

ABSTRACT

" Molecular mechanisms of 3-bromopyruvate activity in multiple myeloma cells and pathogenic microorganisms of the genus *Cryptococcus* and *Prototheca*"

3-bromopyruvate (3BP) is a small, highly reactive molecule formed by the bromination of pyruvate. In 2000, the antitumor properties of this compound were discovered. Studies using animal models proved its high efficacy in therapy with no apparent side effects. Due to the 'Warburg effect', most tumor cells exhibit metabolic changes. They promote cell migration, and avoidance of apoptosis allows for less dependence on the availability of oxygen. However, these attributes may also make cancer more sensitive to agents that inhibit glycolysis, such as 3BP. Therefore, 3BP exhibits a selective action. Importantly, 3BP is not a substrate of any pumps belonging to the ATP-binding cassette superfamily which confers resistance to different drugs. Moreover, this compound has an ability to induce multiple forms of cell death. The best known method is ATP depletion as a result of alkylation of glycolytic and mitochondrial enzymes. Apart from its anticancer properties, 3BP also exhibits antimicrobial activity. Various species of microorganisms are characterized by extremely different susceptibility to this compound. Among the tested strains, the most sensitive was found to be the pathogenic yeast-like fungus *Cryptococcus neoformans*.

Despite the growing interest in the activity of this compound, the exact mechanism of 3BP action remains unknown. Studies conducted in the framework of this dissertation allow for a better understanding of the mechanisms of 3BP activity in multiple myeloma (MM) cells and microorganisms of the genus *Cryptococcus* and *Prototheca*. They also allowed the discovery of the molecular causes of the high sensitivity of *C. neoformans* strains toward the action of this molecule. Research has shown that in the case of the analyzed cells, the therapeutic also exhibits other critical cellular sites of action. For the first time, the impact of 3BP on the changes in expression levels of genes encoding key enzymes for the survival of the cells was examined.

One essential observation was that 3BP induces oxidative stress in *C. neoformans* and MM cells. This phenomenon occurs through the stimulation of free radical generation and release of bromine radicals. To protect against this phenomenon, during incubation in the

presence of 3BP, the overexpression of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) was observed in both research models. These enzymes are the main enzymatic cellular antioxidants, which are essential for survival of cells exposed to osmotic shock. Furthermore, it was found that the expression level of the gene encoding cytochrome P450 (CYP) remained unchanged despite the presence of 3BP.

Another target of the action of this compound is the reduced form of glutathione (GSH). GSH is a pivotal non-enzymatic cellular antioxidant. With the increase of its intracellular level, the resistance to the harmful effects of xenobiotics increases. Reduced concentration of this tripeptide in MM, *Cryptococcus spp.* and *Prototheca spp.* cells was observed under 3BP action. This phenomenon is reported with simultaneous stimulation of the expression of genes encoding enzymes responsible for GSH synthesis. 3BP also increases the expression of the gene encoding glutathione S-transferase (GST). This enzyme is responsible for the GSH-3BP conjugation process in order to inactivate the compound. We can therefore conclude that the decrease in GSH levels in cells is largely due to the phenomenon of complex formation of glutathione with 3BP. It is noteworthy that the decrease in GSH concentration results in increased cell sensitivity to the free radicals and hydrogen peroxide action. The stimulation of free radical generation and decrease in GSH levels result in the initiation of apoptosis and necrosis in multiple myeloma and *C. neoformans*. In both cases, morphological changes were observed, caused by significant cell dehydration. In addition, under the action of 3BP on the surface of MM cells, the presence of a structure called 'apoptotic bodies' was revealed. These structures are characteristic for the advanced process of programmed cell death. Brief incubation in the presence of 3BP, not exceeding 4 hours, did not significantly influence cell death stimulation. However, prolonged exposure of MM cells results in a dramatic increase in the number of dead cells as a result of apoptosis.

A strong synergistic effect of 3BP with amphotericin B (AmB) action in cells of *C. neoformans* was demonstrated. These results can provide a basis for further research leading to minimizing the AmB doses used to treat systemic fungal infections. This drug, most commonly used in this type of diseases, is highly effective, but also is strongly nephro- and hepatotoxic.

