 2019. **13**: p. 961.
4. McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, *Mitochondria: more than just a powerhouse*. Current biology : CB, 2006. **16**(14): p. R551-60.
5. Gibellini, L., et al., *Natural Compounds Modulating Mitochondrial Functions*. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2015. **2015**: p. 527209.
6. Falzone, L., S. Salomone, and M. Libra, *Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1300.
7. Hoelder, S., P.A. Clarke, and P. Workman, *Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities*. Mol Oncol, 2012. **6**(2): p. 155-76.
8. Bedard, P.L., et al., *Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology*. Lancet, 2020. **395**(10229): p. 1078-1088.
9. Hughes, J.P., et al., *Principles of early drug discovery*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(6): p. 1239-49.
10. Tsimberidou, A.M., *Targeted therapy in cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **76**(6): p. 1113-32.
11. Lind, M.J., *Principles of systemic anticancer therapy*. 2016: Medicine. p. 20-24.
12. Rosenberg, S.A., et al., *Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction*. N Engl J Med, 1990. **323**(9): p. 570-8.
13. Vile, R.G., S.J. Russell, and N.R. Lemoine, *Cancer gene therapy: hard lessons and new courses*. Gene Ther, 2000. **7**(1): p. 2-8.
14. Rosenbaum, L., *Tragedy, Perseverance, and Chance - The Story of CAR-T Therapy*. N Engl J Med, 2017. **377**(14): p. 1313-1315.
15. Hidai, C. and H. Kitano, *Nonviral Gene Therapy for Cancer: A Review*. Diseases, 2018. **6**(3).
16. Duong-Ly, K.C. and J.R. Peterson, *The human kinome and kinase inhibition*. Curr Protoc Pharmacol, 2013. **Chapter 2**: p. Unit2.9.
17. Hu, Y.L., et al., *Mesenchymal stem cells: a promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy*. J Control Release, 2010. **147**(2): p. 154-62.
18. Chaft, J.E., et al., *Evolution of systemic therapy for stages I-III non-metastatic non-small-cell lung cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2021. **18**(9): p. 547-557.
19. Gurevich, E.V. and V.V. Gurevich, *Therapeutic potential of small molecules and engineered proteins*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **219**: p. 1-12.
20. Wang, X., et al., *Antiaging compounds from marine organisms*. Food Res Int, 2021. **143**: p. 110313.
21. Hernandez, D.F., et al., *Food-derived bioactive compounds with anti-aging potential for nutraceutical and cosmeceutical products*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020: p. 1-16.
22. Longhena, F., P. Spano, and A. Bellucci, *Targeting of Disordered Proteins by Small Molecules in Neurodegenerative Diseases*. Handb Exp Pharmacol, 2018. **245**: p. 85-110.
23. Segall, M.D., *Multi-parameter optimization: identifying high quality compounds with a balance of properties*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(9): p. 1292-310.
24. Mayr, L.M. and D. Bojanic, *Novel trends in high-throughput screening*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(5): p. 580-8.

25. Rajora, A.K., et al., *Recent Advances and Impact of Chemotherapeutic and Antiangiogenic Nanoformulations for Combination Cancer Therapy*. Pharmaceutics, 2020. **12**(6).
26. Jeswani, G., S.D. Paul, and A.K. Jha, *Advances in the Delivery of Cancer Therapeutics: A Comprehensive Review*. Curr Drug Deliv, 2018. **15**(1): p. 21-36.
27. Kaye, S.B., *New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact*. Br J Cancer, 1998. **78 Suppl 3**: p. 1-7.
28. Tiwari, M., *Antimetabolites: established cancer therapy*. J Cancer Res Ther, 2012. **8**(4): p. 510-9.
29. Ewald, B., D. Sampath, and W. Plunkett, *Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death*. Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6522-37.
30. Askari, B.S. and M. Krajcinovic, *Dihydrofolate reductase gene variations in susceptibility to disease and treatment outcomes*. Curr Genomics, 2010. **11**(8): p. 578-83.
31. Jolivet, J. and B.A. Chabner, *Intracellular pharmacokinetics of methotrexate polyglutamates in human breast cancer cells. Selective retention and less dissociable binding of 4-NH<sub>2</sub>-10-CH<sub>3</sub>-pteroylglutamate<sup>4</sup> and 4-NH<sub>2</sub>-10-CH<sub>3</sub>-pteroylglutamate<sup>5</sup> to dihydrofolate reductase*. J Clin Invest, 1983. **72**(3): p. 773-8.
32. Jolivet, J., et al., *The pharmacology and clinical use of methotrexate*. N Engl J Med, 1983. **309**(18): p. 1094-104.
33. De Abreu, R.A., *Nucleotide metabolism: mode of action of thiopurines in leukemia*. Adv Exp Med Biol, 1994. **370**: p. 195-200.
34. De Abreu, R.A., et al., *6-mercaptopurine: efficacy and bone marrow toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. Association with low (thio)purine enzyme activity*. Adv Exp Med Biol, 2000. **486**: p. 271-5.
35. Wei, Y., et al., *The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy*. Arch Pharm Res, 2018. **41**(1): p. 1-13.
36. SKIPPER, H.E., et al., *Observations on the anticancer activity of 6-mercaptopurine*. Cancer Res, 1954. **14**(4): p. 294-8.
37. ELION, G.B., S. SINGER, and G.H. HITCHINGS, *Microbiological effects of 6-mercaptopurine*. Ann N Y Acad Sci, 1954. **60**(2): p. 200-6.
38. SKIPPER, H.E., *On the mechanism of action of 6-mercaptopurine*. Ann N Y Acad Sci, 1954. **60**(2): p. 315-21.
39. Seley, K.L. and S.L. Mosley, *Purine Analogues and Their Role in Methylation and Cancer Chemotherapy*. 2005, DNA Methylation and Cancer Therapy: Springer. 178-186.
40. Ricci, F., et al., *Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review*. Ther Clin Risk Manag, 2009. **5**(1): p. 187-207.
41. Man, S., et al., *Potential and promising anticancer drugs from adenosine and its analogs*. Drug Discov Today, 2021. **26**(6): p. 1490-1500.
42. Masino, S. and D. Boison, *Adenosine: A Key Link between Metabolism and Brain Activity*. 2012: Springer. 696.
43. Park, J., *Adenosine metabolism, adenosine kinase, and evolution, in Adenosine: a key link between metabolism and central nervous system activity*. 2012.
44. Boison, D. and G.G. Yegutkin, *Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy*. Cancer Cell, 2019. **36**(6): p. 582-596.
