

STRESZCZENIE

Celem rozprawy doktorskiej jest ocena mechanizmu przeciwnowotworowego działania metforminy (MET) w komórkach raka piersi MCF-7. Praca doktorska oparta jest na hipotezie zakładającej, że MET aktywuje kinazę AMP (AMPK) która indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych poprzez kaskadę procesów obejmujących generowanie przez dehydrogenazę prolinową/oksydazę prolinową (PRODH/POX) reaktywnych form tlenu (ROS) w warunkach dostępności proliny, substratu PRODH/POX. Założono, że omawiane procesy wymagają szczególnych warunków metabolicznych, określonych przez złożone mechanizmy regulacyjne komórki. W warunkach niedoboru węglowodanowych i lipidowych substratów energetycznych, w celu przeżycia, komórka wykorzystuje alternatywne źródła energii, głównie prolinę i glutaminę wraz z metabolitami glutaminy, takimi jak glutaminian, alfa-ketoglutaran i ornityna. Są one substratami do produkcji pirolidyno-5-karboksylanu, który jest także produktem degradacji proliny przez PRODH/POX w celu wytworzenia ATP, sprzyjając pro-przeżyciowej autofagii lub generowania ROS indukujących apoptozę. Konwersja proliny, ornityny i glutaminianu może zatem regulować zależną od PRODH/POX apoptozę/autofagię. Kluczowym aminokwasem jest prolina, krążąca między mitochondriami a cytoplazmą w cyklu zwanym cyklem prolinowym. Jest on sprzężony ze szlakiem pentozowo-fosforanowym produkującym nukleotydy niezbędne do biosyntezy DNA. PRODH/POX jest również powiązany ze szlakami zależnymi od p53 i AMPK. Dostępność proliny dla zależnej od PRODH/POX apoptozy/autofagii jest regulowana na poziomie wzajemnych przemian proliny, ornityny, glutaminianu i α -ketoglutaranu, łącząc metabolizm aminokwasów z cyklem kwasów trikarboksylowych (TCA) i cyklem mocznikowym oraz pośrednio z łańcuchem transportu elektronów. Sugeruje to istnienie specyfiki molekularnej komórki nowotworowej, która może ulec zmianie pod wpływem działania MET. W związku z tym, przy użyciu analizy metabolomicznej określono profil metabolomiczny komórek nowotworowych poddanych działaniu MET. Profil ten analizowano w komórkach MCF-7 typu dzikiego (MCF-7WT) poddanych działaniu MET oraz komórkach MCF-7 ze znokautowanym PRODH/POX (MCF-7crPOX), wytworzonym przy użyciu technologii CRISPR-Cas9. Proliferację komórek określano za pomocą CyQUANT[®] Cell Proliferation Assay, natomiast cykl komórkowy analizowano za pomocą cytometrii przepływowej z użyciem Nucleo-Counter NC-3000. Ekspresję białek proapoptotycznych oceniano metodą Western blot. Analizę metabolomiczną (obejmującą stężenie wewnątrzkomórkowej proliny, kwasów glutaminowego, ornityny, glutaminy, kwasu α -ketoglutarowego, glukozy, pirogonianu, bursztynianu i innych) przeprowadzono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas z potrójnym kwadrupolem (LC-MS/MS/QqQ).

Wykazano, że MET hamowała proliferację komórek MCF-7WT jak i MCF-7crPOX inkubowanych zarówno w podłożu zawierającym i w podłożu pozbawionym glutaminy. Hamowanie tego procesu było jednak wyraźniejsze w przypadku braku glutaminy w podłożu hodowlanym. Odsetek komórek w fazie G2/M do komórek w fazie G0/G1 wykazał, że zarówno traktowanie komórek MET, albo nokaut PRODH/POX silnie hamowały proliferację tych komórek hodowanych w podłożu bez glutaminy. Nie wykazano takiego efektu w komórkach hodowanych w obecności glutaminy. MET indukowała ekspresję AMPK (induktor PRODH/POX) w obu liniach komórkowych niezależnie od obecności lub braku glutaminy. Efekt ten był wyraźniejszy w komórkach hodowanych w podłożu bez glutaminy. W przypadku braku glutaminy MET indukowała ekspresję aktywnej formy PARP oraz kaspazy 7 w obu liniach komórkowych. W obecności glutaminy efekt ten był widoczny tylko w komórkach MCF-7 typu dzikiego (MCF-7WT).

W nieobecności glutaminy, traktowanie MET lub nokaut PRODH/POX w komórkach MCF-7 przyczynił się do podobnego zahamowania glikolizy (drastyczny wzrost wewnątrzkomórkowej glukozy i pirogonianu) oraz wzrostu zużycia kwasu fosfoenolopirogonianowego, glukozy-6-fosforanu i

niektórych metabolitów cyklu TCA oraz cyklu mocznikowego (obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia), przyczyniając się do indukcji apoptozy. Jednakże, w obecności glutaminy, traktowanie komórek MCF-7 MET lub nokaut PRODH/POX przyczyniało się do utylizacji niektórych badanych metabolitów (z wyjątkiem glukozy), przyczyniając się do pro-przeżyciowego fenotypu komórek MCF-7 w tych warunkach.

Uzyskane wyniki sugerują, że MET lub nokaut PRODH/POX przyczynia się do hamowania proliferacji komórek (zahamowanie to było wyraźniejsze w przypadku braku glutaminy) oraz indukcji apoptozy poprzez przeprogramowanie metabolizmu aminokwasów, cyklu TCA, cyklu mocznikowego i szlaku pentozowo-fosforanowego w tych komórkach.

Analiza metabolomiczna w komórkach hodowanych z glutaminą lub bez niej sugeruje, że glikoliza jest ściśle powiązana z metabolizmem glutaminy i proliny. W przypadku braku glutaminy, traktowanie MET lub nokaut PRODH/POX przyczynia się do zahamowania glikolizy (głodu glukozy) i apoptozy w tych komórkach. Wyniki tych badań pogłębiają wiedzę o mechanizmie przeciwnowotworowego działania MET i sugerują, że skojarzone działanie MET z inhibitorami syntezy glutaminy może stanowić przedmiot dalszych badań nad eksperymentalną terapią raka piersi.