Moreover, by using larvae of *Galleria mellonella* as a model organism, preliminary tests to determine a safe therapeutic dose of 3BP were conducted. It was found that 3BP in the

concentration of 150 mg per kilogram of body weight has no effect on survival of this species. At the same time, the usefulness of this model in the initial toxicity studies of xenobiotics, prior to routine testing in mammals, has been demonstrated.

Our studies demonstrated that the difference in the rate of 3BP transport into the cells cause disparities in the susceptibility of various species of fungi. The most resistant strains showed the lowest value $V_{\max}$ and vice versa. For all examined fungal strains, the 3BP uptake into cells was consistent with the enzymatic Michaelis-Menten curve. This indicates the presence of a mediated transport system. Interestingly, the results of the uptake assays by cells of *Prototheca spp.*, showed that in this case the 3BP absorption occurs by simple diffusion. Our studies allowed identification of the 3BP transporter in *C. neoformans* cells. As in the case of *S. cerevisiae* and human cells, it belongs to the major facilitator superfamily (MFS) of proteins. The gene (*CNAG_04704*), whose product is an MFS transporter responsible for the transport of monocarboxylic acids, was isolated from the *C. neoformans* genome. Then, heterologous expression of this gene in the *S. cerevisiae* $\Delta jen1 \Delta dy2$ cells, which are devoid of the main 3BP yeast transporter ScJen1, was carried out. Obtained transformants showed enhanced sensitivity to the compound as a result of functional complementation. Sensitivity tests carried out on the strain of *C. neoformans* with a deletion in the gene *CNAG_04704* definitively confirmed that the Cn04 protein is responsible for 3BP uptake. The analysis of 3BP transport into cells of deletion mutants, confirmed the tested protein's functionality.

Finally, one can conclude that in many aspects 3BP exhibits similar biological activity in tumor, fungal and algal cells. Research carried out in the framework of the doctoral dissertation provided new information on the mechanisms of cellular responses to the action of 3BP. They also may form the basis for further research aimed at creating new drugs and strategies for cryptococcosis, protothecosis and cancer treatment in humans.

10.04.2017
Katarzyna Nedzwiecka

STRESZCZENIE

"Molekularne mechanizmy działania 3-bromopirogronianu w komórkach szpiczaka mnogiego i patogennych mikroorganizmów z rodzaju *Cryptococcus* i *Prototheca*."

3-bromopirogronian (3BP) jest małą, wysoce reaktywną cząsteczką, powstałą na skutek bromowania pirogronianu. W 2000 roku odkryto właściwości przeciwnowotworowe tego związku. Badania z wykorzystaniem modelu zwierzęcego udowodniły wysoką jego skuteczność w terapii przy jednoczesnym braku widocznych skutków ubocznych. Większość typów komórek nowotworowych wykazuje tzw. efekt Warburga, co prowadzi do istotnych zmian metabolicznych. Między innymi, polegają one na podwyższonej preferencji procesu glikolizy jako głównego źródła energii pomimo obecności tlenu. Dzięki temu, komórki są lepiej przystosowane do zmiennego mikrośrodowiska tworzonego w trakcie rozrostu guza. Stan ten ułatwia migrację komórkową, chroni przed zajściem procesu apoptozy oraz powoduje, że komórki stają się mniej zależne od dostępności tlenu. Jednak, takie cechy mogą powodować, że komórka jest wrażliwa na działanie takich związków jak 3BP, które hamują aktywność enzymów glikolitycznych. Z powodu efektu Warburga, 3BP wykazuje wysoce selektywne działanie. Dzięki temu stężenie bójcze na komórki nowotworowe jest około 3 razy niższe niż stężenie bójcze właściwe dla komórek zdrowych. Ponadto, 3BP nie jest substratem dla transporterów typu ABC, które stanowią główny czynnik determinujący zjawisko wielorakiej oporności na ksenobiotyki. 3BP wykazuje zdolność do indukcji różnych form śmierci komórkowej. Najlepiej poznanym mechanizmem jest deplecja ATP na skutek alkilacji enzymów glikolitycznych i mitochondrialnych. Oprócz właściwości przeciwnowotworowych, 3BP przejawia również aktywność przeciwdrobnoustrojową. Różne gatunki mikroorganizmów charakteryzują się skrajnie odmienną wrażliwością na działanie tego związku. Spośród przebadanych szczepów, najbardziej wrażliwy okazał się patogenny grzyb *Cryptococcus neoformans*.