45. Gard, J.K., et al., *Quantitative 31P nuclear magnetic resonance analysis of metabolite concentrations in Langendorff-perfused rabbit hearts*. Biophys J, 1985. **48**(5): p. 803-13.
46. Decking, U.K., et al., *Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release*. Circ Res, 1997. **81**(2): p. 154-64.
47. Headrick, J.P. and R.J. Willis, *Adenosine formation and energy metabolism: a 31P-NMR study in isolated rat heart*. Am J Physiol, 1990. **258**(3 Pt 2): p. H617-24.

48. Ballard, F.J., *Adenine nucleotides and the adenylate kinase equilibrium in livers of foetal and newborn rats*. *Biochem J*, 1970. **117**(2): p. 231-5.
49. Gustafson, L.A. and K. Kroll, *Downregulation of 5'-nucleotidase in rabbit heart during coronary underperfusion*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(2): p. H529-38.
50. Bak, M.I. and J.S. Ingwall, *Acidosis during ischemia promotes adenosine triphosphate resynthesis in postischemic rat heart. In vivo regulation of 5'-nucleotidase*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(1): p. 40-9.
51. Boison, D., *Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain*. *Pharmacological reviews*, 2013. **65**(3): p. 906-43.
52. Kroll, K. and D.W. Stepp, *Adenosine kinetics in canine coronary circulation*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(4 Pt 2): p. H1469-83.
53. Kroll, K., A. Deussen, and I.R. Sweet, *Comprehensive model of transport and metabolism of adenosine and S-adenosylhomocysteine in the guinea pig heart*. *Circulation research*, 1992. **71**(3): p. 590-604.
54. Deussen, A., et al., *Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient*. *Circulation*, 1999. **99**(15): p. 2041-7.
55. Samsel, M., K. Dzierzbicka, and P. Trzonkowski, *[Adenosine, its analogues and conjugates]*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013. **67**: p. 1189-203.
56. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Cancer metabolism: a therapeutic perspective*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(1): p. 11-31.
57. Di Virgilio, F., et al., *Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment*. *Nat Rev Cancer*, 2018. **18**(10): p. 601-618.
58. Vijayan, D., et al., *Targeting immunosuppressive adenosine in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(12): p. 709-724.
59. Bowser, J.L., et al., *The hypoxia-adenosine link during inflammation*. *J Appl Physiol (1985)*, 2017. **123**(5): p. 1303-1320.
60. Dos Santos-Rodrigues, A., et al., *Nucleoside transporters in the purinome*. *Neurochem Int*, 2014. **73**: p. 229-37.
61. Haystead, T.A., *The purinome, a complex mix of drug and toxicity targets*. *Current topics in medicinal chemistry*, 2006. **6**(11): p. 1117-27.
62. Murray, J.M. and D.E. Bussiere, *Targeting the purinome*. *Methods Mol Biol*, 2009. **575**: p. 47-92.
63. Voller, J., et al., *Anticancer activity of natural cytokinins: a structure-activity relationship study*. *Phytochemistry*, 2010. **71**(11-12): p. 1350-9.
64. Jabłońska-Trypuć, A., et al., *Traumatic acid toxicity mechanisms in human breast cancer MCF-7 cells*. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2019. **106**: p. 137-146.
65. Mlejnek, P. and P. Dolezel, *Apoptosis induced by N6-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells*. *Toxicol In Vitro*, 2005. **19**(7): p. 985-90.
66. Barciszewski, J., et al., *Some unusual nucleic acid bases are products of hydroxyl radical oxidation of DNA and RNA*. *Mol Biol Rep*, 1999. **26**(4): p. 231-8.
67. Berge, U., P. Kristensen, and S.I. Rattan, *Kinetin-induced differentiation of normal human keratinocytes undergoing aging in vitro*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1067**: p. 332-6.
68. Cabello, C.M., et al., *The experimental chemotherapeutic N6-furfuryladenosine (kinetin-riboside) induces rapid ATP depletion, genotoxic stress, and CDKN1A(p21) upregulation in human cancer cell lines*. *Biochemical pharmacology*, 2009. **77**(7): p. 1125-38.
69. Cheong, J., et al., *Inhibitory effect of kinetin riboside in human hepatoma, HepG2*. *Mol Biosyst*, 2009. **5**(1): p. 91-8.
70. Rattan, S.I. and B.F. Clark, *Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **201**(2): p. 665-72.

71. Rattan, S.I. and L. Sodagam, *Gerontomodulatory and youth-preserving effects of zeatin on human skin fibroblasts undergoing aging in vitro*. *Rejuvenation Res*, 2005. **8**(1): p. 46-57.
72. Ishii, Y., et al., *Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones*. *Cell Growth Differ*, 2002. **13**(1): p. 19-26.
73. Wang, L., et al., *Mechanism of apoptosis induced by ortho-topolin riboside in human hepatoma cell line SMMC-7721*. *Food Chem Toxicol*, 2012. **50**(6): p. 1962-8.
74. Wang, L., et al., *Ortho-Topolin Riboside Induced Differentiation through Inhibition of STAT3 Signaling in Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells*. *Turk J Haematol*, 2019. **36**(3): p. 162-168.
75. Griffaut, B., et al., *Cytotoxic effects of kinetin riboside on mouse, human and plant tumour cells*. *Int J Biol Macromol*, 2004. **34**(4): p. 271-5.
76. Laezza, C., et al., *N6-isopentenyladenosine arrests tumor cell proliferation by inhibiting farnesyl diphosphate synthase and protein prenylation*. *FASEB J*, 2006. **20**(3): p. 412-8.
77. Tiedemann, R.E., et al., *Identification of kinetin riboside as a repressor of CCND1 and CCND2 with preclinical antimyeloma activity*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(5): p. 1750-64.
78. Mittelman, A., J.T. Evans, and G.B. Chheda, *Cytokinins as chemotherapeutic agents*. *Ann N Y Acad Sci*, 1975. **255**: p. 225-34.
79. Voller, J., et al., *The natural cytokinin 2OH3MeOBAR induces cell death by a mechanism that is different from that of the "classical" cytokinin ribosides*. *Phytochemistry*, 2017. **136**: p. 156-164.
80. Mlejnek, P. and S. Prochazka, *Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells*. *Planta*, 2002. **215**(1): p. 158-66.
81. Orlicka-Płocka, M., et al., *Effect of kinetin riboside on proapoptotic activities in human cancer and normal cell lines*. 2016, *New Biotechnol*. p. 168.