Pomimo rosnącego zainteresowania aktywnością tego związku, dokładny mechanizm działania 3BP nie został jeszcze całkowicie poznany. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwalają na lepsze poznanie mechanizmów biologicznej aktywności 3BP w komórkach szpiczaka mnogiego i mikroorganizmów z rodzaju *Cryptococcus* i *Prototheca*. Pozwoliły również na odkrycie molekularnych przyczyn wysokiej wrażliwości szczepów *C. neoformans* na działanie tej cząsteczki. Wyniki badań pokazują, że

w przypadku analizowanych komórek, terapeutyk ten wykazuje również działanie na innych poziomach komórkowych.

Jedną z istotnych obserwacji było stwierdzenie, że 3BP indukuje stres oksydacyjny w komórkach *C. neoformans* i MM. Zjawisko to zachodzi poprzez stymulację generacji wolnych rodników tlenowych oraz uwolnienie rodników bromowych. Aby przeciwdziałać negatywnym skutkom tego zjawiska, w trakcie inkubacji w obecności związku, komórki wykazują nadekspresję genów kodujących izoformy dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Białka te są głównymi enzymatycznymi przeciwutleniaczami komórkowymi. Ich obecność jest niezbędna do przeżycia komórki poddanej działaniu szoku oksydacyjnego. Ponadto, stwierdzono, że poziom ekspresji genów kodujących cytochrom P450 (CYP) pozostał bez zmian pomimo działania 3BP. CYP jest silnym czynnikiem inaktywującym wiele leków. Tak więc, możemy wnioskować, że brak stymulacji ekspresji tego genu sprzyja skuteczności działania 3BP.

Kolejnym celem działania badanego związku w komórce eukariotycznej jest zredukowana forma glutationu (GSH). GSH jest podstawowym nieenzymatycznym przeciwutleniaczem komórki. Wraz ze wzrostem jego wewnątrzkomórkowego poziomu rośnie oporność szczepu na szkodliwe działanie ksenobiotyków. Pod wpływem działania 3BP zaobserwowano spadek stężenia glutationu w komórkach MM, *Cryptococcus spp.* i *Prototheca spp.* Zjawisko to zaobserwowano przy równoczesnej stymulacji ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne z syntezę GSH. 3BP powoduje również wzrost ekspresji genu kodującego transferazę-S-glutationową. Enzym ten odpowiada za proces tworzenia kompleksów GSH-3BP w celu inaktywacji związku. Należy wnioskować, że spadek poziomu GSH w komórkach, w dużej mierze jest wynikiem tworzenia koniugatów z glutationem.

Stymulacja tworzenia wolnych rodników, przy jednoczesnym spadku poziomu GSH skutkuje inicjacją procesów apoptozy i nekrozy w komórkach szpiczaka mnogiego i *C. neoformans*. W obu przypadkach, zaobserwowano zmiany w morfologii spowodowane znacznym odwodnieniem komórek. Ponadto, pod wpływem działania 3BP, na powierzchni komórek MM stwierdzono obecność struktur zwanych "ciałkami apoptotycznymi". Twory te są charakterystyczne dla zaawansowanego procesu zaprogramowanej śmierci komórkowej. Krótka inkubacja w obecności 3BP, nie przekraczająca 4 godzin, nie wpływała znacząco na proces indukowania apoptozy. Jednak, wydłużenie ekspozycji komórek MM na działanie

związku do 18 godzin, powoduje drastyczny wzrost liczby komórek martwych na skutek procesów apoptycznych.