82. Dudzik, P., et al., *Effects of kinetin riboside on proliferation and proapoptotic activities in human normal and cancer cell lines*. *Journal of cellular biochemistry*, 2011. **112**(8): p. 2115-24.
83. Van Den Neste, E., G. Van den Berghe, and F. Bontemps, *AICA-riboside (acadesine), an activator of AMP-activated protein kinase with potential for application in hematologic malignancies*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010. **19**(4): p. 571-8.
84. Philippe, C., et al., *AICAR Antiproliferative Properties Involve the AMPK-Independent Activation of the Tumor Suppressors LATS 1 and 2*. *Neoplasia*, 2018. **20**(6): p. 555-562.
85. Macer-Wright, J.L., et al., *8-Chloroadenosine Alters the Metabolic Profile and Downregulates Antioxidant and DNA Damage Repair Pathways in Macrophages*. *Chem Res Toxicol*, 2020. **33**(2): p. 402-413.
86. Dulińska-Litewka, J., et al., *Could the kinetin riboside be used to inhibit human prostate cell epithelial-mesenchymal transition?* *Med Oncol*, 2020. **37**(3): p. 17.
87. Barciszewski, J., F. Massino, and B.F. Clark, *Kinetin--a multiactive molecule*. *Int J Biol Macromol*, 2007. **40**(3): p. 182-92.
88. Dennison, J.B., et al., *Intracellular succinylation of 8-chloroadenosine and its effect on fumarate levels*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(11): p. 8022-30.
89. Santana, V.M., et al., *A phase I clinical trial of 2-chlorodeoxyadenosine in pediatric patients with acute leukemia*. *J Clin Oncol*, 1991. **9**(3): p. 416-22.
90. Stellrecht, C.M., et al., *ATP directed agent, 8-chloro-adenosine, induces AMP activated protein kinase activity, leading to autophagic cell death in breast cancer cells*. *J Hematol Oncol*, 2014. **7**: p. 23.
91. Rogalińska, M., et al., *Personalized therapy tests for the monitoring of chronic lymphocytic leukemia development*. *Oncol Lett*, 2017. **13**(4): p. 2079-2084.
92. Xiang, Z., et al., *Glucocorticoids improve severe or critical COVID-19 by activating ACE2 and reducing IL-6 levels*. *Int J Biol Sci*, 2020. **16**(13): p. 2382-2391.

93. Orlicka-Plocka, M., et al., *Circumventing the Crabtree effect: forcing oxidative phosphorylation (OXPHOS) via galactose medium increases sensitivity of HepG2 cells to the purine derivative kinetin riboside*. *Apoptosis*, 2020. **25**(11-12): p. 835-852.
94. Choi, B.H., et al., *Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating BCL-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells*. *Cancer Lett*, 2008. **261**(1): p. 37-45.
95. Pang, B., et al., *Defects in purine nucleotide metabolism lead to substantial incorporation of xanthine and hypoxanthine into DNA and RNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(7): p. 2319-24.
96. Carlucci, F., et al., *Purine nucleotide metabolism: specific aspects in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes*. *Biochimica et biophysica acta*, 1997. **1360**(3): p. 203-10.
97. Lane, A.N. and T.W. Fan, *Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis*. *Nucleic acids research*, 2015. **43**(4): p. 2466-85.
98. Tantama, M. and G. Yellen, *Imaging changes in the cytosolic ATP-to-ADP ratio*. *Methods Enzymol*, 2014. **547**: p. 355-71.
99. Jurecka, A., *[Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism]*. *Postepy Biochem*, 2011. **57**(2): p. 172-82.
100. Pedley, A.M. and S.J. Benkovic, *A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome*. *Trends in biochemical sciences*, 2017. **42**(2): p. 141-154.
101. Simoni, R.E., et al., *Uric acid changes in urine and plasma: an effective tool in screening for purine inborn errors of metabolism and other pathological conditions*. *J Inherit Metab Dis*, 2007. **30**(3): p. 295-309.
102. Wang, R., et al., *The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation*. *Immunity*, 2011. **35**(6): p. 871-82.
103. Wang, J., et al., *c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells*. *PLoS One*, 2008. **3**(11): p. e3769.
104. Yuneva, M.O., et al., *The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type*. *Cell Metab*, 2012. **15**(2): p. 157-70.
105. Fridman, A., et al., *Cell cycle regulation of purine synthesis by phosphoribosyl pyrophosphate and inorganic phosphate*. *Biochem J*, 2013. **454**(1): p. 91-9.
106. Dolfi, S.C., et al., *The metabolic demands of cancer cells are coupled to their size and protein synthesis rates*. *Cancer Metab*, 2013. **1**(1): p. 20.
107. Yin, J., et al., *Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1697.
108. French, J.B., et al., *Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria*. *Science*, 2016. **351**(6274): p. 733-7.
109. Yin, J., et al., *Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 1697.
110. Frenguelli, B.G., *The Purine Salvage Pathway and the Restoration of Cerebral ATP: Implications for Brain Slice Physiology and Brain Injury*. *Neurochem Res*, 2019. **44**(3): p. 661-675.
111. Torrents, E., *Ribonucleotide reductases: essential enzymes for bacterial life*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. **4**: p. 52.
112. Savic, D., *Purine nucleoside analogs in the therapy of cancer and neuroinflammation*. *Molecular inhibitors in targeted therapy*, 2015. **1**(1): p. 3-14.
113. Xu, H., et al., *Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I provide insights into dNTP regulation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(11): p. 4022-7.
114. Ichida, K., et al., *Primary Metabolic and Renal Hyperuricemia*. *Genetic Diseases of the Kidney*. 2009.
115. Mathews, I.I., M.D. Erion, and S.E. Ealick, *Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution*. *Biochemistry*, 1998. **37**(45): p. 15607-20.

116. Parker, W.B., *Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer*. Chemical reviews, 2009. **109**(7): p. 2880-93.
117. McDermott, S.P., et al., *A small molecule screening strategy with validation on human leukemia stem cells uncovers the therapeutic efficacy of kinetin riboside*. Blood, 2012. **119**(5): p. 1200-7.
118. Pelicano, H., et al., *Study of the substrate-binding properties of bovine liver adenosine kinase and inhibition by fluorescent nucleoside analogues*. Eur J Biochem, 1997. **248**(3): p. 930-7.
119. Maiuolo, J., et al., *Regulation of uric acid metabolism and excretion*. Int J Cardiol, 2016. **213**: p. 8-14.
120. Laursen, T., et al., *Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum*. Science, 2016. **354**(6314): p. 890-893.
121. An, S., et al., *Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells*. Science, 2008. **320**(5872): p. 103-6.
122. Otto, T. and P. Sicinski, *Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(2): p. 93-115.
123. Chan, C.Y., et al., *Purinosome formation as a function of the cell cycle*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. **112**(5): p. 1368-73.
124. Baresova, V., et al., *Study of purinosome assembly in cell-based model systems with de novo purine synthesis and salvage pathway deficiencies*. PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0201432.
125. Baresova, V., et al., *Mutations of ATIC and ADSL affect purinosome assembly in cultured skin fibroblasts from patients with AICA-ribosiduria and ADSL deficiency*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(7): p. 1534-43.
126. Adcock, A. and G. Triwedi, *Three-Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for in-vitro Evaluation of Anticancer Drugs*. 2015: Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques.
127. Weaver, V.M., et al., *Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies*. J Cell Biol, 1997. **137**(1): p. 231-45.
128. Bhadriraju, K. and C.S. Chen, *Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing*. Drug Discov Today, 2002. **7**(11): p. 612-20.
129. Kapalczyńska, M., et al., *2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures*. Arch Med Sci, 2018. **14**(4): p. 910-919.
130. Zanoni, M., et al., *Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids*. J Hematol Oncol, 2020. **13**(1): p. 97.
131. Wenzel, C., et al., *3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions*. Exp Cell Res, 2014. **323**(1): p. 131-143.
132. Jin, M.Z. and W.L. Jin, *The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 166.
133. Lunt, S.Y. and M.G. Vander Heiden, *Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation*. Annual review of cell and developmental biology, 2011. **27**: p. 441-64.
134. Bost, F., et al., *Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy?* Oncogenesis, 2016. **5**: p. e188.
135. Warburg, O., A.W. Geissler, and S. Lorenz, *[On growth of cancer cells in media in which glucose is replaced by galactose]*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie, 1967. **348**(12): p. 1686-7.
136. DeBerardinis, R.J. and N.S. Chandel, *Fundamentals of cancer metabolism*. Sci Adv, 2016. **2**(5): p. e1600200.
137. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
138. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* Trends Biochem Sci, 2016. **41**(3): p. 211-218.
139. Dell'Antone, P., *Energy metabolism in cancer cells: how to explain the Warburg and Crabtree effects?* Medical hypotheses, 2012. **79**(3): p. 388-92.

140. Diaz-Ruiz, R., M. Rigoulet, and A. Devin, *The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression*. *Biochimica et biophysica acta*, 2011. **1807**(6): p. 568-76.
141. Mot, A.I., et al., *Circumventing the Crabtree Effect: A method to induce lactate consumption and increase oxidative phosphorylation in cell culture*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2016. **79**: p. 128-138.
142. Moreno-Sanchez, R., et al., *Energy metabolism in tumor cells*. *The FEBS journal*, 2007. **274**(6): p. 1393-418.
143. Diaz-Ruiz, R., et al., *Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism*. *Biochimica et biophysica acta*, 2009. **1796**(2): p. 252-65.
144. Crabtree, H.G., *Observations on the carbohydrate metabolism of tumours*. *The Biochemical journal*, 1929. **23**(3): p. 536-45.
145. Guppy, M., E. Greiner, and K. Brand, *The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes*. *European journal of biochemistry*, 1993. **212**(1): p. 95-9.
146. Handel, M.E., M.D. Brand, and S.A. Mookerjee, *The Whys and Hows of Calculating Total Cellular ATP Production Rate*. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2019. **30**(7): p. 412-416.
147. Marroquin, L.D., et al., *Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants*. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 2007. **97**(2): p. 539-47.
148. Aguer, C., et al., *Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells*. *PloS one*, 2011. **6**(12): p. e28536.
149. Gohil, V.M., et al., *Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis*. *Nature biotechnology*, 2010. **28**(3): p. 249-55.
150. Jelluma, N., et al., *Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes*. *Molecular cancer research : MCR*, 2006. **4**(5): p. 319-30.
151. Xu, R.H., et al., *Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia*. *Cancer research*, 2005. **65**(2): p. 613-21.
152. Blackburn, R.V., et al., *Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells*. *Free radical biology & medicine*, 1999. **26**(3-4): p. 419-30.
153. Spitz, D.R., et al., *Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism?* *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000. **899**: p. 349-62.
154. Liu, Y., et al., *Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line*. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2003. **7**(1): p. 49-56.
155. Gibellini, L. and L. Moro, *Programmed Cell Death in Health and Disease*. *Cells*, 2021. **10**(7).
156. Galluzzi, L., et al., *Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(1): p. 58-73.
157. Nunnari, J. and A. Suomalainen, *Mitochondria: in sickness and in health*. *Cell*, 2012. **148**(6): p. 1145-59.
158. Sarniak, A., et al., *Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation*. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*, 2016. **70**(0): p. 1150-1165.
159. Bravo, R., et al., *Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(1): p. 16-20.
160. Garcia, G.C., et al., *Mitochondrial morphology provides a mechanism for energy buffering at synapses*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 18306.
161. Yu, R., et al., *Regulation of Mammalian Mitochondrial Dynamics: Opportunities and Challenges*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. **11**: p. 374.

162. Twig, G. and O.S. Shirihai, *The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(10): p. 1939-51.
163. Tang, D., et al., *The molecular machinery of regulated cell death*. *Cell Res*, 2019. **29**(5): p. 347-364.
164. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. *Cell Death Differ*, 2018. **25**(3): p. 486-541.
165. Yun, C.W. and S.S. Lee, *The Roles of Autophagy in Cancer*. 2018: *Int. J. Mol. Sci.* p. 3466.
166. Morselli, E., et al., *Anti- and pro-tumor functions of autophagy*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(9): p. 1524-32.
167. Ding, W.X. and X.M. Yin, *Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis*. *Biol Chem*, 2012. **393**(7): p. 547-64.
168. Taylor, O.G., J.S. Brzozowski, and K.A. Skelding, *Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets*. *Frontiers in oncology*, 2019. **9**: p. 963.
169. Baillie, N., A.C. Carr, and S. Peng, *The Use of Intravenous Vitamin C as a Supportive Therapy for a Patient with Glioblastoma Multiforme*. *Antioxidants*, 2018. **7**(9).