W toku badań wykazano, że kolejnym czynnikiem wpływającym na zróżnicowaną wrażliwość różnych gatunków grzybów jest odmienne tempo transportu 3BP do komórek. Najbardziej odporne szczepy wykazywały najniższą wartość $V_{\max}$ i odwrotnie. W przypadku wszystkich analizowanych gatunków grzybów, transport związku był zgodny z enzymatyczną krzywą Michaelisa-Mentena. Wskazuje to na obecność białkowych systemów transporterowych. Co ciekawe, wyniki badania akumulacji związku przez komórki *Prototheca spp.* wykazały, że w ich przypadku pobieranie 3BP zachodzi na drodze dyfuzji prostej.

Ponadto, wykazano silne synergistyczne działanie 3BP z amfoterycyną B (AmB) w komórkach *C. neoformans*. Wynik ten, może stanowić podstawę do dalszych badań prowadzących do zminimalizowania stosowanych dawek AmB w leczeniu grzybic ustrojowych. Lek ten, najczęściej używany w tego typu schorzeniach, wykazuje wysoką skuteczność, ale również silną nefro- i hepatotoksyczność.

Używając larw mola woskowego- *Galleria mellonella* jako organizmu modelowego, przeprowadzono wstępne badania określające bezpieczną dawkę terapeutyczną 3BP. Ustalono, że doza równa 150 mg na kg masy ciała nie ma wpływu na przeżywalność organizmów tego gatunku. Jednocześnie, udowodniono dużą użyteczność tego modelu biologicznego we wstępnych badaniach toksyczności ksenobiotyków, poprzedzających rutynowe testy na ssakach.

Następne badania pozwoliły na identyfikację transportera 3BP w komórkach *C. neoformans*. Podobnie jak w przypadku komórek drożdży *S. cerevisiae* i komórek ludzkich transporter ten należy do rodziny białek MFS (Major Facilitator Superfamily). Gen (*CNAG_04704*), którego produktem jest transporter MFS, odpowiedzialny za transport kwasów monokarboksylowych został wyizolowany z genomu *C. neoformans*. Następnie przeprowadzono heterologiczną ekspresję tego genu w komórkach mutantu delecyjnego drożdży *S. cerevisiae* (*Ajen1 Δady*), pozbawionego drożdżowego transportera 3BP - Jen1. Uzyskane transformanty w wyniku funkcjonalnej komplementacji wykazywały zwiększoną wrażliwość na działanie związku w porównaniu do szczepu wyjściowego. Testy wrażliwości fenotypowej, przeprowadzone na szczepie *C. neoformans* z delecją genu *CNAG_04704* ostatecznie potwierdziły, że brak tego białka transporterowego Cn04 odpowiada za fenotyp

oporności komórek tego grzyba i pobieranie 3BP. Analiza transportu 3BP do komórek mutantów delecyjnych, definitywnie potwierdziła funkcję badanego białka.

Przeprowadzone badania wykazały, że w wielu aspektach 3BP wykazuje podobną aktywność biologiczną bez względu na to czy mamy do czynienia z komórkami nowotworowymi, grzybami czy algami. Zaobserwowano, że wrażliwość na działanie 3BP może być wypadkową wielu czynników takich jak naturalny poziom GSH w komórce, tempo pobierania związku lub też ekspresja cytochromu P450. Badania przeprowadzone w ramach tej pracy doktorskiej dostarczyły nowych informacji na temat mechanizmów odpowiedzi komórkowej na działanie 3BP. Zidentyfikowano błonowy transporter w komórkach *C. neoformans* odpowiedzialny za transport badanego związku. Ponadto, po raz pierwszy określono wpływ 3BP na zmianę poziomu ekspresji genów kodujących enzymy kluczowe dla przetrwania komórki. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań mających na celu zaprogramowanie nowych leków i strategii leczenia nowotworów, kryptokokozy i prototekozy u ludzi

10.04.2017

Katarzyna Niechwiejko