170. Jia, B., et al., *Increased Reactive Oxygen Species and Distinct Oxidative Damage in Resveratrol-suppressed Glioblastoma Cells*. *Journal of Cancer*, 2021. **12**(1): p. 141-149.
171. He, C., et al., *LRP1-mediated pH-sensitive polymersomes facilitate combination therapy of glioblastoma in vitro and in vivo*. *Journal of nanobiotechnology*, 2021. **19**(1): p. 29.
172. Bahadur, S., et al., *Current promising treatment strategy for glioblastoma multiforme: A review*. *Oncology reviews*, 2019. **13**(2): p. 417.
173. Zhong, L., et al., *Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives*. *Signal Transduct Target Ther*, 2021. **6**(1): p. 201.
174. Thomas, A.A., et al., *Emerging therapies for glioblastoma*. *JAMA neurology*, 2014. **71**(11): p. 1437-44.
175. Liu, E.K., et al., *Novel Therapies for Glioblastoma*. *Current neurology and neuroscience reports*, 2020. **20**(7): p. 19.
176. Grabowska, M., et al., *Nano-mediated delivery of double-stranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme*. *PloS one*, 2019. **14**(3): p. e0213852.
177. Kaina, B., *Temozolomide in Glioblastoma Therapy: Role of Apoptosis, Senescence and Autophagy. Comment on Strobel et al., Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. Biomedicines 2019, 7, 69*. *Biomedicines*, 2019. **7**(4).
178. Salazar-Ramiro, A., et al., *Role of Redox Status in Development of Glioblastoma*. *Frontiers in immunology*, 2016. **7**: p. 156.
179. Krawczynski, K., J. Godlewski, and A. Bronisz, *Oxidative Stress-Part of the Solution or Part of the Problem in the Hypoxic Environment of a Brain Tumor*. *Antioxidants*, 2020. **9**(8).
180. Perillo, B., et al., *ROS in cancer therapy: the bright side of the moon*. *Experimental & molecular medicine*, 2020. **52**(2): p. 192-203.
181. Wen, Y.D., et al., *Hydrogen sulfide protects HUVECs against hydrogen peroxide induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress*. *PloS one*, 2013. **8**(2): p. e53147.
182. Kong, Q., J.A. Beel, and K.O. Lillehei, *A threshold concept for cancer therapy*. *Medical hypotheses*, 2000. **55**(1): p. 29-35.
183. Olivier, C., et al., *Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress*. *Frontiers in molecular biosciences*, 2020. **7**: p. 620677.
184. Wang, J. and J. Yi, *Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question*. *Cancer biology & therapy*, 2008. **7**(12): p. 1875-84.
185. Pizzino, G., et al., *Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. **2017**: p. 8416763.
186. Kong, Q. and C.L. Lin, *Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases*. *Cell Mol Life Sci*, 2010. **67**(11): p. 1817-29.



187. Szakacs, G., et al., *Targeting multidrug resistance in cancer*. Nature reviews. Drug discovery, 2006. **5**(3): p. 219-34.
188. Chandra, J., A. Samali, and S. Orrenius, *Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress*. Free radical biology & medicine, 2000. **29**(3-4): p. 323-33.
189. Li, Z.Y., et al., *Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer*. Biochemical and biophysical research communications, 2011. **414**(1): p. 5-8.
190. Wen, X., et al., *Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases*. Free radical biology & medicine, 2013. **65**: p. 402-410.
191. Galluzzi, L. and G. Kroemer, *Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis*. Cell, 2008. **135**(7): p. 1161-3.
192. Tang, D., et al., *Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications*. Cell research, 2021. **31**(2): p. 107-125.
193. Li, J., et al., *Ferroptosis: past, present and future*. Cell death & disease, 2020. **11**(2): p. 88.
194. Drenichev, M.S., et al., *Synthesis of N*. Curr Protoc Nucleic Acid Chem, 2018. **72**(1): p. 14.15.1-14.15.16.
195. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
196. Guex, N. and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis, 1997. **18**(15): p. 2714-23.
197. Sali, A. and T.L. Blundell, *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J Mol Biol, 1993. **234**(3): p. 779-815.
198. Laskowski, R.A., et al., *PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(12): p. 488-90.
199. Wallner, B. and A. Elofsson, *Can correct protein models be identified?* Protein Sci, 2003. **12**(5): p. 1073-86.
200. Case DA, B.-S.I., Brozell SR, Cerutti DS, Cheatham TEI, Cruzeiro VWD, Darden TA, Duke RE, Ghoreishi D, Gilson, M. K., Gohlke, H., Goetz AW, Greene D, Harris R, Homeyer N, Izadi S, Kovalenko A, Kurtzman T, Lee TS, LeGrand S, Li P, Lin C, Liu J, Luchko T, Luo R, Mermelstein DJ, Merz KM, Miao Y, Monard G, Nguyen C, Nguyen H, Omelyan I, Onufriev A, Pan F, Qi R, Roe DR, Roitberg A, Sagui C, Schott-Verdugo S, Shen J, Simmerling CL, Smith J, Salomon-Ferrer R, Swails J, Walker RC, Wang J, Wei H, Wolf RM, Wu X, Xiao L, York DM, Kollman PA., *AMBER 2017*. 2017: University of California, San Francisco.
201. Jakalian, A., D.B. Jack, and C.I. Bayly, *Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation*. J Comput Chem, 2002. **23**(16): p. 1623-41.
202. Wang, J., et al., *Development and testing of a general amber force field*. J Comput Chem, 2004. **25**(9): p. 1157-74.
203. V., H., et al., *Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters*. 2006: Proteins. p. 712-725.
204. Hawkins, G.D., C.J. Cramer, and D.G. Truhlar, *Parametrized Models of Aqueous Free Energies of Solvation Based on Pairwise Descreening of Solute Atomic Charges from a Dielectric Medium*. 1996: The Journal of Physical Chemistry. p. 19824-19839.
205. Frisch MJ, T.G., Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery J, J. A., Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJK, T., Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, *Gaussian 03, Revision C.02*. 2004: Gaussian, Inc, Wallingford, CT.

206. Sanner, M.F., *Python: a programming language for software integration and development*. J Mol Graph Model, 1999. **17**(1): p. 57-61.
207. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. J Comput Chem, 2010. **31**(2): p. 455-61.
208. Zhang, Y., M.H. El Kouni, and S.E. Ealick, *Substrate analogs induce an intermediate conformational change in Toxoplasma gondii adenosine kinase*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2007. **63**(Pt 2): p. 126-34.
209. Bhutoria, S. and N. Ghoshal, *Deciphering ligand dependent degree of binding site closure and its implication in inhibitor design: A modeling study on human adenosine kinase*. J Mol Graph Model, 2010. **28**(6): p. 577-91.
210. Lemmon, G. and J. Meiler, *Towards ligand docking including explicit interface water molecules*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67536.
211. Olsson, M.H., et al., *PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions*. J Chem Theory Comput, 2011. **7**(2): p. 525-37.
212. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
213. Hornak, V., et al., *Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters*. Proteins, 2006. **65**(3): p. 712-25.
214. Morris, G.M., et al., *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. J Comput Chem, 2009. **30**(16): p. 2785-91.
215. Baranowski, D., et al., *Studies on structure of kinetin riboside and its analogues by variable-temperature NMR*. 2019: J. Mol. Struct. p. 110-118.
216. Barciszewska, A.M., et al., *Total DNA Methylation Changes Reflect Random Oxidative DNA Damage in Gliomas*. Cells, 2019. **8**(9).
217. Nicholls, D.G., *Mitochondrial membrane potential and aging*. Aging Cell, 2004. **3**(1): p. 35-40.
218. Osgerby, L., et al., *Kinetin Riboside and Its ProTides Activate the Parkinson's Disease Associated PTEN-Induced Putative Kinase 1 (PINK1) Independent of Mitochondrial Depolarization*. J Med Chem, 2017. **60**(8): p. 3518-3524.
219. Xu, H., et al., *Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I provide insights into dNTP regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4022-7.
220. Hove-Jensen, B., et al., *Phosphoribosyl Diphosphate (PRPP): Biosynthesis, Enzymology, Utilization, and Metabolic Significance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2017. **81**(1).
221. Fredholm, B.B., et al., *Adenosine and brain function*. International review of neurobiology, 2005. **63**: p. 191-270.
222. Zhao, A., et al., *Revisiting and revising the purinosome*. Molecular bioSystems, 2014. **10**(3): p. 369-74.
223. Aft, R.L., F.W. Zhang, and D. Gius, *Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death*. Br J Cancer, 2002. **87**(7): p. 805-12.
224. Li, J., S.G. Kim, and J. Blenis, *Rapamycin: one drug, many effects*. Cell Metab, 2014. **19**(3): p. 373-9.
225. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
226. Montgomery, J.A., A.T. Shortnacy, and J.A. Secrist, *Synthesis and biological evaluation of 2-fluoro-8-azaadenosine and related compounds*. J Med Chem, 1983. **26**(10): p. 1483-9.
227. Hardesty, C.T., et al., *The disposition of the antitumor agent, sangivamycin, in mice*. Cancer Res, 1974. **34**(5): p. 1005-9.
228. Salem, M.A., M.I. Marzouk, and A.M. El-Kazak, *Synthesis and Characterization of Some New Coumarins with in Vitro Antitumor and Antioxidant Activity and High Protective Effects against DNA Damage*. Molecules, 2016. **21**(2): p. 249.
229. Liu, J. and Z. Wang, *Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 294303.

230. Rinaldi, M., et al., *ROS and Brain Gliomas: An Overview of Potential and Innovative Therapeutic Strategies*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(6).
231. Sheth, S., et al., *Adenosine receptors: expression, function and regulation*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(2): p. 2024-52.
232. Newby, A.C., Y. Worku, and C.A. Holmquist, *Adenosine formation. Evidence for a direct biochemical link with energy metabolism*. Advances in myocardiology, 1985. **6**: p. 273-84.
233. Viganò, S., et al., *Targeting Adenosine in Cancer Immunotherapy to Enhance T-Cell Function*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 925.
234. Reklow, R.J., et al., *The Purinome and the preBotzinger Complex - A Menage of Unexplored Mechanisms That May Modulate/Shape the Hypoxic Ventilatory Response*. Frontiers in cellular neuroscience, 2019. **13**: p. 365.
235. Bennett, L.L., Jr. and D.L. Hill, *Structural requirements for activity of nucleosides as substrates for adenosine kinase: orientation of substituents on the pentofuranosyl ring*. Molecular pharmacology, 1975. **11**(6): p. 803-8.
236. Bastin-Coyette, L., et al., *Mechanisms of cell death induced by 2-chloroadenosine in leukemic B-cells*. Biochemical pharmacology, 2008. **75**(7): p. 1451-60.
237. Chen, L.S., et al., *Inhibition of ATP synthase by chlorinated adenosine analogue*. Biochemical pharmacology, 2009. **78**(6): p. 583-91.
238. Goldin, N., et al., *Mitochondria-mediated ATP depletion by anti-cancer agents of the jasmonate family*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2007. **39**(1): p. 51-7.
239. Shaw, R.J., *Glucose metabolism and cancer*. Current opinion in cell biology, 2006. **18**(6): p. 598-608.
240. Mlejnek, P. and P. Dolezel, *Apoptosis induced by N6-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells*. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA, 2005. **19**(7): p. 985-90.
241. Wyszko, E., et al., *"Action-at-a distance" of a new DNA oxidative damage product 6-furfuryl-adenine (kinetin) on template properties of modified DNA*. Biochimica et biophysica acta, 2003. **1625**(3): p. 239-45.
242. Nunomura, A., et al., *Consequences of RNA oxidation on protein synthesis rate and fidelity: implications for the pathophysiology of neuropsychiatric disorders*. Biochemical Society transactions, 2017. **45**(5): p. 1053-1066.
243. Palumbo, C.M. and P.A. Beal, *Nucleoside analogs in the study of the epitranscriptome*. Methods, 2019. **156**: p. 46-52.
244. Makita, S., et al., *Forodesine in the treatment of relapsed/refractory peripheral T-cell lymphoma: an evidence-based review*. OncoTargets and therapy, 2018. **11**: p. 2287-2293.
245. Glazer, R.I., *Adenosine deaminase inhibitors: their role in chemotherapy and immunosuppression*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 1980. **4**(4): p. 227-35.
246. Chatterjee, N. and G.C. Walker, *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis*. Environmental and molecular mutagenesis, 2017. **58**(5): p. 235-263.
247. Ke, R., et al., *Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism*. Cell biology international, 2018. **42**(4): p. 384-392.
248. Kyoung, M., et al., *Dynamic architecture of the purinosome involved in human de novo purine biosynthesis*. Biochemistry, 2015. **54**(3): p. 870-80.
249. Pedley, A.M. and S.J. Benkovic, *Detecting Purinosome Metabolon Formation with Fluorescence Microscopy*. Methods in molecular biology, 2018. **1764**: p. 279-289.
250. Herzig, S. and R.J. Shaw, *AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2018. **19**(2): p. 121-135.
251. De Vitto, H., et al., *The Intersection of Purine and Mitochondrial Metabolism in Cancer*. Cells, 2021. **10**(10).

252. Pareek, V., et al., *Metabolomics and mass spectrometry imaging reveal channeled de novo purine synthesis in cells*. Science, 2020. **368**(6488): p. 283-290.
253. Lee, N., et al., *Endogenous toxic metabolites and implications in cancer therapy*. Oncogene, 2020. **39**(35): p. 5709-5720.
254. Luengo, A., D.Y. Gui, and M.G. Vander Heiden, *Targeting Metabolism for Cancer Therapy*. Cell chemical biology, 2017. **24**(9): p. 1161-1180.
255. Dong, L. and J. Neuzil, *Targeting mitochondria as an anticancer strategy*. Cancer communications, 2019. **39**(1): p. 63.
256. Roth, K.G., et al., *The Mitochondrion as an Emerging Therapeutic Target in Cancer*. Trends in molecular medicine, 2020. **26**(1): p. 119-134.
257. Wen, S., D. Zhu, and P. Huang, *Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach*. Future medicinal chemistry, 2013. **5**(1): p. 53-67.
258. Amoedo, N.D., et al., *How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells*. Bioscience reports, 2013. **33**(6).
259. DeBerardinis, R.J. and N.S. Chandel, *Fundamentals of cancer metabolism*. Science advances, 2016. **2**(5): p. e1600200.
260. Wang, Y., Y. Xia, and Z. Lu, *Metabolic features of cancer cells*. Cancer communications, 2018. **38**(1): p. 65.
261. Koobs, D.H., *Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects*. Science, 1972. **178**(4057): p. 127-33.
262. Rodriguez-Enriquez, S., et al., *Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells*. Journal of cellular physiology, 2009. **221**(3): p. 552-9.
263. Zhuang, Y., et al., *Mechanisms by which low glucose enhances the cytotoxicity of metformin to cancer cells both in vitro and in vivo*. PloS one, 2014. **9**(9): p. e108444.
264. Sun, S., et al., *High glucose promotes breast cancer proliferation and metastasis by impairing angiotensinogen expression*. Bioscience reports, 2019. **39**(6).
265. Rossignol, R., et al., *Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells*. Cancer research, 2004. **64**(3): p. 985-93.
266. Dott, W., et al., *Modulation of mitochondrial bioenergetics in a skeletal muscle cell line model of mitochondrial toxicity*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 224-33.
267. Kamalian, L., et al., *The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(4): p. 732-40.
268. Scaife, J. and D. Kerr, *Antimetabolites in Cancer Therapy*. 2008, In: Missailidis S (ed) Anticancer therapeutics. Wiley-Blackwell, Chichester.
269. Andrzejewski, S., et al., *Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics*. Cancer Metab, 2014. **2**: p. 12.
270. Smolková, K., et al., *Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia*. J Bioenerg Biomembr, 2010. **42**(1): p. 55-67.
271. TeSlaa, T. and M.A. Teitell, *Techniques to monitor glycolysis*. Methods Enzymol, 2014. **542**: p. 91-114.
272. Britto, A.M., et al., *Expression levels of the innate response gene RIG-I and its regulators RNF125 and TRIM25 in HIV-1-infected adult and pediatric individuals*. AIDS, 2013. **27**(12): p. 1879-85.
273. Zaal, E.A. and C.R. Berkers, *The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 500.
274. Zhang, X.D., et al., *Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro*. Anticancer Res, 2006. **26**(5A): p. 3561-6.
275. Cheng, G., et al., *Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death*. Cancer Res, 2012. **72**(10): p. 2634-44.

276. Sottnik, J.L., et al., *Glycolysis inhibition by 2-deoxy-D-glucose reverts the metastatic phenotype in vitro and in vivo*. Clin Exp Metastasis, 2011. **28**(8): p. 865-75.
277. Zhu, Z., et al., *2-Deoxyglucose as an energy restriction mimetic agent: effects on mammary carcinogenesis and on mammary tumor cell growth in vitro*. Cancer Res, 2005. **65**(15): p. 7023-30.
278. Nekvinda, J., et al., *Synthesis of naphthalimide-carborane and metallacarborane conjugates: Anticancer activity, DNA binding ability*. Bioorg Chem, 2020. **94**: p. 103432.
279. Eskiocak, U., et al., *Synergistic effects of ion transporter and MAP kinase pathway inhibitors in melanoma*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12336.
280. Zhou, C., et al., *Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells*. Autophagy, 2012. **8**(8): p. 1215-26.
281. Kim, J.Y., et al., *PARK7 maintains the stemness of glioblastoma stem cells by stabilizing epidermal growth factor receptor variant III*. Oncogene, 2021. **40**(3): p. 508-521.
282. Rawat, P.S., et al., *Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management*. Biomed Pharmacother, 2021. **139**: p. 111708.
283. Delma, M.I., *Three May Be Better Than Two: A Proposal for Metformin Addition to PI3K/Akt Inhibitor-antiandrogen Combination in Castration-resistant Prostate Cancer*. Cureus, 2018. **10**(10): p. e3403.
284. Ott, M., et al., *Mitochondria, oxidative stress and cell death*. Apoptosis, 2007. **12**(5): p. 913-22.
285. Godoy, P.R.D.V., et al., *Targeting NRF2, Regulator of Antioxidant System, to Sensitize Glioblastoma Neurosphere Cells to Radiation-Induced Oxidative Stress*. Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 2534643.
286. Zong, H., L.F. Parada, and S.J. Baker, *Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(5).
287. Zukiel, R., et al., *Suppression of human brain tumor with interference RNA specific for tenascin-C*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(8): p. 1002-7.
288. Wyszko, E., et al., *A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA*. Acta Pol Pharm, 2008. **65**(6): p. 677-84.
289. Zanotto-Filho, A., et al., *Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas*. Cancer Lett, 2015. **358**(2): p. 220-231.
290. Yuan, Y., et al., *Resveratrol enhances the antitumor effects of temozolomide in glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR signaling pathway*. CNS Neurosci Ther, 2012. **18**(7): p. 536-46.
291. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
292. Tokunaga, C., K. Yoshino, and K. Yonezawa, *mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(2): p. 443-6.
293. Hill, C., S.B. Hunter, and D.J. Brat, *Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications*. Adv Anat Pathol, 2003. **10**(4): p. 212-7.
294. Fujisawa, H., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas*. Lab Invest, 2000. **80**(1): p. 65-72.
295. Mudassar, F., et al., *Targeting tumor hypoxia and mitochondrial metabolism with anti-parasitic drugs to improve radiation response in high-grade gliomas*. J Exp Clin Cancer Res, 2020. **39**(1): p. 208.
296. Snezhkina, A.V., et al., *ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 6175804.
297. Kiseleva, L.N., et al., *CHARACTERISTICS OF A172 AND T98G CELL LINES*. Tsitologiii, 2016. **58**(5): p. 349-55.
298. Marchetti, P., et al., *Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells*. FASEB J, 2020. **34**(10): p. 13106-13124.

299. Guntuku, L., V.G. Naidu, and V.G. Yerra, *Mitochondrial Dysfunction in Gliomas: Pharmacotherapeutic Potential of Natural Compounds*. *Curr Neuropharmacol*, 2016. **14**(6): p. 567-83.
300. Fan, W., et al., *Glioma cells are resistant to inflammation-induced alterations of mitochondrial dynamics*. *Int J Oncol*, 2020. **57**(6): p. 1293-1306.
301. Liou, G.Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. *Free Radic Res*, 2010. **44**(5): p. 479-96.
302. Toler, S.M., D. Noe, and A. Sharma, *Selective enhancement of cellular oxidative stress by chloroquine: implications for the treatment of glioblastoma multiforme*. *Neurosurg Focus*, 2006. **21**(6): p. E10.
303. Barciszewska, A.M., et al., *A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0136669.
304. Palma, T.V., et al., *Berberine induces apoptosis in glioblastoma multiforme U87MG cells via oxidative stress and independent of AMPK activity*. *Mol Biol Rep*, 2020. **47**(6): p. 4393-4400.
305. Chiasserini, D., et al., *3-Bromopyruvate treatment induces alterations of metabolic and stress-related pathways in glioblastoma cells*. *J Proteomics*, 2017. **152**: p. 329-338.
306. Białkowska, K., et al., *Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(17).
307. Edmondson, R., et al., *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors*. *Assay Drug Dev Technol*, 2014. **12**(4): p. 207-18.
308. Melissaridou, S., et al., *The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer*. *Cancer Cell Int*, 2019. **19**: p. 16.
309. Khaitan, D., S. Chandna, and S.B. Dwarakanath, *Short-term exposure of multicellular tumor spheroids of a human glioma cell line to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose is more toxic than continuous exposure*. *J Cancer Res Ther*, 2009. **5 Suppl 1**: p. S67-73.
310. Riffle, S., et al., *Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids*. *BMC Cancer*, 2017. **17**(1): p. 338.
311. Delic, V., et al., *The effects of AICAR and rapamycin on mitochondrial function in immortalized mitochondrial DNA mutator murine embryonic fibroblasts*. *Biol Open*, 2018. **7**(11).
312. Qu, H., et al., *Berberine reduces temozolomide resistance by inducing autophagy via the ERK1/2 signaling pathway in glioblastoma*. *Cancer Cell Int*, 2020. **20**(1): p. 592.
313. Tong, L., et al., *Antitumor Effects of Berberine on Gliomas via Inactivation of Caspase-1-Mediated IL-1 $\beta$  and IL-18 Release*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 364.
314. Lv, H., et al., *Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy*. *Oxid Med Cell Longev*, 2019. **2019**: p. 3150145.
315. Zhu, Z., et al., *Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis*. *J Neurochem*, 2018. **144**(1): p. 93-104.
316. Bae, H., et al., *Disruption of Endoplasmic Reticulum and ROS Production in Human Ovarian Cancer by Campesterol*. *Antioxidants (Basel)*, 2021. **10**(3).
317. Sharma, V., et al., *Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(9): p. 2544-53.
318. Hu, Z., et al., *A Potential Mechanism of Temozolomide Resistance in Glioma-Ferroptosis*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 897.
319. Sun, Y., R. Deng, and C. Zhang, *Erastin induces apoptotic and ferroptotic cell death by inducing ROS accumulation by causing mitochondrial dysfunction in gastric cancer cell HGC-27*. *Mol Med Rep*, 2020. **22**(4): p. 2826-2832.
320. Lee, Y.S., et al., *Ferroptosis-Induced Endoplasmic Reticulum Stress: Cross-talk between Ferroptosis and Apoptosis*. *Mol Cancer Res*, 2018. **16**(7): p. 1073-1076.
321. Zhang, M.L., et al., *Involvement of glutathione peroxidases in the occurrence and development of breast cancers*. *J Transl Med*, 2020. **18**(1): p. 247.

322. Traverso, N., et al., *Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance*. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. **2013**: p. 972913.
323. Kennedy, L., et al., *Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies*. *Biomolecules*, 2020. **10**(10).
324. Desideri, E., F. Ciccarone, and M.R. Ciriolo, *Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy*. *Nutrients*, 2019. **11**(8).
325. Rodic, S. and M.D. Vincent, *Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype*. *Int J Cancer*, 2018. **142**(3): p. 440-448.
326. Rykowski, S., et al., *Design, Synthesis, and Evaluation of Novel 3-Carboranyl-1,8-Naphthalimide Derivatives as Potential Anticancer Agents*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(5).
327. Castro, M.L., et al., *High Dose Ascorbate Causes Both Genotoxic and Metabolic Stress in Glioma Cells*. *Antioxidants (Basel)*, 2017. **6**(3).
328. Chang, K.Y., et al., *Specificity protein 1-modulated superoxide dismutase 2 enhances temozolomide resistance in glioblastoma, which is independent of O*. *Redox Biol*, 2017. **13**: p. 655-664.
329. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013. **53**: p. 401-26.
330. Ro, S.H., et al., *SESTRINs: Emerging Dynamic Stress-Sensors in Metabolic and Environmental Health*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 603421.
331. Friedmann-Morvinski, D., et al., *Targeting NF- $\kappa$ B in glioblastoma: A therapeutic approach*. *Sci Adv*, 2016. **2**(1): p. e1501292.
332. Zawirska-Wojtasiak, R., et al.,  *$\beta$ -Carbolines in Experiments on Laboratory Animals*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(15).
333. Cho, S.Y., et al., *Expression of PGC1 $\alpha$  in glioblastoma multiforme patients*. *Oncol Lett*, 2017. **13**(6): p. 4055-4076.